

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química-Física



CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA
DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*),
UNA ENZIMA CON ELEVADA ESTABILIDAD

TESIS DOCTORAL

Laura Sánchez Zamorano

Salamanca 2009



Departamento de Química Física

VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

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

CERTIFICAN que la investigación de doctorado que lleva por título: **Caracterización Químico-Física de la Peroxidasa de Palma Real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad**, se ha realizado bajo su dirección por la Graduada en Química doña Laura Sánchez Zamorano.

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.

Salamanca, a 16 de Septiembre de 2009

Dr. Manuel García Roig

Dr. Valery L. Shnyrov

NOTA PRELIMINAR

El trabajo descrito en esta memoria se ha desarrollado dentro de los proyectos SA-06-00-0 ITACYL-Universidad de Salamanca y SA 129A07 de la Junta de Castilla y León. Este organismo concedió a Laura Sánchez Zamorano una beca de Formación de Personal Investigador durante el periodo 2004-2008 (Ref. EDU/1490/2003).

Se agradece sinceramente la ayuda de estos organismos.

Una parte de los resultados recogidos en la presente memoria se han publicado:

- ♦ **Laura S. Zamorano**, Manuel G. Roig, Enrique Villar & Valery L. Shnyrov.

The versatile peroxidases

Current Topics in Biochemical. Research 9 (2007) 1-26

- ♦ Leandra Watanabe, Alessandro S. Nascimento, **Laura S. Zamorano**, Valery L. Shnyrov & Igor Polikarpov.

Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of royal palm tree (*Roystonea regia*) peroxidase

Acta Crystallographica Section F (Structural Biology and Crystallization Communications) F63 (2007) 780-783.

- ♦ **Laura S. Zamorano.**, David G. Pina, Juan B. Arellano, Sergey A. Bursakov, Andrey P. Zhadan, Juan J. Calvete, Libia Sanz, Peter R. Nielsen, Enrique Villar, Olga Gavel, Manuel G. Roig, Leandra Watanabe, Igor Polikarpov, & Valery L. Shnyrov.

Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea Regia* peroxidase stability

Biochimie 90 (2008) 1737-1749

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al director Dr. Valery L. Shnyrov, por su orientación, dirección y supervisión durante la elaboración de esta tesis, sin su ayuda no se habría llevado a cabo. Gracias por sus enseñanzas, sus consejos científicos y personales, recibidos durante todos estos años.

Al director Dr. Manuel G. Roig, por la ayuda prestada durante estos años en la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Villar, por haberme permitido trabajar dentro de su equipo.

A todos los compañeros de los departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y de Química Física, que de algún modo, han contribuido en este trabajo.

Al Dr. Igor Polikarpov y su equipo del Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, Brasil, por su ayuda con los experimentos de cristalización, difracción de Rayos X y análisis de acoplamiento estadístico.

A los doctores Juan José Calvete y Libia Sanz, del Instituto de Biomedicina de Valencia, por su ayuda en el diseño de primers y utilización de las técnicas de Biología Molecular.

A todas aquellas personas que de algún modo han contribuido a la realización de este trabajo, desde los jardineros del campus de la Universidad de Alicante, que me ayudaron a cortar la planta, hasta aquellos que han contribuido de un modo más científico en diferentes ámbitos. A todos ellos, muchas gracias.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante estos años, por estar en todo momento, sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mis amigas, por su compañía, sus largas conversaciones y su apoyo.

A Ángel, por ayudarme en muchos aspectos relacionados con la forma de esta memoria, por estar siempre a mi lado, por sus consejos y su confianza en mí.

A todos ellos muchas gracias.



*Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.*

Isaac Newton

A mi familia

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas	1
1. INTRODUCCIÓN	5
2. INFORME BIBLIOGRÁFICO	9
2.1. FAMILIAS DE PEROXIDASAS	11
2.1.1. CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL	11
2.1.2. CLASIFICACIÓN POR CONTENIDO EN IONES METÁLICOS	14
2.2. ISOENZIMAS Y LOCALIZACIÓN	15
2.3. ELEMENTOS ESTRUCTURALES	16
2.3.1. GRUPO HEMO	18
2.3.2. IONES CALCIO	21
2.3.3. GLICANOS	23
2.4. REACCIÓN CATALIZADA POR LAS PEROXIDASAS	25
2.5. FUNCIONALIDAD DE LAS PEROXIDASAS	28
2.5.1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS	28
2.5.1.1. Crecimiento celular	28
2.5.1.2. Lignificación y suberización	30
2.5.1.3. Mecanismos de defensa	31
2.5.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS	33
2.5.2.1. Electroodos enzimáticos	33
2.5.2.2. Síntesis de polímeros orgánicos	35
2.5.2.3. Decoloración de tintes sintéticos	36
2.5.2.4. Procesos de detoxificación de suelos y aguas	37
2.5.2.5. Aplicaciones analíticas: kits de diagnóstico	38
2.5.2.6. Inmunoensayos enzimáticos	38
2.5.2.7. Síntesis orgánica	39
2.6. ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS	41
2.6.1. FUERZAS QUE INTERVIENEN EN LA ESTABILIDAD PROTEICA	42
2.6.1.1. Entropía conformacional	42
2.6.1.2. Interacciones electrostáticas: pares iónicos y puentes salinos	42
2.6.1.3. Interacciones hidrofóbicas	43
2.6.1.4. Enlaces de hidrógeno y grupos polares internos	44
2.7. ESTABILIDAD DE LAS PEROXIDASAS	45
3. OBJETIVOS	51
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.1. MATERIALES Y APARATOS	57
4.2. REACTIVOS	59
4.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES	61
4.3.1. PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	61
4.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	66

4.3.2.1.	Análisis de la actividad enzimática	66
4.3.2.2.	Análisis del contenido proteico en solución	67
4.3.2.3.	Análisis de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida	68
4.3.2.4.	Determinación del pI	69
4.3.2.5.	Determinación del coeficiente de extinción	70
4.3.2.6.	Determinación del masa molecular / estado de agregación mediante cromatografía de exclusión molecular	72
4.3.2.7.	Análisis del estado de agregación mediante UCA	73
4.3.3.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	76
4.3.3.1.	Titulación proteica: desnaturalización inducida por el pH	76
4.3.3.2.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	77
4.3.3.2.1.	Instrumentación	77
4.3.3.2.2.	Experimento calorimétrico	79
4.3.3.2.3.	Análisis de los termogramas	80
4.3.3.2.3.1.	Desnaturalización térmica reversible	81
4.3.3.2.3.1.1.	Modelo de equilibrio de dos estados	81
4.3.3.2.3.1.2.	Modelo de equilibrio de varios estados	85
4.3.3.2.3.2.	Desnaturalización térmica irreversible	86
4.3.3.2.3.2.1.	Modelo de Lumry-Eyring	87
4.3.3.2.3.2.2.	Modelo simple de dos estados	89
4.3.3.3.	Desnaturalización inducida por agentes químicos	90
4.3.3.4.	Fluorescencia intrínseca de proteínas	91
4.3.3.5.	Dicroísmo circular (DC)	94
4.3.3.6.	Efecto de la fuerza iónica	96
4.3.4.	ESTUDIOS CINÉTICOS Y MECANISMO CATALÍTICO	97
4.3.4.1.	Estudio cinético de especificidad por sustrato	97
4.3.4.2.	Determinación del mecanismo catalítico y de sus parámetros cinéticos	98
4.3.4.3.	Inhibición competitiva por sustrato	101
4.3.4.4.	Determinación de las constantes microscópicas (k_1 y k_3) del mecanismo catalítico	102
4.3.4.5.	Inactivación por sustrato suicida (H_2O_2)	104
4.3.4.5.1.	Sensibilidad enzimática al sustrato suicida	105
4.3.4.5.2.	Cinética de inactivación	106
4.3.5.	CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LA RPTP	106
4.3.5.1.	Efecto del pH en los espectros de absorción de la RPTP	106
4.3.5.2.	Determinación de las características espectroscópicas de los compuestos I, II y III de la RPTP	106
4.3.6.	CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PROTEICA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X	107
4.3.6.1.	Obtención de cristales proteicos	107
4.3.6.2.	Difracción de Rayos X de los cristales de proteína: recogida de los datos cristalográficos	109
4.3.6.3.	Determinación de la estructura y refinado	111
4.3.7.	DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA RPTP	113
4.3.7.1.	Espectrometría de masas	113
4.3.7.1.1.	Espectrometría de masas en tándem	117
4.3.7.2.	Análisis del extremo N-terminal	117

4.3.7.3.	Digestión proteica	120
4.3.7.4.	Análisis de los péptidos tripticos	121
4.3.7.5.	Extracción de ARN de las hojas de la palmera real	122
4.3.7.6.	Transcripción inversa (RT)	123
4.3.7.7.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	124
4.3.7.8.	Diseños de <i>primers</i> o cebadores	127
4.3.7.9.	Clonación, expresión y secuenciación de fragmentos de ADN	129
4.3.8.	ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO ESTADÍSTICO (SCA)	132
5.	RESULTADOS	135
5.1.	SCREENING DE ACTIVIDAD PEROXIDASA EN DIFERENTES ESPECIES DE PALMAS	137
5.2.	PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (RPTP)	142
5.3.	CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	149
5.3.1.	DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	149
5.3.2.	DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	150
5.3.3.	DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	150
5.3.4.	DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA (UCA)	152
5.3.5.	DETERMINACIÓN DEL pI	153
5.3.6.	DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN	154
5.4.	ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	156
5.4.1.	TITULACIÓN PROTEICA: DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR EL pH	156
5.4.2.	DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA	158
5.4.2.1.	Análisis de la desnaturalización térmica por fluorescencia	158
5.4.2.2.	Análisis de la desnaturalización térmica por dicroísmo circular	159
5.4.2.3.	Análisis de la desnaturalización térmica mediante DSC	161
5.4.2.3.1.	Desnaturalización de la RPTP a pH 7,0	161
5.4.2.3.2.	Desnaturalización de la RPTP a pH 3,0	165
5.4.2.3.3.	Curvas de estabilidad de la RPTP a diferentes valores de pH	168
5.4.3.	DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA	169
5.4.3.1.	Equilibrio de sedimentación en presencia de GuHCl 6,0 M	172
5.4.4.	EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA ESTABILIDAD DE LA RPTP	173
5.5.	MECANISMO CATALÍTICO Y ESTUDIOS CINÉTICOS	174
5.5.1.	ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO	174
5.5.2.	MECANISMO CATALÍTICO Y CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS k_1 y k_3	176
5.5.2.1.	Determinación del mecanismo catalítico	176
5.5.2.2.	Cálculo de las constantes microscópicas k_1 y k_3	180
5.5.3.	ESTUDIOS DE INHIBICIÓN COMPETITIVA POR SUSTRATO	184
5.5.4.	INACTIVACIÓN POR SUSTRATO SUICIDA	186
5.5.4.1.	Sensibilidad enzimática al sustrato suicida	186
5.5.4.2.	Cinética de inactivación	188

5.6. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LA RPTP	190
5.6.1. EFECTO DEL pH EN EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN PROTEICO	190
5.6.2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS COMPUESTOS I, II Y III DE LA RPTP	194
5.6.2.1. Características espectroscópicas del Coll	194
5.6.2.2. Características espectroscópicas del Coll	195
5.6.2.3. Características espectroscópicas del Col	197
5.7. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR	199
5.8. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA RPTP	201
5.8.1. ANÁLISIS DEL EXTREMO N-TERMINAL	201
5.8.2. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS POR DIGESTIÓN TRÍPTICA DE LA RPTP MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	201
5.8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS TRÍPTICOS	203
5.8.4. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA RPTP MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	205
5.8.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICANOS	206
5.9. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PROTEICA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X	207
5.9.1. CRISTALES DE LA RPTP	207
5.9.2. DATOS CRISTALOGRAFICOS	208
5.9.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y REFINADO	210
5.9.4. DESCRIPCIÓN DE LA ESTRCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA RPTP	212
5.9.4.1. Estructura global	212
5.9.4.2. El centro activo	214
5.9.4.3. El canal de acceso del sustrato	217
5.9.4.4. El entorno del grupo hemo	219
5.9.4.5. El entorno de los átomos de calcio	221
5.9.4.6. La estructura de los carbohidratos	223
5.10. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO ESTADÍSTICO (SCA)	225
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	237
7. CONCLUSIONES	253
8. BIBLIOGRAFÍA	259
APÉNDICES	277
APÉNDICE I	279
APÉNDICE II	281

A	Absorbancia
A _R	Actividad residual
A ₀	Actividad inicial
A _t	Actividad final
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfúrico)
ACN	Acetonitrilo
AEDT	Ácido etildiaminotetracético
AH ₂	Cualquier sustrato reductor del ciclo catalítico de una enzima peroxidasa
AOPTP	Peroxidasa de palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>)
aPrx	Isoenzima aniónica de la peroxidasa de cacahuete
APXs	Ascorbato peroxidasa
α	Fracción de proteína en estado desnaturalizado
BCA	Bicarbonato amónico
BCPX	Peroxidasas catalasas de bacterias
BP	Peroxidasa de cebada
BP1	Isoenzima 1 de la peroxidasa de cebada
BSA	Albúmina de suero bovino
CcP	Citocromo c peroxidasa
CE	Palmera <i>Chamaerops excelsa</i>
CEP	Peroxidasa de las hojas de la palmera <i>Chamaerops excelsa</i>
cHRP	Isoenzima c de la peroxidasa de rábano
CID	Disociación inducida por colisión
CiP	<i>Coprinus cinereus</i> peroxidasa
Col	Compuesto I, primera forma enzimática intermedia de la peroxidasa
ColI	Compuesto II, segunda forma enzimática intermedia de la peroxidasa
ColII	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 en ocasiones aparece antes que el Col en el ciclo catalítico
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}	Capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado nativo
ΔC _p	Diferencia de capacidad calorífica entre los estados nativo y desnaturalizado de la macromolécula
ΔC _p ^m	Diferencia de capacidad calorífica a T _m
<C _p >	Exceso de capacidad calorífica
C _p	Capacidad calorífica de referencia
D	Proteína en estado desnaturalizado
DC	Dicroísmo circular
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNPT	Desoxinucleótidos trifosfato
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
ε	Coeficiente de extinción molar
[E]	Concentración de enzima en el medio de reacción
E _A	Energía de activación
E _a	Forma enzimática que retiene parte de su actividad

E_i	Forma enzimática inactiva
ESI	Electrospray
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
F_d	Fracción de proteína en estado desnaturalizado
Fuc	Fucosa
ΔG^{estad}	Energía de conservación de cada aminoácido
$\Delta\Delta G^{\text{estad}}$	Energía de acoplamiento estadístico
ΔG°	Energía libre de Gibbs de equilibrio
$\Delta G^\circ (\text{H}_2\text{O})$	Energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturalizante
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GuHCl	Hidrocloreuro de guanidina
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido etanosulfónico]
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ΔH	Entalpía calorimétrica, área comprendida entre la transición y la línea base
ΔH^{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
IAM	Iodoacetamida
IEF	Isoelectroenfoque
k_1	Constante cinética de formación del Col
k_2	Constante cinética de formación del Coll
k_3	Constante cinética de reducción del Coll
k_{cat}	Número de recambio o turnover
K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante de michaelis-menten
$\text{LB}_{\text{química}}$	Línea base química
LiP	Lignina peroxidasa
MAD	Dispersión anómala múltiple
MALDI	Ionización/desorción láser por matriz asistida
Man	Manosa
MCS	Sitios de clonación múltiple
MIR	Reemplazo isomorfo múltiple
MnP	Manganeso peroxidasa
MSA	Alineamiento de múltiples secuencias
N	Proteína en estado nativo
n	Número de subunidades que contiene una proteína
N-MePip	N-metilpiperidina
PANI	Polianilina
PC	Palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Palmera datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
PITC	Fenilisotiocianato
PNP	Peroxidasa de cacahuete
POX	Peroxidasa de trigo
PTH-AA	Feniltiohidantoina

<i>r</i>	Número de recambio
R	Parámetro que determina la bondad del proceso de refinamiento
R	Constante de los gases 8,31 J K ⁻¹ mol ⁻¹
R _f	Movilidad relativa
RP	Peroxidasa de arroz
RPTP	Peroxidasa de palma real (<i>Roystonea regia</i>)
RR	Palmera real (<i>Roystonea regia</i>)
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, partiendo de una molécula de ARN
Rz	Factor de Reinheitszahl (A_{403} / A_{280})
SBP	Peroxidasa de soja
SCA	Análisis de acoplamiento estadístico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SP	Peroxidasa de sorgo
SPC	Isoenzima catiónica de la peroxidasa de sorgo
TA	Temperatura ambiente
Tampón universal	CH ₃ COOH-H ₃ PO ₄ -H ₃ BO ₃ -NaOH
Taq polimerasa	Polimerasa del microorganismo <i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris carboxietil fosfina
TcPx	Peroxidasa de tabaco
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamonio
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 (<i>k</i>) toma el valor de 1 min ⁻¹
T _{1/2}	Temperatura a la que existe la misma cantidad de proteína en los estados nativo y desnaturalizado
T ₀	Temperatura de referencia
TOF	Tiempo de vuelo
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Proteína en estado desplegado
UCA	Ultracentrifugación analítica
u.r.	Unidades relativas
WF	Palmera Washingtonia (<i>Washingtonia filifera</i>)
Xyl	Xilosa

1. Introducción

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son unas enzimas, ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal, que 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. Las reacciones en las que están implicadas las peroxidasas son bisustrato y siguen un mecanismo *ping-pong*. Todas ellas se caracterizan por tener como grupo prostético un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado, que constituye el centro activo de la enzima. Estas enzimas se clasifican en peroxidasas de mamíferos, peroxidasas catalasas y superfamilia de peroxidasas de plantas. Welinder en 1992 hizo una clasificación interna diferenciando en la superfamilia de peroxidasas de plantas tres clases, en función de sus diferentes elementos estructurales. La clase I, compuesta por peroxidasas intracelulares de origen procariótico como ascorbato peroxidasas (APXs) y citocromo c peroxidasa (CcP); la clase II, compuesta por peroxidasas intracelulares de origen fúngico como lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) y la clase III, compuesta por peroxidasas secretadas por plantas superiores como peroxidasas de rábano picante (HRP), de cebada (BP), de cacahuete (PNP), de hojas de palma africana (AOPTP), de hojas de palma real (RPTP) y de semillas de soja (SBP), entre otras.

Las peroxidasas 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. Además de esta funcionalidad dentro de la planta, son unas enzimas que se utilizan ampliamente por la industria, siendo algunas de sus funciones: síntesis de polímeros orgánicos como polianilina (PANI), decoloración de tintes sintéticos, descontaminación y limpieza de aguas residuales y suelos, síntesis de fármacos orgánicos con alto rendimiento, electrodos enzimáticos, kits de diagnóstico e inmunoensayos enzimáticos. En todos estos procesos, la peroxidasa que se utiliza por excelencia es la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*), obtenida de sus raíces, además de la peroxidasa de soja (*Glycine max*), que presenta una mayor estabilidad.

Recientemente, la Comisión Científica de la Unión Europea ha definido a las peroxidasas 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 peroxidasas pueden sustituir ventajosamente a algunos 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 de papel durante su reciclaje y, también, al formaldehído (mutagénico y cancerígeno) que se utiliza en la fabricación de resinas fenólicas.

Se sabe desde los primeros estudios con peroxidases de plantas que son unas enzimas con una elevada estabilidad térmica, química y frente a los cambios de pH. La isoenzima c de la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) (cHRP) es estable en el intervalo de pH comprendido entre 2,2 y 12,0. A pH 2,5, la enzima posee el 50% de su actividad y, a pH 3,0, sus parámetros en la transición térmica son $E_A = 155,9 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T^* = 344,4 \pm 0,5 \text{ K}$ (Pina *et al.*, 2001). La isoenzima aniónica de la peroxidasa de cacahuete (*Arachis hypogaea*) (aPrx) es menos estable que la anterior, siendo estable en el intervalo de pH comprendido entre 3,0 y 11,0 y siendo los parámetros de su transición térmica a pH 3,0, $E_A = 274,9 \pm 3,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T^* = 315,9 \pm 0,2 \text{ K}$ (Zamorano *et al.*, 2004). El estudio de peroxidases de diferentes fuentes vegetales se sigue llevando a cabo, pero hasta el día de hoy no se han encontrado peroxidases más estables que las procedentes de las hojas de plantas tropicales tales como las palmeras. La primera que se estudió fue la peroxidasa de palma africana (*Elaeis guineensis*), estable en el margen de pH comprendido entre 2,0 y 12,0 y con unos parámetros de su transición térmica a pH 3,0 $E_A = 426,8 \pm 1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T^* = 347,5 \pm 0,3 \text{ K}$ (Rodríguez *et al.*, 2002).

Aunque muchas son las peroxidases de clase III caracterizadas bioquímicamente, son pocas las que tienen una estructura tridimensional conocida. Hasta el momento, tan sólo se conoce la estructura cristalográfica de la peroxidasa de rábano (Gajhede *et al.*, 1997), la de cacahuete (Schuller *et al.*, 1996) y la de cebada (Henriksen *et al.*, 1998). 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 peroxidases de clase III y la escasa homología de las peroxidases con otros grupos proteicos.

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 peroxidases 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 peroxidases de palmas.

2. Informe Bibliográfico

2.1. FAMILIAS DE PEROXIDASAS

Las peroxidasas se pueden agrupar atendiendo a dos clasificaciones. La primera las divide en función de su estructura y la segunda lo hace en función de su secuencia de aminoácidos y de su capacidad para unirse con diferentes iones metálicos (Smith y Veitch, 1998).

2.1.1. CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL

Las peroxidasas se dividen en tres grandes superfamilias:

-Superfamilia de peroxidasas animales: Han sido caracterizadas estructuralmente la mieloperoxidasa (Zeng y Fenna, 1992), la eosinófilo peroxidasa (Bolscher *et al.*, 1984) y la prostaglandina sintetasa H₂ (Merlie *et al.*, 1988; Picot *et al.*, 1994), entre otras. Todas ellas son enzimas formadas por varias subunidades, iguales o no.

-Superfamilia de catalasas: Se engloban dentro de las peroxidasas ya que poseen un grupo hemo e intervienen en la misma reacción catalítica. Todas ellas son enzimas tetraméricas, condición necesaria para que sean funcionales. Se ha caracterizado estructuralmente la catalasa de hígado de buey (Murthy *et al.*, 1981), entre otras.

-Superfamilia de peroxidasas de plantas: Se divide en tres grandes grupos. Esta clasificación hecha por Welinder en 1992, divide las peroxidasas en función de diferentes características estructurales (Tabla I). Normalmente las peroxidasas presentan una estructura secundaria mayoritaria de α -hélices, separadas por fragmentos de longitud variable. Dentro de esta estructura se ha observado que en todas las peroxidasas de plantas conocidas hasta el momento hay 9 residuos invariables y 22 casi invariables. Si usamos la numeración de la citocromo *c* peroxidasa de levadura (CcP), estos residuos son los siguientes: Arg48 e His52 en la hélice B, y Asn82, los tres están en el cavidad distal del grupo hemo. Val169 e His175 en la hélice F, y Asp235, están en la cavidad proximal. Asp106 de la hélice D. Gly129 y Arg130 forman un puente salino. His175 es el quinto ligando del hierro hémico y está unido mediante un enlace de hidrógeno al Asp235.

Las peroxidasas vegetales se clasifican en:

Clase I. Peroxidasas de origen procariótico. Implicadas en los procesos de detoxificación de la planta (eliminación de peróxido de hidrógeno). Entre ellas cabe destacar la CcP de levadura, la APXs citosólica y del cloroplasto y las peroxidasas-catalasas bacterianas (BCPX). Estas peroxidasas no están glicosiladas, no

tienen puentes disulfuro, ni iones Ca^{2+} , ni señales peptídicas para la secreción. El Trp191 de la CcP de levadura está conservado en todas las peroxidasas de clase I. Una diferencia entre las APXs y la CcP es que ésta tiene un sitio de unión metálico, ocupado por K^+ y cerca del residuo de Trp proximal.

Las APXs (EC 1.11.1.11) se encuentran en el cloroplasto, solubles en el citosol, y en nódulos de las raíces de las plantas. Su pH óptimo de actividad oscila entre 7,5 y 8,0. Algunas son diméricas como la APX citosólica de guisante con 249 residuos (formada por dos monómeros unidos no covalentemente), en cambio la APX del cloroplasto de la misma planta es monomérica.

Las BCPX se aislaron por primera vez de *E. coli* en 1979. Se encontraron dos isoenzimas, la hidroperoxidasa I (HPI), un tetrámero de 337 kDa con dos grupos hemo y la hidroperoxidasa II (HP II). Su pH óptimo de actividad está comprendido entre 6,0 y 6,5. Se clasifican dentro de este grupo de peroxidasas y no dentro del grupo de catalasas por su alta homología con la CcP y las APXs. Las peroxidasas de plantas, hongos y levaduras, normalmente son monómeros que contienen entre 290 y 350 residuos, en cambio las BCPX tienen 730 residuos. Su masa molecular está duplicada y ello es una causa de su duplicación genética.

Clase II. Peroxidasas secretadas por hongos. Implicadas en procesos de degradación de la lignina. Entre ellas, cabe citar la LiP y la MnP de *Phanerochaete chrysosporium* y la *Coprinus cinereus* peroxidasa (CiP).

Este grupo enzimático tiene una señal peptídica para la secreción a través del retículo endoplasmático cerca del extremo N-terminal. Poseen un 5% de carbohidratos, dos iones Ca^{2+} y cuatro puentes disulfuro altamente conservados. El residuo de Trp proximal presente en las peroxidasas de clase I es reemplazado por Phe o Leu en las peroxidasas de clase II. Uno de los sitios de unión al Ca^{2+} , en estas peroxidasas de clase II, corresponde al sitio de unión al K^+ en las APXs.

La LiP presenta al menos 8 isoenzimas. El máximo de absorción de la enzima nativa se encuentra a 407 nm, su coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda es de $133 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y posee un valor del parámetro de Reinheitszahl ($R_z = A_{\text{Banda Soret}} / A_{280}$) de 4,97. Tiene 49 residuos extras en el extremo C-terminal con respecto a la CcP.

La MnP es una enzima monomérica de 46 kDa, con cuatro iones Ca^{2+} y cinco enlaces disulfuro por molécula. Los residuos Asp179, Glu35, Glu39, el propionato del grupo hemo y dos moléculas de H_2O son los ligandos de unión al Mn^{2+} .

La CiP es más estable que las anteriores y presenta un sitio activo más accesible. Es una proteína ácida con un pI de 3,5 y con dos azúcares unidos covalentemente, al igual que la LiP tiene 50 residuos adicionales en el extremo C-terminal.

Clase III. Peroxidasas secretadas por plantas. Dentro de este grupo, la enzima más ampliamente estudiada es la isoenzima *c* de la peroxidasa de rábano (cHRP), pero también se han estudiado enzimas de otras especies vegetales tales como tomate, cebada, trigo, tabaco, nabo, cacahuete, y diferentes especies de palmeras.

Estructuralmente estas enzimas (EC 1.11.1.7) poseen dos iones Ca^{2+} , una señal peptídica en el extremo N-terminal para la secreción, cuatro puentes disulfuro conservados, en sitios distintos a los que aparecen en las peroxidasas de clase II, un conjunto de hélices extra que juegan un papel muy importante en el acceso al centro activo y un grado de glicosilación comprendido entre el 0 y el 25%. Algunas de ellas tienen un propéptido en el extremo C-terminal que las dirige hacia las vacuolas.

La peroxidasa de cacahuete (PNP) presenta dos isoenzimas, una aniónica (aPrx) y otra catiónica (cPrx). Ésta presenta un 15% de glicosilación, un grupo hemo por molécula de enzima y dos iones Ca^{2+} . Presenta un máximo en el espectro UV-Visible a 405 nm (banda Soret) con un ϵ_{405} de $112 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La aPrx posee dos cadenas de glicanos de longitud variable, en cambio la cPrx tiene cuatro cadenas. Estructuralmente estas peroxidasas de clase III tienen una serie de hélices extra que no aparecen en las peroxidasas de otras clases. En el caso concreto de la cPrx, la hélice B' desaparece, en cambio, aparecen tres nuevas hélices de pequeño tamaño adicionales, D', situada entre D y E, además de F' y F'', situadas entre F y G. Los sitios de unión de los átomos metálicos varían de unas peroxidasas a otras. Los residuos del sitio distal están bastante conservados y son His42, Arg38, Phe41 y Asn70. La His169 es el ligando proximal en la cPrx.

En la planta de la cebada se ha encontrado una sola isoenzima (BP1), que tiene dos glicofomas. Presenta un 50% de homología con otras peroxidasas de plantas.

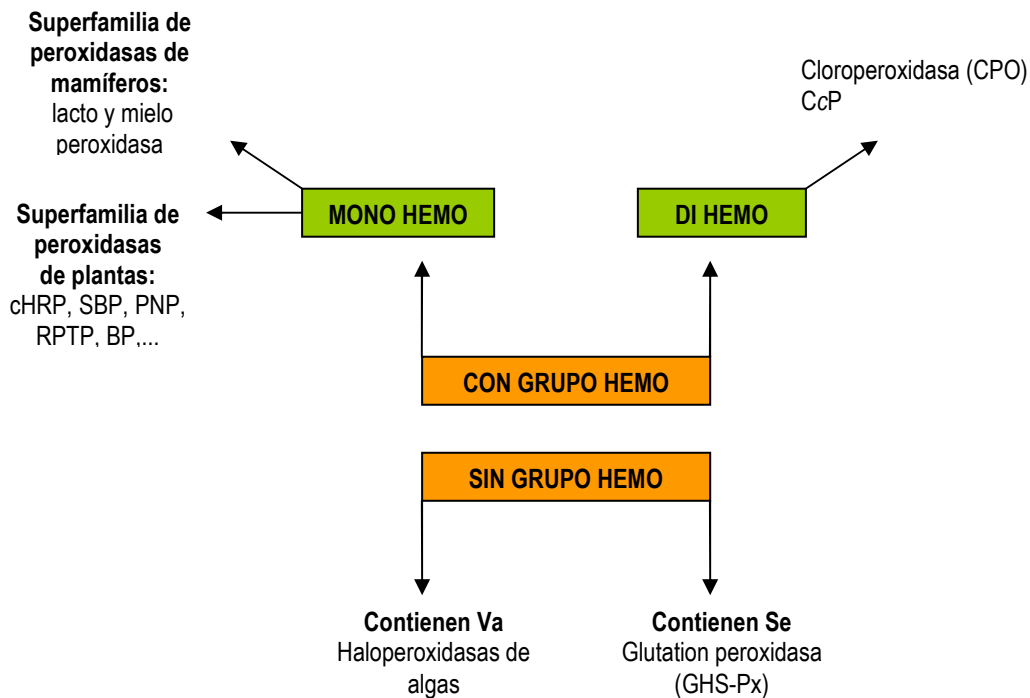
En la planta del tabaco se han encontrado 12 isoenzimas (TcPX), entre ellas las catiónicas (pI entre 8 y 11), que se encuentran en la vacuola y oxidan el ácido indolacético (IAA) en ausencia de H_2O_2 , las moderadamente aniónicas (pI entre 4,5 y 6,5), que están muy expresadas en tejidos dañados, y las altamente aniónicas (pI entre 3,5 y 4,0), que se encuentran asociadas a la pared celular.

La peroxidasa de *Arabidopsis thaliana* presenta distintas isoenzimas, una de las más conocidas denominada *Arabidopsis thaliana* peroxidasa A2 que tiene un pl de 3,5, 30 residuos que forman un péptido señal y 305 residuos de naturaleza proteica. Esta enzima carece del residuo Asn unido a la His del sitio distal y, en cambio, posee un sitio de N-glicosilación en la entrada del canal que permite el acceso al centro activo (grupo hemo).

Tabla I. Características de las distintas clases de peroxidasas de plantas (Welinder, 1992).

Superfamilia de peroxidasas de plantas			
Elementos	Clase I	Clase II	Clase III
Grupo hemo	Si	Si	Si
Carbohidratos	No	0-5%	0-25%
Iones metálicos	No	Ca ²⁺ (2)	Ca ²⁺ (2)
Puentes disulfuro	No	4	4
Señal peptídica de secreción	No	En el extremo N-terminal	En el extremo N-terminal
Propéptidos en el extremo C-terminal	No	No	Si
Hélices extra	B'entre B-C	B'entre B-C	D'entre D-E F' y F'' entre F-G
Ejemplos	CcP, APXs, BCPX	LiP, MnP, CiP	cHRP, PNP, BP1, TcPX, RPPX, AOPPX

2.1.2. CLASIFICACIÓN POR CONTENIDO DE IONES METÁLICOS



Esquema 1. Clasificación de las peroxidasas en función de la presencia de cationes metálicas en su estructura (Smith y Veitch, 1998).

2.2. ISOENZIMAS Y LOCALIZACIÓN

Las peroxidases de clase III se pueden encontrar en distintas partes dentro de la planta. La mayor fuente de esta enzima son las raíces del rábano picante (*Armoracia rusticana*), pero también las semillas (peroxidases de soja, arroz, alforfón, trigo,...) y las hojas (peroxidases de palma) de una gran variedad de especies vegetales, son fuentes importantes de peroxidases.

Los organismos sintetizan enzimas en múltiples formas, denominadas isoenzimas, para catalizar la misma reacción bioquímica. Presentan diferentes propiedades catalíticas, cinéticas, también diferencias en la cadena polipeptídica, en la carga eléctrica y se localizan en distintos lugares dentro de la célula.

El primero que habló de isoenzimas fue Theorell en 1942 (Theorell, 1942), quién aisló dos isoenzimas de la peroxidasa de rábano. En 1958 Paul (Paul, 1958, 1970) aisló cinco formas peroxidásicas del rábano llamadas A, B, C, D y E, y, posteriormente, de la isoenzima A se separaron tres fracciones (A1, A2 y A3) (Shanon *et al.*, 1966). Se han encontrado isoenzimas de peroxidases en una gran cantidad de especies vegetales.

Las isoenzimas de peroxidases se clasifican en tres grupos:

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

Las isoenzimas que pertenecen al mismo grupo normalmente tienen estructuras primarias muy similares y a veces sin cambios. Son más significativas las diferencias entre isoenzimas que pertenecen a distintos grupos, no sólo en la cadena polipeptídica, sino también en las propiedades catalíticas. En la HRP hay isoenzimas aniónicas (A1 y A2), ligeramente aniónicas (A3) y catiónicas (B y C). Los mapas peptídicos tras la digestión con tripsina revelan que las isoenzimas A1 y A2 son indistinguibles, que lo mismo ocurre con las isoenzimas B y C, en cambio la isoenzima A3 tiene un mapa peptídico único y diferente del resto (Shih *et al.*, 1971).

Dentro de la célula existe una compartimentación isoenzimática, la cual está relacionada con la funcionalidad de la enzima. Las isoenzimas aniónicas se encuentran normalmente solubles en el citoplasma,

por lo que intervienen en las reacciones enzimáticas que en él se desarrollan. Sin embargo, las isoenzimas catiónicas se encuentran en la pared celular y están implicadas en el control de su crecimiento.

La PNP, tiene dos isoenzimas, una catiónica (cPrx, $pI = 8,9$) y otra aniónica (aPrx, $pI = 4,5$). Entre ambas isoenzimas existen diferencias en su contenido de aminoácidos, pero no se observan diferencias estructurales ni en sus propiedades físico-químicas y catalíticas. Existe una variación en la banda de absorción del grupo hemo (banda Soret), la cual presenta su máximo a 405 y 408 nm para las isoenzimas cPrx y aPrx, respectivamente (Hu *et al.*, 1990). Estas dos isoenzimas han sido localizadas en el aparato de Golgi, amiloplastos y citoplasma y tan sólo la cPrx se ha encontrado en la pared celular. La existencia de peroxidasas en los amiloplastos está relacionada con la degradación de los complejos de clorofila a/b (Hu *et al.*, 1989).

En las semillas de cebada existen dos isoenzimas de peroxidasa, la BP1a, que está glicosilada en la Asn300, y la BP1b que no presenta glicanos.

La peroxidasa de sorgo (SP) presenta cuatro isoenzimas catiónicas, SPC1, SPC2, SPC3 y SPC4, esta última tiene dos glicofomas denominadas I y II, las cuales tan sólo presentan diferencias en el contenido o posición de sus azúcares.

2.3. ELEMENTOS ESTRUCTURALES

El número de estructuras cristalinas, resueltas mediante difracción de Rayos X, es pequeño (Tabla II). Un obstáculo muy claro para llevar a cabo dicha cristalización es el grado de glicosilación de este grupo de enzimas, problema que actualmente se ha resuelto aplicando técnicas de Biología Molecular, donde se expresa la proteína en un sistema adecuado y se obtiene su cadena polipeptídica sin azúcares. De este modo, las proteínas suelen difractar bien.

Las peroxidasas de plantas poseen una cadena polipeptídica de unos 300 aminoácidos, un centro activo en el se encuentra como grupo prostético, un grupo hemo b (protoporfirina IX) al que está coordinado el catión metálico Fe^{3+} , dos iones Ca^{2+} , cuatro puentes disulfuro invariantes entre Cys que se encuentran en las posiciones 11-91, 44-49, 97-301 y 177-209 y son intracatenarios en la cHRP (Shih *et al.*, 1971) (la numeración se refiere a la cHRP, para otras peroxidasas cambia), un puente salino entre residuos invariantes de Asp y Arg (Asp99 y Arg123 en el caso de la cHRP), y una serie de sitios de N-glicosilación, los cuales se encuentran en la secuencia consenso N-X-S(T), donde X puede ser cualquier residuo. Estos sitios

de glicosilación se sitúan en la superficie de giros que conectan α -hélices y siempre hacia el exterior de la molécula. La mayor parte de las peroxidasas presentan glicanos, cuyo porcentaje oscila entre el 0 y el 25 %.

Tabla II. Peroxidasas de plantas con estructura tridimensional conocida. Todas las estructuras corresponden a la enzima en estado nativo. R (resolución) y PDB (Base de datos *Protein data bank*). Las referencias son: [1] Ostergaard *et al.*, 2000; [2] Mirza *et al.*, 2000; [3] Schuller *et al.*, 1996; [4] Gajhede *et al.*, 1997; [5] Berglund *et al.*, 2002; [6] Henriksen *et al.*, 1999; [7] Henriksen *et al.*, 2001 y [8] Henriksen *et al.*, 1998.

Especie	Nombre Común	Isoenzima	Superficie	R (Å)	Nº residuos	Grupo Espacial	Ángulos	Longitud de enlace (Å)	PDB	Ref.
<i>Arabidopsis Thaliana</i>	Berro	AtP A2	Recombinante	1,45	306	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 46,16 b = 74,60 c = 80,45	1PA2	[1]
		AtP N		1,90	300	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 72,99 b = 87,46 c = 91,37	1QGJ	[2]
<i>Arachis hypogaea</i>	Cacahuete	cPrx	Cultivo celular	2,70	294	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 48,10 b = 97,20 c = 146,20	1SCH	[3]
<i>Armoracia rusticana</i>	Rábano	cHRP	Recombinante	2,15	306	P 3 ₁ 1 2	$\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$	a = 159,17 b = 159,17 c = 114,27	1ATJ	[4]
				1,60	308	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 40,35 b = 67,77 c = 117,26	1H5A	[5]
				2,00	308	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 40,30 b = 67,27 c = 117,65	6ATJ	[6]
				1,47	308	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 40,87 b = 66,93 c = 119,02	7ATJ	[6]
<i>Glycine max</i>	Soja	SBP	Recombinante	2,80	304	P 3 ₁	$\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$	a = 106,45 b = 106,45 c = 105,00	1FHF	[7]
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	BP1	Semillas	1,90	309	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a = 71,92 b = 105,06 c = 40,95	1BGP	[8]

La estructura secundaria es tipo α , ya que está formada en su mayor parte por α -hélices, aunque existe una pequeña región formada por hojas β . Las ocho α -hélices (A-J) ocupan posiciones topológicas muy similares en todas las peroxidasas de plantas. Existe una diferencia entre las peroxidasas de clase I y II, y las peroxidasas de clase III, y es que, en éstas últimas hay dos α -hélices adicionales (F' y F'') que juegan un papel muy importante en el plegamiento proteico y presentan una gran variabilidad tanto en su secuencia como en el número de aminoácidos que poseen. En el mantenimiento de la integridad estructural de esta región interviene el enlace disulfuro formado entre las Cys 177 y 209. En algunas peroxidasas, se ha observado que distintos residuos de la hélice F' juegan un papel muy importante en el acceso y enlace del sustrato al centro activo.

Las peroxidasas poseen dos dominios, el distal y el proximal, entre los cuales se encuentra situado el grupo hemo. También es importante destacar la presencia de un aminoácido Phe179 en el caso de la cHRP, muy conservado en todas las peroxidasas, y que sirve para enlazar sustratos aromáticos a la proteína.

A continuación se citarán las principales características de los elementos más representativos de las peroxidasas de clase III.

2.3.1. GRUPO HEMO

Las peroxidasas de plantas tienen como grupo prostético un grupo hemo tipo b (Fig. 1), que recibe el nombre de ferriprotoporfirina IX y contiene como átomo metálico Fe (III). Está formado por cuatro anillos pirrólicos, unidos por puentes meténicos (Adak y Banerjee, 1998), y el centro de esta estructura está ocupado por el átomo metálico. Tiene ocho cadenas laterales, cuatro metilos en posiciones 1, 3, 5 y 8, dos vinilos en posición 2 y 4 y dos propionatos situados en las posiciones 6 y 7. Los átomos de carbono meténicos reciben la nomenclatura α , β , γ y δ , de manera que el C_{α} se sitúa entre las cadenas laterales 2 y 3. El grupo ferriprotoporfirina IX recibe el nombre de ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfina-6,7-dipropiónico. El grupo hemo fue sintetizado por primera vez por Hans Fischer. Inicialmente el átomo de Fe está tetracoordinado al unirse con cuatro N pirrólicos, desplazando dos átomos de hidrógeno, por ello la carga neta del grupo hemo sería +1. En las peroxidasas, el átomo metálico está pentacoordinado, la quinta posición de coordinación la ocupa una cadena lateral proximal que pertenece a un residuo de His (grupo imidazólico). Esto hace que la reacción catalítica ocurra en la cara distal. La unión del grupo hemo a la proteína se produce a través de la quinta posición de coordinación y, además, existen otras interacciones como enlaces de hidrógeno que se forman entre las cadenas laterales propionato y residuos vecinos, e interacciones hidrofóbicas entre el anillo porfirina y aminoácidos hidrofóbicos.

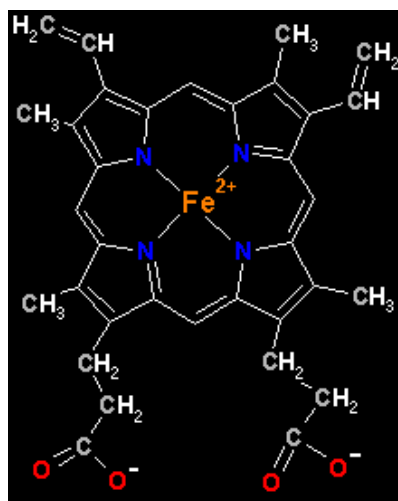


Figura 1. Estructura del grupo hemo (www. Biomodel.uha.es).

Los residuos implicados en el mantenimiento de la estructura del grupo hemo y en la reacción enzimática están conservados en todas las peroxidasas de clase III y son los siguientes: en el dominio proximal se encuentra la His169 (es el ligando axial del hierro hémico) y el Asp238, residuo en el que su grupo carboxilato se une mediante enlace de hidrógeno al N δ 1 de la His proximal. En el dominio distal del grupo hemo, los residuos más importantes son Arg38, His42 y Asn70, esta última se une a la His42 por formación de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno carboxílico de la cadena lateral del primero y un H del segundo N δ 1H. La presencia de las parejas de residuos His-Asn e His-Asp en los dominios distal y proximal, respectivamente, es una evidencia de la duplicación génica en las peroxidasas de plantas (Welinder y Gajhede, 1993).

La His proximal que ocupa la quinta posición de coordinación tiene carácter aniónico, debido a la existencia de un enlace de hidrógeno entre el N ϵ 2 del residuo His y un residuo de Asp, enlace que está completamente conservado. Esta propiedad del ligando axial contribuye al bajo y negativo potencial de reducción del hierro, lo cual establece un alto estado de oxidación. Algunos potenciales de reducción de peroxidasas son de -278 mV (cHRP) (Makino *et al.*, 1976) y -90 mV (MnP) (Millis *et al.*, 1989), regulados por el estado del ligando axial del grupo hemo y por la longitud del enlace Fe- N ϵ 2. La His proximal pertenece a una hélice F 3₁₀, que puede estar más o menos cerca del grupo hemo, lo cual depende de la formación de un enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos de Ser177 y Asp201. Este enlace aleja la hélice F del grupo hemo, lo cual se ha observado en LiP y MnP. En cambio, no existe en CcP porque el residuo de Ser177 es sustituido por Ala.

En el sitio proximal hay un aminoácido aromático presente, Trp en peroxidasas de clase I y Phe en peroxidasas de clase II y III. Mientras que el Trp es el lugar donde se forma el radical catiónico del compuesto I (Col), en el caso de la Phe tiene un potencial de reducción tan alto que no puede ser oxidado por el peróxido de hidrógeno y, por ello, no está envuelto en la formación del radical catiónico. En las peroxidasas de clase II y III, la formación de este radical está localizado en el centro del grupo hemo (Banci, 1997).

Se ha observado que mutaciones en residuos del sitio proximal modifican las características del sitio distal. Se han creado mutantes de MnP en los que se ha modificado Asp242Glu, -Ser y Phe190Val, -Leu. Estas mutaciones alteran la coordinación del hierro hémico, favoreciendo la formación de un complejo bishistidina, lo que indica que la desprotonación de un grupo en el dominio distal induce un movimiento de la hélice B, hélice que contiene la His46 que se encuentra en la posición adecuada para coordinarse con el hierro. Este movimiento de la hélice B produce también un desplazamiento del Asp47, residuo adyacente a

la His distal, y uno de los ligandos del ión Ca^{2+} , por lo que tal movimiento reduce la afinidad por este ión (Banci *et al.*, 1999).

La cavidad distal es el sitio de interacción con el peróxido de hidrógeno y está caracterizado por dos residuos completamente invariantes que son la His y la Arg distal (Welinder, 1992), generando un hueco hidrofílico. Cuando la His axial se une como quinto ligando al hierro hémico, empuja al átomo metálico fuera del plano hémico, pudiéndose unir un sexto ligando axial al átomo de Fe, como ocurre en el caso de la metmioglobina. En el caso de las peroxidasas no ocurre esto porque en la cavidad hidrofílica generada por los anteriores residuos se forma una red de moléculas de agua que forman varios enlaces de hidrógeno y previenen la coordinación de una molécula de agua como sexto ligando.

Los residuos distales His y Arg tienen una gran implicación en la formación y estabilización del Col. La molécula de H_2O_2 transfiere un protón a la His distal, desprotonándose cuando la enzima es activa. Esta conformación es estable por la formación del enlace de hidrógeno entre el $\text{N}_\epsilon 2$ de la His distal y el oxígeno de la cadena lateral de Asn84, formando este residuo, además, un enlace de hidrógeno con Glu78. Estos dos residuos están muy conservados en todas las peroxidasas.

Un mecanismo catalítico en el que se explica el papel de las cadenas laterales de los residuos His y Arg distales fue propuesto en 1980 (Poulos y Kraut, 1980). Un átomo de N de la cadena lateral de la His $\text{N}_\epsilon 2$ actúa como un aceptor de protones, de manera que el peróxido de hidrógeno se enlaza como sexto ligando al átomo de hierro hémico. La cadena lateral del residuo Arg estabiliza la carga durante la formación del Col. Si se observa la estructura cristalina del Col en la cHRP se ve que el oxígeno ferrilo se enlaza mediante puente de hidrógeno al átomo $\text{N}_\epsilon \text{H}$ de la Arg38 y a una molécula de agua, que a su vez se enlaza mediante la misma interacción a la Arg38 y la His42 (Filizola y Loew, 2000).

Se ha observado por cristalografía de Rayos X que en el sitio activo las peroxidasas tienen cuatro moléculas de agua invariantes, tres de ellas presentes en la cavidad distal, unidas mediante enlaces de hidrógeno a los residuos hidrofílicos y formando una red muy densa. La otra molécula de agua se encuentra en la cavidad proximal, unida mediante enlace de hidrógeno al residuo invariante de Asp. Estas moléculas son bastante rígidas.

Las peroxidasas intervienen en múltiples reacciones, y se ha observado que la formación del Col es mucho más rápida cuando se usa una peroxidasa que cuando se utiliza otra hemoproteína. La diferente velocidad de reacción se debe a las distintas características estructurales del grupo prostético. La peroxidasa reacciona rápidamente con H_2O_2 ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Loo y Erman, 1975) pero la metmioglobina reacciona con

este sustrato a menor velocidad ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Yonetani y Schleyer, 1966). Esto se debe al residuo His distal invariante que está localizado cerca del grupo hemo y que sirve como catalizador ácido-base en la reacción con peróxido de hidrógeno (Poulos y Kraut, 1980). Se ha sustituido el residuo His distal por Leu en CcP (Erman *et al.*, 1993) y por Ala o Val en cHRP (Newmyer y Demontellano, 1995), observándose que la velocidad de formación del Col se reduce de 5 a 6 veces. Por ello, la His distal es uno de los residuos más importantes en el ciclo catalítico (Nagano *et al.*, 1996).

En el entorno del grupo hemo existe un enlace de hidrógeno altamente conservado en muchas peroxidasas de plantas y hongos entre la His distal y un residuo de Asn, aminoácido un poco alejado de la vecindad inmediata del grupo hemo (Asn70). Se han hecho estudios de mutagénesis en los que se ha sustituido el residuo Asn70 por Val y también por Asp. En estos casos, las velocidades de formación y reducción del Col, además de la velocidad de reducción del compuesto II (Coll), se han reducido 10, 15 y 12 veces, respectivamente, ya que se evita la formación del enlace de hidrógeno con el residuo de His distal, y este enlace es necesario para la reacción catalítica (Nagano *et al.*, 1996). Los mutantes de Arg38 por Ala o Leu disminuyen la velocidad de formación del Col pero no tanto como lo hacen los de His (Rodríguez-López *et al.*, 1996). Se ha observado al sustituir Arg38 por un residuo apolar, como la Leu en cHRP, que se forma un compuesto anterior al Col llamado compuesto 0 (Fe(III)-OOH), ya que la cadena lateral de la Leu dificulta la ruptura del enlace O-O, generando, por tanto, ese compuesto intermedio (Rodríguez-López *et al.*, 2001). Se han creado mutantes de CiP donde se ha cambiado la Arg51 por Gln, -Asn, -Leu y -Lys, observándose que la carga de la Arg es esencial para desprotonar la His, que la formación del enlace de hidrógeno contribuye en gran medida en la formación y estabilidad de Col, y que la estabilidad térmica y frente al pH se reduce significativamente en todos los mutantes (Schiodt *et al.*, 2007). Otro enlace de hidrógeno, altamente conservado en muchas peroxidasas, es el que se forma entre la Asn70 y el Glu64, numeración de la cHRP.

2.3.2. IONES CALCIO

Las peroxidasas de las clases II y III tienen dos iones de Ca^{2+} que forman parte de su estructura (Welinder, 1992). Los sitios de unión de estos iones metálicos están altamente conservados. Hay un ión metálico en el dominio distal y otro en el dominio proximal del plano hémico. En el dominio proximal, el átomo de Ca^{2+} interacciona con ocho átomos de oxígeno del esqueleto proteico y de las cadenas laterales de algunos aminoácidos. En LiP, interacciona con Ser177, Asp194, Asp196, Thr199 y Asp201, residuos que están conservados en peroxidasas de hongos. En las peroxidasas de plantas, el Asp194 corresponde al Asp193. Este ión Ca^{2+} no es accesible a ningún solvente, ya que se encuentra en una cavidad hermética. En el dominio distal, el átomo metálico está unido a siete átomos de oxígeno de cadenas laterales y del

esqueleto proteico, tales como la unión con Gly66-Ser70 (Gly66, Asp68 y Ser70), Asp48 y dos moléculas de H₂O. Este ión metálico es más accesible a los solventes. Ambos iones metálicos son responsables del mantenimiento de la estructura del centro activo y, por tanto, de la actividad catalítica. Hay que tener en cuenta que un ligando del átomo metálico en ambos dominios es el residuo siguiente al residuo His.

Inicialmente, se estudiaron las propiedades de la HRP, de sus isoenzimas A y C, en función de la presencia y ausencia de átomos metálicos (Haschke y Friedhoff, 1978). Las isoenzimas A y C de la HRP poseen 1,4 y 2,0 moles de Ca²⁺/mol de enzima, respectivamente. Se retiró el Ca²⁺ proteico con un tratamiento con hidrocloreto de guanidina (GuHCl) y ácido etilendiaminotetracético (AEDT), y, posteriormente, se intentó restituir. Al eliminar el Ca²⁺, las actividades enzimáticas de las isoenzimas A y C se reducían al 15 y 40%, respectivamente. Al restituirlo en el caso de la isoenzima A, no había aumento de la actividad, en cambio en la isoenzima C la actividad alcanzaba el 70%. También se observó una reducción de la estabilidad térmica en ausencia de ión metálico, concluyéndose, por ello, que el ión metálico contribuye al mantenimiento de la estructura proteica. Un aumento de Ca²⁺ en el medio celular aumenta la actividad enzimática, influyendo más en la biosíntesis proteica que en el transporte (Hu et al., 1987). Los iones metálicos provocan la conformación activa de las peroxidasas, ya que mantienen la estructura proteica en el entorno del grupo hemo. Asimismo, se han observado variaciones espectrales (en DC y UV-Visible) de peroxidasas en ausencia de Ca²⁺ (Rodríguez-Marañón *et al.*, 1993). Se ha sustituido el Ca²⁺ por otros cationes metálicos, observándose que si se sustituye por un catión de radio iónico similar, como el Cd²⁺ (0,97 Å, el Ca²⁺ tiene un radio de 0,99 Å), se puede recuperar la actividad enzimática. Sin embargo, si se sustituye por otros iones, tales como Mg²⁺ (0,65 Å), Hg²⁺ (1,10 Å) o Pb²⁺ (1,20 Å), no se recupera la actividad enzimática porque estos iones no pueden sustituir al átomo de calcio. Por tanto, el enlace del Ca²⁺ en las peroxidasas es bastante específico (van Huystee *et al.*, 1992; Xu y van Huystee, 1993). Como la eliminación de iones Ca²⁺ es sencilla, esto indica que se sitúan en la periferia de la estructura proteica, y que están débilmente enlazados, lo que sugiere que interaccionan con el radical fenoxi de la tirosina en vez de con el grupo carboxilato de los ácidos glutámico y aspártico, ya que el enlace del metal con estos últimos es mucho más fuerte (Welinder, 1985).

Estudios estructurales de ¹H-RMN indican cómo afecta el catión metálico a la cavidad del grupo hemo (Barber *et al.*, 1995). En la LiP, se observa por cristalografía de Rayos X que los dos iones Ca²⁺ se coordinan con residuos cercanos al extremo C-terminal de hélices proximales y distales. Los iones tienen dos sitios de unión independiente pero con una afinidad muy parecida, siendo posible que un sitio contribuya más al mantenimiento estructural y otro a la actividad enzimática. Los átomos metálicos se encuentran a una distancia diferente del grupo hemo, el proximal a 13 Å y el distal a 16 Å. Se observa una misma respuesta a

la unión con el átomo metálico de los residuos de His42 y 169, residuos en lados opuestos del anillo de porfirina, siendo la distancia $\text{Ca}^{2+}(\text{proximal})\text{-His169}(\text{C}\beta)$ 8 Å y la distancia $\text{Ca}^{2+}(\text{proximal})\text{-His42}$ 19 Å. Si se mide desde el Ca^{2+} distal, la situación se invierte. Los enlaces metálicos afectan a estos residuos y, por lo tanto, afectan las caras proximal y distal del grupo hemo. La unión de los átomos metálicos genera una reorientación de las hélices distal y proximal con respecto al grupo hemo.

Una gran variedad de cationes divalentes actúan como activadores o inhibidores enzimáticos. Estos cationes pueden actuar como efectores alostéricos tomando parte en la reacción catalítica o manteniendo en la proteína la conformación adecuada. Se ha observado, por primera vez en la peroxidasa catiónica de *Euphorbia characias*, una respuesta tanto a la eliminación como a la adición de Ca^{2+} , de modo que si se elimina, la actividad enzimática se reduce notablemente, pero si se adiciona al medio, la actividad aumenta del orden de tres veces, siendo un proceso dependiente del pH, con el mayor aumento a pH 5,75 a una concentración de Ca^{2+} 10 mM (Medda *et al.*, 2003). Se puede decir que un enlace endógeno fuerte con un átomo de calcio contribuye al mantenimiento de la estructura proteica en el entorno del grupo hemo, en cambio un enlace más débil con el segundo átomo actúa como un potente activador. Se han observado aumentos de actividad enzimática al añadir otros cationes divalentes como Sr^{2+} y Ba^{2+} , sin embargo, la adición de otros, como Mn^{2+} y Mg^{2+} , no tiene efectos sobre la actividad enzimática.

2.3.3. GLICANOS

La glicosilación es un aspecto importante en el metabolismo celular de animales y plantas. Al menos existen entre 250-300 enzimas implicadas en la glicosilación proteica, lo cual indica la gran variedad de glicanos que pueden existir. En plantas, el número de glicanos en una proteína puede aumentar con la diferenciación, como se observa en la HRP, en cuyo caso aumenta de 7 a 11 (Harthill y Ashford, 1992).

Las peroxidases de clase II y III son glicoproteínas que poseen un porcentaje de glicosilación que oscila entre el 0-5 y 0-25%, respectivamente. Los glicanos son importantes para el mantenimiento de la actividad y estabilidad proteica. Los glicanos aumentan la hidrofobicidad, la cual influye directamente sobre la actividad proteica, protegiendo, también, a la proteína de la proteólisis con tripsina.

Los glicanos están formados por 5 azúcares distintos, N-acetilglucosamina (GlcNAc), xilosa (Xyl), manosa (Man), fucosa (Fuc) y galactosa (Gal), teniendo una longitud de entre 7 y 14 azúcares, con una masa media de 176 Da por azúcar. Las cadenas glucídicas se unen a residuos de Asn. Cada peroxidasa tiene un porcentaje de glicosilación diferente, la HRP tiene 7 glicanos, la SBP, 5, y las isoenzimas cPrx y aPrx, 3 (N-60, N-144 y N-185) y 1, respectivamente (van Huystee *et al.*, 2002). Los glicanos están situados

en giros α de la proteína. El glicano más abundante y típico en glicoproteínas de plantas es $\text{Man}\alpha 3(\text{Man}\alpha 6)(\text{Xyl}\beta 2)\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}$ -. Las glicoproteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático, se procesan en el aparato de Golgi y son secretadas por el mismo camino que otras glicoproteínas, normalmente son proteínas de membrana, o van a parar a la pared celular o el espacio extracelular.

Las peroxidasas son glicoproteínas, con un determinado número de glicanos, cuya función depende del sitio de unión y de la peroxidasa en cuestión. Normalmente, influyen en la actividad enzimática, en la estabilidad térmica y en el plegamiento proteico.

Las actividades de las isoenzimas cPrx y aPrx se ven disminuidas en gran medida cuando la proteína pierde sus cadenas glucídicas por la acción de la F-N-glicosidasa F (PNGasa F), la cual rompe los enlaces N-glicosídicos y genera un péptido libre de carbohidratos, o la oxidación con peryodato, la cual, hace que la proteína sea más susceptible al ataque con tripsina. Por ello, se observa que los glicanos son necesarios para que la enzima sea activa y, además, ejercen un papel protector, ya que se han encontrado en la superficie de las peroxidasas, bloqueando, por tanto, el acceso de las proteinasas e impidiendo la ruptura proteolítica ya que protegen esos sitios potenciales de ruptura o estabilizan una determinada conformación proteica que impide que la proteinasa acceda a ese sitio. El tratamiento con tunicamicina, inhibidor de la glicosilación proteica, indica que ésta no es necesaria para la secreción, pero sí para la estabilización y la adquisición de la conformación activa catalítica de cada isoenzima (Hu y van Huystee, 1989).

Actualmente, se está intentando buscar la función biológica de los glicanos en las glicoproteínas (Glicobiología). Estudios con HRP glicosilada y sin glicosilar demuestran que la estabilidad térmica no se modifica por la presencia de glicanos, siendo la temperatura de transición $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ambas proteínas. Sin embargo, se observa que en la desnaturalización química con GuHCl, la proteína glicosilada es entre 2 y 3 veces más estable que la desglucosilada. Por ello, los glicanos casi no afectan su estabilidad termodinámica, pero incrementan significativamente su estabilidad cinética (Tams y Welinder, 1996).

La cPrx presenta tres cadenas glucídicas, N60, N144 y N185, que suponen el 20% de la masa proteica (Schuller *et al.*, 1996). Se han hecho estudios de mutagénesis dirigida para ver el efecto que tiene cada glicano en la actividad enzimática, la estabilidad térmica y el plegamiento proteico. Los tres mutantes se sintetizaron por alteración de los tres codones que determinan los residuos donde se encuentran los sitios de N-glicosilación, modificándose uno en cada mutante. Los glicanos N60 y N144 disminuyen la actividad enzimática un 30 y 40%, respectivamente, y no tienen efecto sobre la estabilidad térmica. Sin embargo, el

glicano situado en N185 no tiene ningún efecto sobre la actividad enzimática pero sí reduce la termoestabilidad, pasando la temperatura media de transición a 55 °C, de los 58 °C de las otras formas enzimáticas. Se observa, también, que estos glicanos son importantes en la estabilización proteica, incrementando todos ellos la rigidez de la proteína. Como los mutantes sólo pierden un glicano, ninguno de ellos es susceptible a la digestión con tripsina, ya que todos los glicanos tienen un importante papel de protección frente a proteasas (Lige *et al.*, 2001).

Se están estudiando las estructuras de las cadenas glucídicas de las enzimas vegetales, ya que el patrón de glicosilación difiere del de las enzimas animales. Se han hecho estudios con espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ para elucidar la estructura de la cadena glucídica que hay unida a la N144 en la cPrx, comprobándose que la composición de azúcares en el glicano es Fuc-GlcNAc-Man-Xyl-Gal, en relación 2:4:4:1:1 para un total de 12 azúcares (Shaw *et al.*, 2000).

La cHRP tiene ocho sitios de glicosilación situados en giros en los siguientes residuos de Asn, N13, N57, N158, N186, N198, N214, N255 y N268 (Veitch, 2004). En esta proteína, hay glicanos de gran tamaño y otros de menor tamaño como $\text{Man}_m\text{GlcNAc}_2$ ($m = 4$ a 7) y $(\text{Xyl})_x\text{Man}_m(\text{Fuc})_f\text{GlcNAc}_2$ ($m = 2, 4, 5, 6$; $f = 0$ o 1 ; $x = 0$ o 1).

La determinación de la estructura primaria de glicoproteínas de plantas es difícil por la baja abundancia de estas especies y por su heterogeneidad. Las estructuras de las cadenas glucídicas tienen un núcleo central, tanto en especies animales como en vegetales (Takahashi *et al.*, 1986; Wyss *et al.*, 1995), formado por $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta$. El análisis de la estructura primaria de glicoproteínas es complicado por la microheterogeneidad, sobre todo, de los azúcares terminales. En las plantas, ésto se debe a la acción de las glicosidasas de la pared celular que se ha observado actúan sobre glicanos en células de cacahuete (Wan *et al.*, 1994), tomate (Morvan y Lhernould, 1996) y fresa (Faugeron *et al.*, 1997). Sin embargo, esta heterogeneidad no afecta a la actividad peroxidasa.

2.4. REACCIÓN CATALIZADA POR LAS PEROXIDASAS

Las peroxidadas catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, usando H_2O_2 como molécula aceptora de electrones, pasando la enzima, durante el ciclo catalítico, a través de diferentes formas. En la reacción catalizada por la enzima están implicados dos sustratos. La caracterización de este comportamiento cinético bi-sustrato fue explicada por Robert Alberty (Alberty, 1953). Este mecanismo recibe el nombre de mecanismo *ping-pong* (Cleland, 1970, 1990).

El ciclo catalítico se describe en la Fig. 2. El peróxido de hidrógeno oxida la forma enzimática nativa [Fe (III)], mediante un paso monoelectrónico, para generar el Col, radical π catiónico (oxiferrilo porfirina). Este Col acepta un electrón y un protón de un sustrato reductor (RH) para generar su correspondiente radical libre (R^\bullet) y el intermedio hémico oxiferrilo denominado Coll. En el siguiente paso de reducción monoelectrónica del Coll, una segunda molécula de RH regenera la enzima en su forma férrica nativa. Las constantes de velocidad k_1 , k_2 y k_3 corresponden a la formación y reducción del Col y a la reducción del Coll, respectivamente.

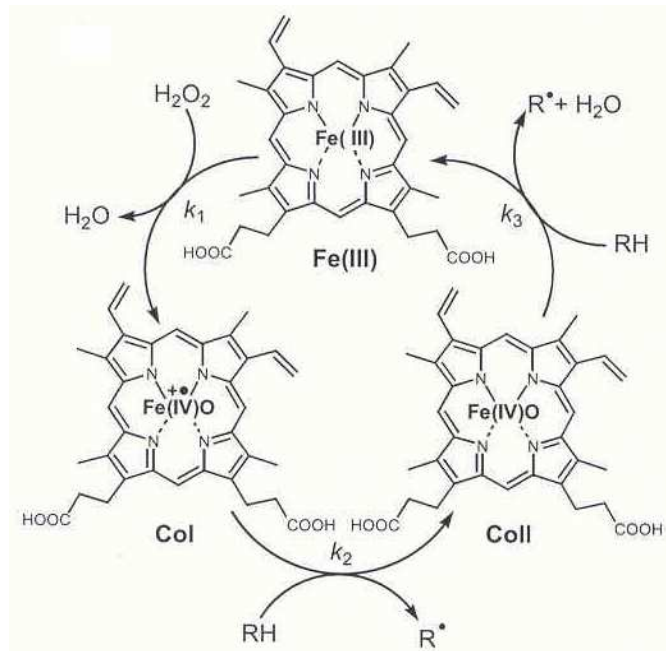


Figura 2. Ciclo catalítico de las enzimas peroxidasa. Se muestra el centro activo de la enzima férrica nativa y de sus formas modificadas, los Col y Coll.

El ciclo de reacción de la peroxidasa es un mecanismo *ping-pong* irreversible. Cuando una reacción es irreversible, la velocidad de reacción de un compuesto es mucho más alta que la velocidad de disociación. Los complejos que aparecen entre los sustratos y la enzima tienen una vida media muy corta y son muy difíciles de detectar.

La primera pregunta que se planteaba al estudiar la reacción de la peroxidasa era el estado de oxidación que tenía el hierro hémico y el número de coordinación en la enzima nativa. El hierro hémico de la peroxidasa nativa es Fe (III) pentacoordinado. Inicialmente se pensó que era hexacoordinado y que el sexto ligando era una molécula de agua. Si esto hubiera sido cierto, en la primera reacción se deberían liberar dos moléculas de agua, una como consecuencia de la reducción del peróxido de hidrógeno y otra que se habría desplazado de la sexta posición de coordinación, ya que durante la primera oxidación monoelectrónica de la enzima se incorpora al hierro hémico un átomo de oxígeno procedente del peróxido de hidrógeno, y no es

así. Esta y otras evidencias, tales como estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia paramagnética electrónica (RPE), resonancia Raman, estudios estructurales de difracción de Rayos X y estudios espectroscópicos, indican distintos coeficientes de absorptividad molar para la banda Soret cuando el hierro está penta o hexacoordinado, 105 ± 6 y $177 \pm 9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, además de la aparición en el espectro de toda peroxidasa de un hombro a 380 nm que indica que el átomo de hierro del grupo hemo está pentacoordinado. En los Col y Coll, el hierro tiene un estado de oxidación IV, conteniendo ambos compuestos un grupo ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$).

El Col, en el que la enzima posee un grupo ferrilo y un radical catiónico porfirínico, tiene una banda Soret con una intensidad que es la mitad de la que posee la enzima nativa, lo cual es característico de toda peroxidasa, y que se encuentra centrada a 403 nm. Este Col intermedio de la reacción enzimática tiene un alto estado de oxidación. Hay estudios que detectan, antes de la formación del Col, la presencia de un compuesto 0 (Co0), que se ha observado a bajas temperaturas, en el cual el Fe (III) se une a un hidroperóxido (Dunford, 1991).

El Coll también posee un grupo ferrilo y su banda Soret se desplaza de 403 a 420 nm, siendo la intensidad similar a la banda Soret de la enzima nativa y apareciendo un doble pico, con máximos a 527 y 554 nm.

Se observa que el Coll es más estable que el Col, siendo potentes oxidantes, con potenciales redox estimados de $\sim + 1,0 \text{ V}$.

Las reacciones con exceso de peróxido de hidrógeno generan la formación de un nuevo compuesto, el compuesto III (CoIII), el cual también puede surgir por otras rutas. Este intermedio es un híbrido de resonancia de Fe(III)-superóxido y Fe(II)-dioxígeno. Se ha publicado la estructura cristalina de alta resolución del CoIII, en el cual el hierro hémico está unido a una molécula oxígeno (Filizola y Loew, 2000).

En el ciclo catalítico de las peroxidasas, tienen gran importancia en la formación del Col algunos residuos que se encuentran distales al grupo hemo y que están conservados en todas las peroxidasas de plantas, tales como la Arg38 y la His42 (Berglund *et al.*, 2002).

En ausencia de sustratos donadores, el Col(HRP) se convierte rápidamente en Coll(HRP) y éste en enzima férrica nativa. La rápida velocidad de transformación de Coll en enzima férrica, en CcP y LiP, y en ausencia de sustrato donador, se explica por la presencia de numerosos residuos aromáticos en la estructura. También, en peroxidasas de origen fúngico, microbiano y de plantas aparece en su estructura un

Trp altamente conservado, localizado entre dos α -hélices, en el lado opuesto a la entrada del grupo hemo, a 8-9 Å de él. Probablemente este residuo juegue un papel estructural muy importante. Se ha observado por estudios de mutagénesis directa de W107F que este residuo está implicado en el plegamiento proteico pero no en la estabilidad (Gazaryan *et al.*, 1999).

2.5. FUNCIONALIDAD DE LAS PEROXIDASAS

2.5.1. ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Las peroxidasas de plantas superiores (clase III) están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo vital de la planta, desde la germinación hasta la senescencia. Esto es debido a la variedad de isoformas, así como, a la alta y heterogénea regulación de su expresión (Passardi *et al.*, 2005).

En el interior de una planta existen distintas isoenzimas peroxidásicas, cada una de ellas involucrada en unas funciones dependiendo de su localización subcelular. Hay isoenzimas que se encuentran en la pared celular y por ello intervienen en procesos de crecimiento y endurecimiento de la misma, y otras, en cambio, son más abundantes en el citoplasma y están implicadas en reacciones de oxidación que ocurren en su interior. En el caso de la planta de cacahuete, existen dos isoenzimas, una catiónica (cPrx) que se encuentra en la pared celular y otra isoenzima aniónica (aPrx) que se encuentra en el citoplasma (Zheng y van Huystee, 1992). En el caso de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) existen 47 isoenzimas, las aniónicas se encuentran en la pared celular, las catiónicas en las vacuolas y la ascorbato peroxidasa se encuentra en la fracción soluble (Leonard y Yonetani, 1974; Schloss *et al.*, 1987).

Las peroxidasas están implicadas en dos ciclos catalíticos, el peroxidásico y el hidroxílico. En este último, se generan radicales libres de oxígeno, tales como $\bullet\text{OH}$ y $\text{HOO}\bullet$, altamente reactivos y que pueden actuar como parte de rutas de transducción de señales, aumentando el número de aplicaciones fisiológicas de este grupo enzimático.

Entre las principales funciones hay que destacar:

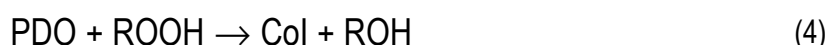
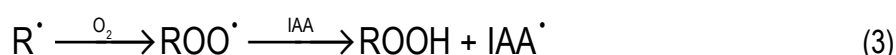
2.5.1.1. Crecimiento celular

Durante la germinación de la semilla, se liberan al medio peroxidasas y radicales libres de oxígeno, los cuales juegan un papel fundamental en la defensa de la semilla frente al ataque de patógenos. Estas especies se liberan aunque en el medio no existan patógenos, durante los primeros días de vida de la planta (Scialabba *et al.*, 2002). Un estudio con semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) demuestra que los

genes de las peroxidases comienzan a expresarse tan pronto como lo hace la germinación (Morohashi, 2002).

El crecimiento celular esta directamente relacionado con la relajación del grado de unión de los componentes que forman parte de la pared celular. En este proceso de desensamblaje participan distintos mecanismos enzimáticos, como la xiloglucano endotransglicosilasa, que libera monómeros del polímero de xiloglucano, la expansina, que rompe enlaces de hidrógeno entre celulosa y xiloglucano, y también las peroxidases, que intervienen de diversas formas en la estructura de la pared celular. El nivel de H₂O₂ endógeno está relacionado con los procesos de elongación y como las peroxidases son unas enzimas capaces de controlar estos niveles, ellas están implicadas en los procesos de elongación celular. Otro factor que regula el proceso de elongación es el ascorbato, inhibiendo este componente las enzimas implicadas en el endurecimiento de la pared celular. El radical •OH también está implicado en los procesos de elongación, siendo generado por la reacción de Fenton y siendo capaz de dividir los polisacáridos de la pared celular como la pectina y el xiloglucano. La producción de radicales •OH se lleva a cabo por reacciones no enzimáticas de relajación de la pared celular y también mediante el mecanismo enzimático mediado por la peroxidasa. La auxina también está implicada en este proceso, ya que promueve la descarga del radical superóxido (O₂•⁻) y la producción de radical hidroxilo (•OH) (Schopfer *et al.*, 2002).

Se conocen desde 1920 una serie de sustratos, llamados auxinas, que intervienen en el crecimiento de la planta. La principal auxina es el IAA y las enzimas que degradan esta fitohormona inicialmente se llamaron IAA oxidases. Se descubrió que una peroxidasa mediaba este proceso en ausencia de peróxido de hidrógeno añadido (Savitsky *et al.*, 1999), y, por ello, se aceptó que las IAA oxidases eran peroxidases. Durante este proceso se generan varios productos, indol-3-metanol, indol-3-aldehído e indol-3-hidroperóxido, este último a través de una reacción de descarboxilación. En el catabolismo de la auxina, en ausencia de peróxido de hidrógeno, hay que establecer una reacción de iniciación que genere un peróxido por autoxidación del acetato indólico. El mecanismo en ausencia de H₂O₂ es el siguiente (Dunford, 1999).



En estas ecuaciones IAA es el ácido indol-3-acético, IAA^{+•} es el radical catiónico del ácido indol-3-acético, IAA[•] el radical indólico, R[•] el radical escatoilo, ROO[•] el radical indol-3-metilhidroperóxido, ROOH el indol-3-metilhidroperóxido, ROH el indol-3-metanol, PDO la peroxidasa en su forma nativa, Col y Coll las distintas formas enzimáticas a lo largo de la reacción.

En la Ec. 1, se observa la oxidación monoelectrónica del ácido indolacético, en la que se forma el radical catiónico IAA^{+•}, el cual por descarboxilación genera el radical escatoilo (R[•]) que será el responsable de la formación del peróxido (Ec. 3), que iniciará la reacción enzimática (Ec. 4-6).

Como la peroxidasa es la enzima responsable del catabolismo de la auxina, está implicada activamente en la regulación del crecimiento de la planta. Se ha observado que la oxidación del IAA puede ocurrir en ausencia o presencia de peróxido de hidrógeno (Zheng y van Huystee, 1992). Por ello, la peroxidasa a la vez que regula el crecimiento de la planta, regula también, el nivel de peróxido de hidrógeno, lo que hace que actúe como mecanismo de defensa frente al estrés peroxidativo. Cuando la planta presenta grandes niveles de H₂O₂, la actividad peroxidasa aumenta notablemente y, por lo tanto, se empieza a degradar IAA con mayor rapidez, incidiendo este hecho negativamente sobre el crecimiento de la planta (Veitch, 2004).

Las peroxidasas actúan como sistemas de defensa dentro de la planta para combatir el estrés peroxidático, ya que son muy eficientes en la transformación del H₂O₂ en especies de oxígeno como O₂ y OH⁻, que no son nocivas para la planta.

Otra importante reacción de oxidación que ocurre en el citoplasma celular por la acción de una peroxidasa es la oxidación del ácido ascórbico, molécula esencial en la defensa frente a especies de oxígeno activas que han sido generadas durante otros procesos metabólicos. Esta enzima recibe el nombre de ascorbato peroxidasa y previene a la célula de un aumento de la concentración de H₂O₂. Algunos estudios demuestran que la actividad ascorbato peroxidasa en guisante y judía está regulada en presencia de ozono y etileno porque estos compuestos provocan un aumento del nivel de H₂O₂ (Mehlhorn, 1990).

2.5.1.2. Lignificación y suberización

Las peroxidasas, por su capacidad oxidativa, están implicadas en la formación de la pared celular, en la polimerización de sus componentes. Estos procesos se conocen con el nombre de lignificación y suberización. La lignina representa el segundo compuesto orgánico más abundante en la tierra después de la celulosa, significando el 25% de la biomasa de una planta. El fenómeno de lignificación está asociado a la

formación de la estructura vascular dentro de la planta. La lignina es un heteropolímero amorfo tridimensional que resulta del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes p-hidroxicinámicos, p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, en una reacción mediada por la peroxidasa (Ros Barceló, 1997; Ros Barceló *et al.*, 2004). Los tres monómeros constituyentes de la lignina se diferencian en su grado de metoxilación y las distintas asociaciones de éstos generan distintos tipos de lignina, con diferente complejidad química, habiendo aumentado dicha complejidad a lo largo de la evolución. Las peroxidasas también están implicadas en la formación de suberina, biopolímero presente en algunas paredes celulares y que modifica sus propiedades biofísicas. Contiene un dominio polifenólico y otro polialifático, diferentes en su composición química y en su localización subcelular. El dominio polifenólico se forma mediante un proceso de acoplamiento oxidativo mediado por peroxidasa (Bernards *et al.*, 2004).

Los procesos de lignificación y suberización no son los únicos necesarios para la formación de la pared celular, endureciéndose ésta por uniones entre los distintos polisacáridos (fundamentalmente celulosa y pectina) mediante enlaces diferúlicos, en cuya formación también intervienen las peroxidasas. Estas enzimas son importantes a la hora de formar una red altamente densa que aumenta la rigidez de la pared celular.

2.5.1.3. Mecanismos de defensa

Las plantas están sometidas a muchos y muy variados agentes externos, frente a los cuales se defienden mediante su actividad peroxidasa. Los agentes pueden ser:

- Químicos: metales pesados, pesticidas, o componentes de la contaminación industrial.
- Biológicos: patógenos.
- Físicos: agresiones.

Ante estos agentes, la planta se puede defender pasivamente construyendo fuertes barreras o activamente, mediante la producción de radicales libres de oxígeno que ataquen o contrarresten a tales agentes.

Los metales, como Fe y Cu, en sus formas iónicas pueden generar especies reactivas de oxígeno mediante las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss. Pero otros metales, como Pb, Cd o Zn, no están implicados de un modo tan claro en este tipo de reacciones. Por ello, la planta lo que hace es acumular en su interior esos metales pesados, y para ello utiliza su actividad peroxidasa, ya que por ella se forma un

polímero fenólico capaz de atrapar estos metales como tales o a veces en forma de cristales de Cd-Ca que se sitúan en lugares específicos dentro de la planta (Lavid *et al.*, 2001).

Se ha observado que algunas peroxidases son fuertemente inducidas por la presencia de metales pesados, pesticidas y también por diferentes elementos de la contaminación industrial y urbana. Por ello, se puede usar el nivel enzimático de una planta para controlar el grado de contaminación de una zona, no solo de peroxidasa sino también de superóxido dismutasa, de glutathionreductasa o utilizando la concentración de ascorbato. La principal desventaja de este método es que no se sabe cuál es el contaminante responsable de dicha inducción (Klumpp *et al.*, 2000). Las peroxidases son muy eficientes degradando moléculas tóxicas de pesticidas como el 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) (Agostini *et al.*, 2003).

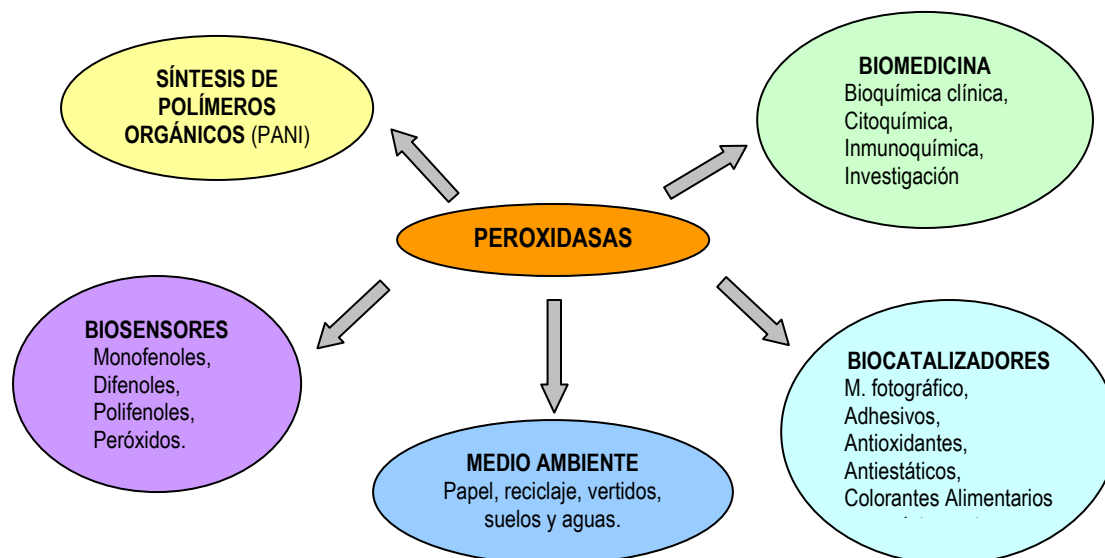
Las peroxidases se activan en una planta cuando hay un ataque de patógenos, aumentando notablemente las concentraciones de radicales libres de oxígeno, los cuales en altas dosis son nocivos para el crecimiento de los microorganismos. La producción y acumulación de aniones superóxido y de radicales hidróxilo en la pared celular está relacionado con la presencia de patógenos. La actividad peroxidasa se incrementa enormemente pasados 12 h desde la infección bacteriana en el sitio de infección (Martínez *et al.*, 1998).

También existen barreras físicas formadas por lignina que impiden la entrada de patógenos, pero este polímero no es la única barrera defensiva que existe en la planta, hay otros compuestos fenólicos distintos morfológicamente que forman estas barreras, y que son normalmente polimerizados por las peroxidases.

Los tejidos se pueden dañar por ataque de un patógeno o por la existencia de una agresión meteorológica o animal. La expresión peroxidásica se activa durante la agresión y, aunque no contribuye en la reparación del daño del tejido, actúa como mecanismo de defensa frente al ataque de agentes extraños.

2.5.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Las peroxidasas se utilizan como biocatalizadores en la formación de una gran cantidad de compuestos, en biomedicina, como biosensores y en muchos tratamientos de residuos, eliminando o reduciendo la presencia de agentes contaminantes en el medio ambiente (Esquema 2).



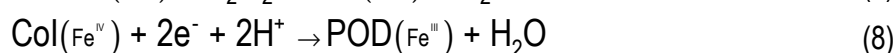
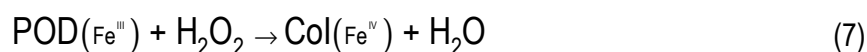
Esquema 2. Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas peroxidasas.

2.5.2.1. Electrodo enzimático

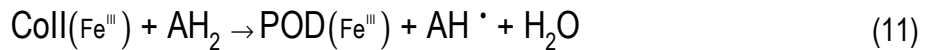
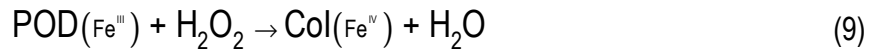
Las peroxidasas son unas enzimas ampliamente usadas en la construcción de electrodos enzimáticos, ya que son capaces de utilizar el peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación monoelectrónica de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos.

Si la peroxidasa se inmoviliza sobre una superficie de carbono, grafito, oro, oro modificado o platino puede haber una transferencia electrónica (ET) directa entre la superficie del electrodo y el centro activo de la enzima. De este modo, la enzima inmovilizada en el electrodo puede ser oxidada por el peróxido de hidrógeno y, después, reducida por electrones procedentes del electrodo.

Los biosensores de peroxidasas basados en la ET directa (Ec. 7, 8) se usan para la detección de peróxido de hidrógeno y pequeñas cantidades de hidroperóxidos orgánicos. Cuando, además, se inmoviliza, el peróxido de hidrógeno en el electrodo, se puede determinar la concentración de sustratos oxidados tales como glucosa, alcoholes, glutamato, colina (Ruzgas *et al.*, 1996a; 1996b).



Cuando se inmoviliza, además del peróxido de hidrógeno, un donador de electrones de naturaleza aromática sobre la superficie del electrodo (p-cresol, catecol, hidroquinona,...), coexisten la ET directa con la reacción enzimática común (Ec. 9-11). La forma del donador oxidado enzimáticamente (AH^{\bullet}) es rápidamente reducida, por vía electroquímica, por el electrodo con potencial adecuado (Ec. 12). Este proceso recibe el nombre de ET mediada, más eficaz que la ET directa. Esto es debido a la larga distancia de transferencia electrónica entre la superficie del electrodo y el centro activo de la enzima, unido a la desfavorable orientación de la molécula en el electrodo o a la baja adsorción de la enzima por el gran porcentaje de glicosilación que posee (Ferafontova *et al.*, 2001).



La ET mediada puede utilizarse analíticamente para determinar la concentración del mediador cuando se usan concentraciones constantes de peróxido de hidrógeno. Aunque las ET directa y mediada ocurren simultáneamente en el electrodo de peroxidasa, las moléculas enzimáticas no están involucradas del mismo modo en ambos procesos.

La peroxidasa más utilizada en la fabricación de electrodos es la peroxidasa de rábano (HRP). Se han hecho electrodos con otras peroxidosas de plantas como la peroxidasa de tabaco, cacahuete y batata para ver si el electrodo mejoraba, llegándose a la conclusión de que la fracción de moléculas de enzima implicadas en la ET directa varía notablemente de unas peroxidosas a otras. Se observa que si las peroxidosas tienen una carga neta negativa (pI bajo), como es el caso de las peroxidasa de batata y de tabaco, hay más moléculas de enzima implicadas en la ET directa. En cambio, si es positiva hay un menor número de moléculas adsorbidas sobre la superficie del electrodo (HRP y PNP). También influye el porcentaje de glicanos que tenga la enzima, de modo que las enzimas altamente glicosiladas tienen un menor número de moléculas adsorbidas sobre la superficie del electrodo y, por tanto, implicadas en la ET directa (Lindgren *et al.*, 2000). También las peroxidosas de hojas de palma se han usado para construir un biosensor que monitoriza peróxidos (Alpeeva *et al.*, 2005).

Como el porcentaje de moléculas de HRP adsorbidas sobre la superficie del electrodo no es muy alto (50%), se han inmovilizado sobre distintos electrodos formas recombinantes no glicosiladas de la HRP, expresadas en *E. coli*, observándose que el porcentaje de moléculas implicadas en el proceso de ET directa

es mucho mayor. La HRP se une a la superficie del electrodo mediante interacciones hidrofóbicas, favorecidas por la ausencia de glicanos en la molécula enzimática. La sensibilidad del electrodo de oro con formas enzimáticas recombinantes es de ocho a nueve veces más alta que con la enzima nativa, cuando no se usa un mediador. Sin embargo, si se usa un mediador (catecol), no hay una diferencia notable de sensibilidad entre la forma nativa y las recombinantes. El límite de detección para las formas recombinantes es de 10 nM. Así pues, el electrodo de oro con HRP recombinante es un método muy sensible para la determinación de peróxido de hidrógeno (Ferapontova *et al.*, 2001). El método más sensible para determinar peróxido de hidrógeno es un electrodo de grafito modificado con un mediador, ya que tiene un límite de sensibilidad de 7 nM (Wendzinski *et al.*, 1997).

2.5.2.2. Síntesis de polímeros orgánicos

Presenta un gran interés la producción de polímeros conductores. La polianilina (PANI) es uno de los polímeros más ampliamente estudiado por su gran estabilidad medioambiental y sus amplias propiedades electrónicas. Tiene múltiples aplicaciones, entre las que cabe destacar: construcción de baterías orgánicas de peso ligero, diodos emisores de luz, pantallas ópticas, protección frente a la corrosión metálica, bioanálisis, sensores de compuestos orgánicos volátiles, separación electroquímica de mezclas racémicas usando PANI quiral, etc. (Ankara *et al.*, 1991; MacDiarmid, 1997; Raitman *et al.*, 2002).

La PANI es el polímero sintético electroactivo más antiguo, su síntesis fue realizada en 1840 por Friszsche. Se puede sintetizar química o enzimáticamente (Liu *et al.*, 1999). Inicialmente, su síntesis era un proceso químico, en el cual el monómero de anilina se oxidaba bajo condiciones fuertemente ácidas y bajas temperaturas, usando persulfato amónico como iniciador de la polimerización radicalaria. Durante la polimerización, se formaba la base emeraldina de la polianilina, compuesto no conductor, ya que tan sólo su forma salina es conductora. La sal de la emeraldina se obtenía por un tratamiento con ácidos fuertes (ácidos fosfórico o sulfónico) de la base emeraldina, proceso denominado “dopaje”. Este método químico presenta dos inconvenientes, en primer lugar no se puede seguir cinéticamente ya que es una reacción radicalaria y, en segundo lugar, es una reacción nociva para el medio ambiente debido al bajo pH con el que se trabaja. Por ello, la polimerización enzimática de la anilina es una alternativa atractiva para la síntesis de polianilina. Las peroxidasas de plantas pueden oxidar la anilina, los radicales libres producidos en esta reacción catalítica pueden participar en distintas reacciones post-enzimáticas. La polimerización se lleva a cabo en presencia de peróxido de hidrógeno como sustrato reductor. La ventaja de la polimerización enzimática es que la generación de la polianilina dopada se lleva a cabo bajo condiciones suaves, es una reacción “verde”, compatible con el mantenimiento sostenible del medio ambiente.

En primer lugar, se usó la HRP para generar PANI, pero se observó que esta enzima presenta una baja afinidad por la anilina y pierde parte de su actividad catalítica a pH's inferiores a 4,5 (Pina et al., 2000; Chattopadhyay y Mazumdar, 2000). Por ello, se sintetizó polianilina utilizando otras peroxidases de plantas tales como la peroxidasa de palma africana (AOPTP) y la peroxidasa de palma real (RPTP) (Sakharov *et al.*, 2003). Estas enzimas presentan una amplia estabilidad frente a la temperatura y en un rango de pH muy amplio (Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2008). Con estas enzimas se lleva a cabo la síntesis de polianilina en tampón acuoso a un pH óptimo de 3,5. La velocidad de la reacción aumenta con la concentración de anilina y no hay inhibición enzimática por sustrato, siendo la concentración óptima de peróxido de hidrógeno 5 mM. Concentraciones de peróxido de hidrógeno superiores a 15 mM hacen de él un sustrato suicida para la enzima (Sakharov *et al.*, 2003).

La HRP se usó para la polimerización de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, dando lugar a una serie de polímeros de nueva síntesis que eran generados en agua y en solventes orgánicos miscibles con el agua (Oguchi *et al.*, 1999).

La peroxidasa de soja (SBP) cataliza la polimerización oxidativa del cardanol usando metanol, etanol, 2-propanol, t-butanol y 1,4-dioxano como solventes. El mayor rendimiento (62%) se obtiene al usar el 2-propanol como solvente (Kim *et al.*, 2003).

2.5.2.3. Decoloración de tintes sintéticos

Los tintes son compuestos usados en las industrias del papel, fotografía e industrias textiles. Son compuestos de origen sintético, con anillos aromáticos dentro de su estructura molecular. Se estima que hay unos 10.000 tintes comercialmente usados y se producen $7 \cdot 10^5$ toneladas por año. De esta cantidad, aproximadamente entre el 10-15 % es eliminada en vertidos industriales, causando gran cantidad de problemas medioambientales. Por ello, se aplica una variada gama de métodos físico-químicos para el tratamiento de dichos tintes, tales como la oxidación química, la ósmosis inversa y la adsorción. Aunque son métodos muy eficaces, presentan una serie de inconvenientes como son su elevado coste, limitada aplicabilidad, gran gasto energético y la generación de una serie de productos que también son nocivos para el medio ambiente.

Se ha observado que la destrucción oxidativa de estos compuestos puede llevarse a cabo con el uso de enzimas oxidasas, entre las que cabe citar la LiP y la MnP, las cuales decoloran tintes azo como el Naranja II entre otros (Chivukula *et al.*, 1995).

También se ha utilizado la HRP para la decoloración de tintes azo como el azul Remazol y el rojo Cibacron. Es posible el uso de estas enzimas por las estructuras aromáticas que presentan los tintes azo (Bhunja *et al.*, 2002). El pH óptimo de degradación enzimática es inferior a 6,0, pH que hace posible el uso de peroxidasas.

2.5.2.4. Procesos de detoxificación de suelo y aguas

Las industrias químicas y alimentarias generan entre sus residuos una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales son altamente tóxicos y carcinogénicos, por lo que están controlados en un gran número de países, y deben ser eliminados antes de que se viertan efluentes industriales al medio ambiente (Alder *et al.*, 1994; Regalado *et al.*, 2004). Así pues, las peroxidasas se utilizan para el tratamiento de residuos líquidos y suelos contaminados de fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y metales pesados (Arseguel y Baboulène, 1994).

Uno de los métodos usados para la eliminación de tales contaminantes consiste en un proceso de polimerización usando enzimas redox. Se usa peróxido de hidrógeno como molécula aceptora de electrones y la peroxidasa puede catalizar la polimerización oxidativa de fenoles, anilinas y otros compuestos aromáticos generando oligómeros insolubles que son fácilmente eliminados por filtración o sedimentación (Dordick *et al.*, 1987) (Ec. 13). Esquemáticamente,



siendo HAAH el producto de polimerización. El tratamiento enzimático ofrece una gran especificidad y elevada velocidad de reacción en condiciones suaves.

Inicialmente se utilizó HRP para llevar a cabo los procesos de detoxificación de agua, si bien en la actualidad se usan peroxidasas de otras especies como soja (Caza *et al.*, 1999) y nabo (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003). El pH óptimo de trabajo depende de la peroxidasa que se utilice y del sustrato (fenol) a eliminar. El rango de pH oscila entre 3 y 10, aunque con peroxidasa de soja se puede eliminar el 90% de un compuesto fenólico trabajando a un pH 2,5. La eficacia del proceso de detoxificación no depende sólo del pH, sino también de la concentración de peróxido de hidrógeno, de modo que concentraciones superiores a 1,2 mM inhiben la enzima (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001).

Durante los procesos de detoxificación, la actividad enzimática se reduce, y ello puede deberse a la adsorción de la enzima sobre el polímero, limitando la libre difusión del sustrato al centro activo. Para reducir

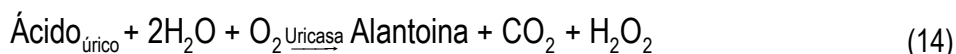
este fenómeno, se usan aditivos como el polietilenglicol (PEG) o la gelatina, los cuales protegen la enzima porque se unen al polímero recién formado (Cooper y Nicell, 1996; Kinsley y Nicell, 2000).

2.5.2.5. Aplicaciones analíticas: kits de diagnóstico

Con estos kits se puede cuantificar ácido úrico, glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido ascórbico (Thompson, 1987) en fluidos biológicos, entre otros compuestos, usando peroxidasa, sobre todo HRP, como enzima acoplada.

La detección de lactosa se lleva a cabo inmovilizando β -galactosidasa, galactosa oxidasa y HRP en un soporte polimérico. La adición de un cromógeno se usa para la estimación de lactosa en un rango comprendido entre 20-100 g l⁻¹ (Sharma *et al.*, 2002).

El kit de determinación de ácido úrico utiliza en una primera reacción (Ec. 14) como enzima la uricasa y en la segunda (Ec. 15) la HRP, la cual debe estar en cantidad saturante para garantizar que todo el peróxido de hidrógeno generado en la primera reacción da lugar a la formación de una sustancia coloreada, que es directamente proporcional a la cantidad de ácido úrico. Mediante este tipo de reacciones, se determina también glucosa, triglicéridos y urea, entre otros compuestos.



El colesterol se determina mediante un método enzimático colorimétrico, preciso, selectivo y rápido. Utiliza tres enzimas, colesterol oxidasa, colesterol esterasa y HRP, en formas libres e inmovilizadas sobre una matriz, dando muy buenos resultados (Ragland *et al.*, 2000; Malik y Pundir, 2002). En este método, el éster de colesterol es hidrolizado por la colesterol esterasa a ácido graso libre y colesterol, el cual con la colesterol oxidasa es oxidado a colesterona y peróxido de hidrógeno, compuesto este último que, por una reacción parecida a la mostrada en la Ec. 15, genera quinoneimina, compuesto coloreado que se mide a una longitud de onda de 520 nm.

2.5.2.6. Inmunoensayos enzimáticos

Estos métodos utilizan las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar reacciones inmunológicas. La enzima se encuentra unida a un anticuerpo y será la responsable de detectar el correspondiente antígeno. La unión antígeno-anticuerpo desencadena una reacción en la que aparece

una sustancia coloreada por acción de la peroxidasa, normalmente la HRP, que indica la presencia del antígeno y cuya intensidad de color servirá como criterio de cuantificación de dicho antígeno.

Estos tests, denominados ELISA o EIA (EnzimoinmunoAnálisis), se utilizan para la detección de toxinas, patógenos y otros analitos como virus. Es muy frecuente su uso para la detección de micotoxinas producidas por *Aspergillus Niger* y *Penicillium Notatum* (ocratoxinas) y *Fusarium* (toxina T2) (Ramakrishna *et al.*, 1990). Estas micotoxinas tienen efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, mutagénicos y teratogénicos en mamíferos, y normalmente se encuentran en cereales (maíz, centeno, cebada, trigo, soja, etc). Estos tests también se usan para la detección en el suero humano de virus como el virus de la hepatitis-E, el dengue, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o SIDA y algunos herpesvirus.

Estos analitos pueden ser detectados mediante el uso de otras técnicas como HPLC, pero éstas son muy caras, lentas y requieren muestras muy elaboradas y con características concretas. En cambio, los tests EIA son muy simples, de bajo coste y requieren unos equipos y unos fundamentos técnicos muy sencillos.

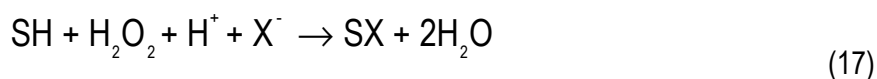
2.5.2.7. Síntesis Orgánica

Las peroxidasas catalizan cuatro tipos de reacciones (Colonna *et al.*, 1999):

1. Deshidrogenación oxidativa



2. Halogenación oxidativa



3. Dismutación de peróxido de hidrógeno



4. Reacción de transferencia de oxígeno



La deshidrogenación oxidativa (Ec. 16) es la reacción típica de toda peroxidasa y se lleva a cabo a través el mecanismo expuesto en secciones anteriores. Sin embargo, la halogenación oxidativa (Ec. 17), la realiza en mayor medida la cloroperoxidasa (CPO), aislada del hongo marino *Caldariomyces fumago*, que tiene como quinto ligando axial del grupo hemo, en vez del grupo imidazol como en la HRP, un tiolato de cisteína que hace que esta enzima tenga unas propiedades espectroscópicas y químicas muy similares a las del citocromo P-450. Por ello, no sólo cataliza reacciones típicas de toda peroxidasa, sino reacciones

características de monoxigenasas y catalasas. Se puede decir que es la única que cataliza reacciones de halogenación (excepto fluoración) en presencia de iones haluro y peróxido de hidrógeno. La reacción de dismutación (Ec. 18), típica de catalasas, se lleva a cabo por CPO y en menor medida por HRP. Las reacciones de transferencia de oxígeno (Ec. 19) son las más importantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que con ellas se pueden sintetizar productos naturales, químicos, farmacéuticos y agrícolas muy importantes industrialmente. Entre estas reacciones, hay que destacar:

- Oxidación de heteroátomos, tales como, S y N.
- Epoxidación.
- Oxidación de enlaces C-H (oxidación alílica, bencílica, alcohólica e indólica).

Lo más importante de este tipo de oxidaciones es que el átomo de oxígeno se introduce, en condiciones suaves y controladas, en un sustrato orgánico enantioselectivamente, siendo, por ello, reacciones de bajo coste y compatibles con el medio ambiente. El grupo funcional sulfóxido tiene distintas actividades biológicas y algunos sulfóxidos, puros, presentan un gran interés farmacéutico. La oxidación de S es llevada a cabo por distintas enzimas, HRP, CcP, microperoxidasa y lactoperoxidasa. Con la HRP la enantioselectividad de la reacción mejora notablemente cuando se modifica, por ingeniería genética, la enzima y se sustituye la Phe41 por Leu, siendo, en este caso, el exceso enantiomérico el 94%. Sin embargo, la CPO es la enzima preferida en este tipo de reacciones ya que presenta una alta enantioselectividad, oscilando el exceso enantiomérico (ee) entre el 97-100%. La oxidación de N también la realiza la CPO pero los rendimientos son menores, entre el 30-70%.

Las reacciones de epoxidación e hidroxilación se llevan a cabo por la CPO. La hidroxilación enzimática es la responsable de la producción de tres importantes medicamentos que se obtienen con un rendimiento del 70%, la L-3,4-dihidroxiifenilalanina (L-DOPA), la D-3,4-dihidroxiifenilglicina y la L-epinefrina. La CPO es capaz de transformar los alcoholes alílicos, bencílicos y propargílicos en sus correspondientes aldehídos usando H_2O_2 como oxidante y a veces oxidar éstos a sus ácidos. También hay que destacar la oxidación indólica, cuyo método químico requiere una gran cantidad de pasos y, sin embargo, su método enzimático es más sencillo y proporciona unos rendimientos significativos.

Las reacciones anteriormente mencionadas facilitan la síntesis de muchos productos orgánicos y, además, permiten reacciones regio y enantioselectivas. Si se comparan las peroxidases con monoxigenasas y la citocromo P-450, las primeras trabajan de un modo más económico porque usan H_2O_2 y otros peróxidos

como oxidantes, en vez de O₂. Además, las reacciones ocurren en condiciones suaves y son compatibles con el medio ambiente.

2.6. ESTABILIDAD DE LAS PROTEINAS

Las proteínas son macromoléculas naturales que, en general, poseen una composición fija y una estructura ordenada que está relacionada con su función biológica. Esta conformación única se denomina estado nativo y aparece cuando la macromolécula se encuentra en unas condiciones termodinámicas similares a las del medio fisiológico en el que desempeña su función. Toda la información necesaria para conocer la estructura tridimensional de una proteína se encuentra en su estado nativo (Anfisen, 1973). Sin embargo, la formación de esta estructura no está del todo comprendida y su estudio es de gran importancia, puesto que muchas patologías tienen su origen en un plegado incorrecto o “*misfolding*” de las proteínas. Conocer por qué las proteínas adoptan una estructura tridimensional y no otra, que podría ser aún más estable, es un problema todavía sin resolver. Por ello, se intenta encontrar una explicación físico-química sobre la estabilidad de la conformación nativa (Creighton, 1990).

Por cambios de su entorno, las proteínas fácilmente pueden perder su estructura tridimensional o estado nativo. Este proceso se conoce con el nombre de desnaturalización y se puede deber a diversos factores, tales como una variación de pH, de temperatura o la adición de agentes desnaturalizantes, como la urea o el GuHCl. Esta desnaturalización puede ser de dos tipos: reversible, cuando la proteína recupera el estado nativo al eliminar la causa de la desnaturalización, o irreversible, cuando la proteína pierde su estructura tridimensional y aún eliminando la causa de la desnaturalización no la vuelve a recuperar, no pudiendo por tanto volver a realizar su función biológica. Los factores desnaturalizantes no afectan de igual modo a todas las proteínas, por ello el estudio del efecto que cada uno de ellos ejerce en la proteína puede ayudarnos a entender el proceso de su plegamiento.

La detección y caracterización de estados intermedios es un aspecto fundamental en el estudio del plegamiento de las proteínas, ya que se admitía que las proteínas adoptaban varias formas intermedias durante dicho proceso antes de llegar a adquirir su estructura nativa funcional (Arai y Kuwajima, 2000). El intermedio más conocido se denomina glóbulo fundido o “*molten globule*” (Ptitsyn *et al.*, 1987; Kuwajima *et al.*, 1989), estado caracterizado por tener una estructura secundaria bastante ordenada, una forma compacta comparable a la de las proteínas nativas, pero sin estructura terciaria bien definida. En muchas ocasiones, la desnaturalización parece una transición entre dos estados, sin apreciarse la existencia de

estados intermedios. Sin embargo, trabajando en determinadas condiciones en el proceso de desnaturalización, se puede observar el “*molten globule*”.

Desde hace 50 años se conoce que la fuerza dominante del plegamiento proteico es la debida al efecto hidrofóbico, sin olvidar la importancia que también tienen los enlaces de hidrógeno, y que la mayor fuerza desestabilizadora es la entropía conformacional. Cuando una proteína globular se encuentra en forma nativa (plegada), el 81% de las cadenas laterales de los residuos no polares (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp y Cys), el 70% de los enlaces peptídicos, el 63% de las cadenas laterales de los residuos polares (Asn, Gln, Ser, Thr y Tyr) y el 54% de las cadenas laterales cargadas (Arg, Lys, His, Asp y Glu) se encuentran en el interior proteico, lejos del contacto con el agua. Ello da lugar a la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofóbico intramoleculares. El estado plegado se estabiliza normalmente por el fino empaquetamiento del 80% de los enlaces peptídicos y las cadenas laterales de los residuos de naturaleza apolar. El estado nativo (N) es sólo marginalmente más estable que el estado desplegado bajo condiciones fisiológicas (2-10 kcal mol⁻¹). Cuando una proteína se despliega, una gran cantidad de grupos peptídicos y cadenas laterales quedan expuestos al disolvente, cuando antes no lo estaban, y, además, aparece un mayor número de huecos o cavidades en la estructura proteica desplegada (U).

2.6.1. FUERZAS QUE INTERVIENEN EN LA ESTABILIDAD PROTEICA

Las proteínas en su estado nativo poseen su mayor funcionalidad, siendo cierto que para desempeñar bien dicha función su estructura debe ser ligeramente flexible. Por ello, todas las fuerzas que contribuyen a mantener su estabilidad son importantes (Dill, 1990). Tales interacciones son las siguientes:

2.6.1.1. Entropía conformacional

Es la principal fuerza desestabilizadora de la conformación proteica. La rotación alrededor de los enlaces proteicos tiene mayor número de grados de libertad cuando la proteína se encuentra en estado U, y ello desestabiliza la proteína.

2.6.1.2. Interacciones electrostáticas: pares iónicos y puentes salinos

Se define un par iónico como la interacción entre dos residuos con carga opuesta (Asp y Glu con Arg, Lys o His). Ese par iónico pasa a ser un puente salino cuando los centroides de los grupos cargados, de los dos residuos de carga opuesta, se encuentran a una distancia de 4 Å, y cuando al menos un átomo de oxígeno carboxílico de la cadena lateral de Asp/Glu se encuentra a una distancia de 4 Å de un átomo de nitrógeno de Lys/Arg/His.

En una proteína en estado plegado, normalmente los grupos hidrofóbicos se encuentran en el interior y los hidrofílicos en el exterior. No obstante, hay una proporción de estos últimos que se encuentran en el interior proteico y forman entre ellos interacciones muy favorables como son los enlaces de hidrógeno y los puentes salinos. Estos puentes salinos se forman entre residuos de carga opuesta (Asp y Glu con Arg, Lys o His) y su geometría es un factor crítico para determinar su estabilidad. Además, en ausencia de disolvente, las interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los residuos que forman el puente salino y de estos puentes con residuos vecinos son más fuertes en el interior proteico (Kumar y Nussinov, 1999). Estas interacciones pueden estabilizar o desestabilizar las proteínas, ya que son múltiples sus variantes, pudiendo estar internos o en la superficie proteica, formar además enlaces de hidrógeno, estar aislados o formando parte de una extensa red de interacciones electrostáticas, etc. La mayor parte de ellos estabilizan la proteína en estado nativo con una contribución de aproximadamente 3,5-4,0 kcal mol⁻¹ (Kumar y Nussinov, 1999; Hendsch y Oidor, 1994). Estudios de mutagénesis de puentes salinos (Glu34-Lys38) en la proteína de unión al ADN, HU de *Bacillus stearothermophilus* (Kawamura *et al.*, 1997), indican que estas interacciones incrementan la estabilidad térmica y que este efecto es más marcado en proteínas termófilas.

A pH neutro, como norma general, son más numerosas las interacciones de tipo atractivo que las repulsivas, por ello, éstas contribuyen a la estabilidad proteica. Estudios más recientes han concluido que estas interacciones también contribuyen a la estabilidad de los estados desplegados, por lo que su contribución neta a la estabilidad proteica es pequeña (Pace *et al.*, 2000). Los pares iónicos de la superficie proteica contribuyen con menos de 1 kcal mol⁻¹ a la estabilidad (Marti y Bosshard, 2003), en cambio los puentes salinos contribuyen con más de 4 kcal mol⁻¹ (Anderson *et al.*, 1990). Hay que tener en cuenta que como el número de puentes salinos suele ser pequeño, la contribución de éstos a la estabilidad también lo es.

2.6.1.3. Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas son las interacciones que aparecen entre dos residuos apolares que se encuentran en el interior proteico, siendo responsables del proceso de plegamiento. En principio se pensó que eran las fuerzas dominantes de la estabilidad proteica, pero se ha comprobado que los enlaces de hidrógeno y las interacciones de van der Waals de los grupos polares contribuyen casi del mismo modo (Dill, 1990). Muchos estudios de mutagénesis dirigida de diversas proteínas, en los que se ha sustituido un residuo apolar por otro de la misma naturaleza pero de menor tamaño, han concluido que la reducción del tamaño del residuo y, por tanto, de la interacción hidrofóbica, al quedar en el interior proteico huecos de mayor tamaño, desestabilizan la molécula proteica aproximadamente en 1,5 ± 0,5 kcal mol⁻¹ (Pace, 1992).

Estos valores son muy próximos a los que aparecen cuando desaparece un enlace de hidrógeno. Los residuos apolares de la proteína se orientan hacia el interior de la molécula, alejándose la mayor distancia posible del agua y produciendo, por tanto, un aumento entrópico, ya que si estos residuos se situaran en contacto con el agua, dichas moléculas se unirían más entre ellas formando una especie de jaulas e intentarían alejarse lo más posible de dichos residuos apolares (Pace, 1992). Este aumento de entropía del disolvente genera una parte de la energía significativa que dirige el plegamiento proteico.

2.6.1.4. Enlaces de hidrógeno y grupos polares internos

En una proteína desplegada, muchos grupos polares forman enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. En cambio, en una proteína plegada, la mayoría de los grupos polares forman uno o más enlaces de hidrógeno intramoleculares con otros grupos polares o apolares del interior proteico. En las proteínas plegadas, suele existir un promedio de 1,1 enlaces de hidrógeno por residuo (Stickle *et al.*, 1992). Los enlaces de hidrógeno más frecuentes son $>C=O\cdots H-N<$ (68,1%), $>C=O\cdots$ Cadena lateral (10,9%), $>H-N\cdots$ Cadena lateral (10,4%) y Cadena lateral \cdots Cadena lateral (10,6%) (Stickle *et al.*, 1992). La energía del enlace de hidrógeno depende de la constante dieléctrica y de su geometría. Una gran parte de los estudios experimentales indican que cada enlace de hidrógeno intramolecular contribuye entre 1 y 2 kcal mol⁻¹ a la estabilidad proteica (Myers y Pace, 1996). Todos los estudios de mutagénesis dirigida, que han sustituido un residuo polar (Thr) por uno apolar (Val), indican que la proteína con genotipo salvaje es más estable que la proteína con la mutación en ~ 2 kcal mol⁻¹ (Pace, 2001). En otras ocasiones, la mutación contraria, de apolar por polar (Val por Thr), no estabiliza la proteína, sino que ejerce el efecto contrario. Por ello, la contribución de un grupo polar interno depende, en gran medida, del entorno. Los grupos apolares internos, generalmente, estabilizan la proteína en estado nativo. Sin embargo, los grupos polares internos estabilizan el estado nativo sólo cuando el sitio está acomodado para albergar ese residuo. Normalmente, si estos grupos forman enlaces de hidrógeno, contribuyen favorablemente a la estabilidad proteica, debido a un aumento de la densidad de empaquetamiento en el interior proteico que incrementa la contribución de las fuerzas de van der Waals, las cuales juegan un papel muy importante en la estabilidad proteica. Inicialmente se pensaba que los grupos apolares internos (efecto hidrofóbico) eran la fuerza dominante en la estabilización de proteínas globulares. Estudios posteriores indicaron que no era así y que los grupos polares internos contribuían más a la estabilización proteica. En una proteína nativa, la densidad de empaquetamiento es muy alta y, como consecuencia de ello, las fuerzas de van der Waals son más grandes en estado nativo que en el estado desplegado. Además, a estas fuerzas contribuyen en mayor medida los residuos polares que los no polares. Por ello, los enlaces de hidrógeno, de manera indirecta, incrementan la densidad de empaquetamiento (Schell *et al.*, 2006).

2.7. ESTABILIDAD DE LAS PEROXIDASAS

La cHRP es la peroxidasa hémica más estudiada. Desde que se descubrió su elevada estabilidad, 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 peroxidadas. Se ha comprobado que las estructuras secundaria y terciaria de la HRP es similar a las de PNP, ARP (*Arthromyces ramosus* peroxidasa), LiP y CiP.

Son muchas las peroxidadas de clase III caracterizadas estructural y bioquímicamente, y muy variados los estudios que indican la estabilidad térmica, química y frente al pH de estas enzimas. Aunque la HRP es la primera que se caracterizó y la más empleada industrialmente, en los últimos 15 años se han encontrado peroxidadas en otras especies vegetales mucho más estables que la cHRP y con un futuro biotecnológico muy prometedor.

Si se compara la estabilidad frente a diferentes agentes desnaturizantes de la cHRP con la CcP, perteneciente a la clase I, se observa por dicrósmo circular en el UV que la cHRP mantiene el 50% de su estructura secundaria en presencia de urea 8 M (Pappa y Cass, 1993) y la pierde en presencia de hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) 1,2-2,7M. Sin embargo, la CcP pierde su estructura secundaria en presencia de urea 3,4-5M y de GuHCl 1,2-2,7M, siendo en ambas proteínas la pérdida de la estructura secundaria un proceso reversible de dos estados ($N \leftrightarrow U$) y observándose que es más estable la cHRP (Tsaprailis *et al.*, 1998).

En las hemoproteínas, la fluorescencia intrínseca del Trp es una medida indirecta de la transferencia de energía entre el residuo aromático y el grupo hemo. Cuando se altera la cavidad del grupo hemo, se altera dicha transferencia energética, reduciéndose, y aumentando la intensidad de fluorescencia, lo cual va normalmente acompañado de un desplazamiento batocrómico del máximo de fluorescencia. Este hecho se observa en ambas proteínas, en el caso de la CcP el máximo se desplaza a 350 ± 2 nm en urea 5,5 M o GuHCl 2,2 M, y en el caso de la cHRP se desplaza a 348 ± 2 nm en GuHCl 2,6 M. Cuando se trata la HRP con AEDT (2 mM, 18 h), agente quelante de los iones Ca^{2+} , la enzima se vuelve más sensible a la desnaturización química (GuHCl 0,45M), por lo que estos iones están muy implicados en la estabilidad proteica. Si se trata la enzima con ditioneitol (DTT) (30 mM, 18 h), agente reductor de los enlaces disulfuro, se observa, también, una mayor sensibilidad a la desnaturización química (GuHCl 1,9M). Estos resultados sugieren que los enlaces disulfuro contribuyen menos a la estabilidad termodinámica que los iones Ca^{2+} . Estos elementos hacen que las peroxidadas de clase III sean más estables que las de clase I y II.

Se observa en la desnaturalización química con urea de la HRP que, al usar bajas concentraciones del agente desnaturalizante (0,01-1M), no hay alteración alguna en su estructura secundaria ni en su actividad enzimática, alterándose, sin embargo, su estructura terciaria (Emdadul Haque *et al.*, 1999).

Estudios de espectroscopia de IR han demostrado que la HRP retiene su estructura desde temperatura ambiente (TA) a 10 K. Los cambios que se observan en las bandas de los enlaces amida se atribuyeron a un aumento de enlaces de hidrógeno entre estos grupos y el agua al que están expuestos a esas bajas temperaturas (Kaposi *et al.*, 1999).

Las peroxidasas son enzimas altamente estables. Se ha observado que otras enzimas que poseen el mismo grupo prostético (hemo b), como la metmioglobina, no poseen esa estabilidad, como consecuencia de la secuencia de aminoácidos de la enzima y de las interacciones que existen entre estos aminoácidos. Ya se explicó anteriormente que en el entorno del grupo hemo hay residuos altamente conservados entre los que se forma una red de puentes de hidrógeno, habiéndose estudiado cómo afectan éstos a la estabilidad proteica mediante técnicas de DC y fluorescencia (Chattopadhyay y Mazumdar, 2000).

Los cambios en el espectro DC en la región de 222 nm corresponden a cambios en la estructura secundaria, atribuyéndose, no solo, esta banda a los enlaces peptídicos sino también a los residuos aromáticos (cHRP tiene 26: 5 Tyr, 1 Trp y 20 Phe), y los cambios en la región de 400 nm (banda Soret) a cambios en la estructura terciaria alrededor del grupo hemo. La desnaturalización térmica, seguida por medidas de DC, indica una primera modificación de la estructura terciaria entre 35-55 °C, manteniéndose completamente intacta la estructura secundaria (pre-globulo fundido), una segunda modificación de la estructura terciaria (pérdida del grupo hemo) entre 50-93 °C que va acompañada de una alteración completa de la estructura secundaria. Se observa que la estabilidad térmica desciende al tratar la enzima con DTT o con AEDT, así como con el pH, ya que al modificar éste se distorsiona la red de enlaces de hidrógeno que hay en el entorno del grupo hemo. En este sentido, su estructura se mantiene intacta a pH 6,5, la estructura terciaria se empieza a distorsionar a pH 5,5, sin embargo la secundaria lo hace a pH 4,5. Por ello, se concluye diciendo que los enlaces de hidrógeno, también, son unos elementos necesarios para la alta estabilidad proteica. Al igual que la denaturalización térmica, la desnaturalización química con GuHCl pasa por un estado intermedio (pre-globulo fundido). Sin embargo, el proceso de desnaturalización corresponde a una transición simple entre dos estados: el nativo y el desnaturalizado en el caso de la apo-HRP (Pappa y Cass, 1993). Se observa que la desnaturalización química es un proceso reversible. En cambio en la holo-HRP, la desnaturalización ocurre en dos pasos, en primer lugar se modifica la cadena polipeptídica y, en segundo lugar, pierde el grupo hemo. Cuando se renaturaliza, primero recupera su estructura secundaria

y, finalmente, incorpora el grupo hemo. Normalmente, hay que añadir hemo al medio de renaturalización porque hay parte que sufre agregación y, si esto ocurre, la proteína no recupera la actividad máxima, indicando que el grupo hemo no es necesario para el plegamiento proteico.

Otros estudios han demostrado la elevada estabilidad de la HRP frente al pH (2,2-12,0) y, por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se ha estudiado la desnaturalización térmica al pH extremo de 3,0, donde la proteína aún mantiene su estructura y actividad intacta. La cHRP tiene una T^* de 344,4 K y una E_A de 38,4 kcal mol⁻¹ (Pina *et al.*, 2001). Se observa que esta desnaturalización térmica es un proceso irreversible y dependiente de la velocidad de barrido, lo cual sugiere un control cinético. Se observa, también, que la enzima pierde actividad enzimática con el aumento de temperatura, observándose, también, cambios en su estructura secundaria y en el entorno del Trp117 por medidas de DC a 222 nm y de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 297$ nm), respectivamente. Por medidas de DC, se puede estimar el contenido de estructuras secundarias en una proteína. La cHRP, en estado nativo a pH 3,0 tiene abundancia de α -hélices (42%), un 11% de hojas β , un 21% de giros y un 26% de estructuras desordenadas. En cambio, cuando la proteína se desnaturaliza térmicamente, se reducen en gran medida las α -hélices (27%), existe un 17% de hojas β , un 18% de giros y aumentan las estructuras desordenadas (38%). El incremento de hojas β se debe, posiblemente, a un proceso de agregación intramolecular, lo cual va acompañado de un aumento de la turbidez durante el proceso de agregación (Pina *et al.*, 2001).

Estudios similares a los anteriores de la aPrx indican que el proceso de desnaturalización térmica a pH 3,0 es irreversible y se ajusta a un modelo cinético simple de dos estados, como en el caso de la cHRP. La aPrx tiene una T^* de 315,6 K y una E_A de 68,6 kcal·mol⁻¹ (Zamorano *et al.*, 2004). El contenido de estructuras secundarias de la aPrx en estado nativo es mayoritario en α -hélices (47,2%), un 6,2% hojas β , un 26,6% de giros y un 20% de estructuras desordenadas: En la proteína desnaturalizada, se reducen notablemente las α -hélices (30,4%), existiendo un 9,0% de hojas β , un 23,2% de giros y aumentando las estructuras desordenadas (37,4%). La cHRP es más termoestable que la aPrx.

La SBP tiene una estabilidad térmica superior a la cHRP. La desnaturalización térmica también es un proceso irreversible y ocurre a 90,5 °C (pH 8,0), en cambio la cHRP lo hace en las mismas condiciones a 81,5 °C y la CcP a 65,0 °C (McEldoon y Dordick, 1996). Otros estudios comparativos de cHRP y SBP indican que en la segunda la estabilidad térmica se reduce notablemente al añadir agentes químicos, siendo la variación lineal, lo cual indica que ambos factores alteran del mismo modo la estructura proteica. La SBP se desnaturaliza completamente con GuHCl 7,5 M. Al utilizar DTT, a pH neutro, la T_m se reduce de 86 a 75 °C en SBP, y de 74 a 65 °C en cHRP. Por ello, los enlaces disulfuro contribuyen un 13 y un 12 % a la

estabilidad térmica en SBP y cHRP, respectivamente. En cambio, si se elimina el grupo hemo de la SBP, se observa que la T_m cae a 38 °C, siendo, por ello, la contribución del grupo hemo a la estabilidad térmica del 65%. La pérdida de la estructura terciaria mediante desnaturalización térmica a pH neutro, por medidas de elipticidad molar a 410 nm ($[\theta]_{410}$), registra dos transiciones tanto en SBP como en cHRP, a 43 y 45 °C, respectivamente, lo cual genera una reducción de la elipticidad observada del 13% en SBP y del 30% en cHRP, lo que indica que la cavidad hémica es más estable en la SBP y, por tanto, más resistente a la desnaturalización térmica. El descenso de pH, tanto en SBP como en cHRP, reduce la estabilidad térmica porque altera enlaces de hidrógeno, estabilizadores tanto de la estructura secundaria como de la cavidad hémica. Si se comparan los parámetros termodinámicos, se encuentra que $\Delta G^\circ(\text{H}_2\text{O})_{\text{SBP}}$ es de $\sim 43 \text{ kJ mol}^{-1}$, en cambio, el $\Delta G^\circ(\text{H}_2\text{O})_{\text{cHRP}}$ es de $\sim 17 \text{ kJ mol}^{-1}$, indicando que la estabilidad conformacional de la SBP es 2,5 veces mayor que la de cHRP (Amisha Kamal y Behere, 2002).

La peroxidasa de cebada (BP1) también se ha caracterizado estructural y funcionalmente. En ella se observa una estabilidad en un margen de pH 3,0-11,0, modificándose, sin embargo, su banda Soret con el pH, en ese intervalo. Es una enzima térmicamente muy estable, con una temperatura de transición de 75 °C (pH 6,6) y de 67 °C (pH's 4,0 y 8,3) (Rasmussen *et al.*, 1997).

Una peroxidasa recientemente estudiada es la peroxidasa de alforfón (*Fagopyrum esculentum*), especie vegetal que se usa para la fabricación de tallarines en Japón. Se han encontrado en ella dos isoenzimas, POXI y POXII, las cuales tienen una estabilidad térmica no habitual en las peroxidases de plantas. La POXI es más estable, manteniendo su actividad entre 0-30 °C pero a 40 °C perdiendo más del 50%. La POXII es estable entre 0-20 °C y, por encima de 30 °C, el 50% de la enzima se encuentra en estado desnaturalizado (Suzuki *et al.*, 2006).

El sorgo, quinto cereal utilizado a nivel mundial después del arroz, maíz, trigo y cebada, contiene como isoenzima mayoritaria una peroxidasa catiónica (SPC4), de la que existen dos glicofomas I y II, con masas moleculares de 34 y 35 kDa y porcentajes de glicosilación de 3,0 y 6,7 %, respectivamente. Su estructura secundaria esta compuesta principalmente por α -hélices ($42 \pm 6\%$), hojas β ($35 \pm 7\%$) y giros β ($24 \pm 7\%$), valores similares a los de otras peroxidases de plantas. Mantiene su actividad enzimática a 25 °C en un margen de pH comprendido entre 3,0 y 7,0. Su estabilidad térmica aumenta notablemente al añadir 0,7 mM CaCl_2 . Sin calcio añadido, T_m es de 67 °C, y al adicionarlo aumenta a 82 °C. En las mismas condiciones, la SBP, la más estable térmicamente, tiene un T_m de 90 °C. No se observan cambios en la estructura secundaria de la SPC4 al añadir el catión metálico, disminuyendo, sin embargo, la intensidad intrínseca del Trp y generándose un cambio en las propiedades eléctricas en torno al grupo hemo (Dicko *et al.*, 2006).

Un grupo de peroxididasas con estabilidades muy altas son las que se encuentran en las hojas de plantas tropicales como las palmeras (Sakharov, 2003). En los últimos años, el número de peroxididasas de palmas que se están caracterizando ha aumentado notablemente. Entre ellas podemos citar la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), palma africana (*Elaeis guineensis*), palma datilera (*Phoenix dactylifera*) y palma *Chamaerops excelsa*, todas con elevada estabilidad térmica y frente a los cambios de pH.

La primera peroxidasa de palma completamente caracterizada fue la peroxidasa de palma africana (*Elaeis guineensis*). Su desnaturalización térmica a pH 3,0 es irreversible, dependiente de la velocidad de barrido y es, por tanto, un proceso controlado cinéticamente, como ocurría con la cHRP (Pina *et al.*, 2001) y la aPrx (Zamorano *et al.*, 2004). La AOPTP tiene una T^* de 347,5 K y una E_A de 99,7 kcal mol⁻¹ (Rodríguez *et al.*, 2002). Es estable en el margen de pH 2,2-12,0. Por ello, es la peroxidasa más estable caracterizada hasta el momento. El contenido de estructuras secundarias de la AOPTP intacta a pH 3,0 es de un 14,9% de α -hélices, 37,8% de hojas β , 20,2% de giros y 29,7% de estructuras desordenadas. Sin embargo, la proteína desnaturalizada térmicamente a ese mismo pH posee un 11,7% de α -hélices, 23,1% de hojas β , 14,3% de giros y 49,6% de estructuras desordenadas. Se observan grandes diferencias con otras peroxididasas hémicas y ello se debe a que las peroxididasas de palma tienen muy poca homología con el resto (< 20%). Puede ser que este cambio en la estructura secundaria sea el responsable de la mayor estabilidad de este tipo de peroxididasas. La estabilidad térmica se ve reducida al tratarla con DTT, AEDT y GuHCl (Sakharov y Sakharova, 2002). La proteína mantiene el 100% de su actividad con GuHCl 4 M. Los enlaces disulfuro y los iones Ca²⁺ son los elementos estructurales responsables de su elevada estabilidad. La red de enlaces de hidrógeno en la cavidad hémica también estabilizan la proteína, pero en menor cuantía.

La peroxidasa de palma más recientemente caracterizada es la peroxidasa de las hojas de la especie *Chamaerops excelsa* (CEP) (Zamorano *et al.*, 2009). Es una peroxidasa aniónica con una masa molecular de 50 \pm 2 kDa, presentando un estado dimérico en solución y siendo estable en un margen de pH comprendido entre 2,0 y 12,0. La desnaturalización térmica de dicha enzima a pH 3,0 proporciona los siguientes parámetros cinéticos: T^* de 345,0 \pm 0,2 K y una E_A de 106,2 \pm 1,6 kcal mol⁻¹. Esta peroxidasa presenta una estabilidad térmica muy próxima a la de la AOPTP. El contenido de estructuras secundarias de la CEP intacta a pH 3,0 es de un 38% de α -hélices, 7% de hojas β , 22% de giros y 33% de estructuras desordenadas. La proteína desnaturalizada térmicamente a ese mismo pH posee un 10% de α -hélices, 28% de hojas β , 15% de giros y 47% de estructuras desordenadas.

Han sido caracterizadas otras peroxididasas de palma con elevada termoestabilidad. La peroxidasa de palma real mantiene su actividad a pH 8,0 después de 1 h de incubación a 70 °C y sólo a 90 °C la enzima

empieza a desactivarse (Sakharov *et al.*, 2001). En el caso de la peroxidasa de palma *Trachycarpus fortunei*, mantiene la actividad enzimática a pH 7,5 después de 1 h de incubación a 80 °C, siendo menos estable a pH's ácidos. Un estudio cinético a pH 3,0 indica que se inactiva entre 61 y 67 °C con $E_A = 76 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Caramyshev *et al.*, 2006). Es una peroxidasa menos estable térmicamente que la peroxidasa de palma africana (Rodríguez *et al.*, 2002).

La CcP (clase I) es estable a TA en un margen de pH comprendido entre 4,0 y 8,0 (Dowe y Erman, 1985). El 50% de sus residuos (294) se encuentran en forma de α -hélices. Hay 13 segmentos helicoidales de 6-19 residuos cada uno de ellos (Finzel *et al.*, 1984). La desnaturalización térmica presenta dos transiciones, a T_m de ~ 44 y ~ 63 °C, independientes de la concentración proteica y que varían con el pH. A pH's ácidos, la desnaturalización térmica es un proceso irreversible. La proteína tiene dos dominios, el dominio I que contiene los extremos N- y C-terminal con una región flexible que es la que se despliega a baja temperatura, y un dominio II, que junto con el grupo hemo, se despliegan en la transición alta (Kresheck y Erman, 1988).

Algunas de las peroxididasas de origen fúngico (clase II) también han sido caracterizadas bioquímicamente. La MnP de *Lenzites betulinus* (M = 40 kDa, pl = 6,2) tiene una alta estabilidad térmica, reteniendo el 60% de su actividad después de una incubación de 1h a 60 °C. La MnP de *Phlebia chrysosporium* se inactivó completamente después de una incubación de 15 min a 60 °C (Hoshino *et al.*, 2002). La MnP de *Irpex lacteus* tiene un pH óptimo de 6,0, reteniendo a los pH de 5,5 y 7,5 tan sólo el 10% de su actividad. Su temperatura óptima es de 35 °C, perdiendo a las temperaturas de 25 y 50 °C $\sim 60\%$ de su actividad (Shin *et al.*, 2005).

Se observa que todas las peroxididasas (clases I, II y III) presentan elevadas estabilidades térmicas y frente a los cambios de pH, si bien las peroxididasas de plantas son las más estables debido a elementos estructurales (Ca^{2+} , glicanos, puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno, residuos altamente conservados en el entorno del grupo hemo) que protegen la enzima de la desnaturalización. Estos elementos no se encuentran en las peroxididasas de clase I y se encuentran en menor proporción en las peroxididasas de clase II. Por todo ello, no cabe duda que las peroxididasas de plantas son un grupo enzimático con un futuro biotecnológico muy prometedor.

3. Objetivos

Las peroxidasas son un grupo enzimático ampliamente distribuido en los reinos animal y vegetal. A lo largo del S. XX muchos han sido los grupos de investigación que han caracterizado bioquímicamente nuevas peroxidasas procedentes de diferentes fuentes, en su mayor parte, vegetales: 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 en purificar estas enzimas y hacer estudios de estabilidad frente al pH, la temperatura y diferentes agentes químicos desnaturalizantes. En la década de los 90, el grupo de I. Sakharov comenzó a aislar y estudiar las peroxidasas de especies tropicales (palmas), cuando se conoció su elevada estabilidad. Nuestro grupo se decantó por realizar estudios de estabilidad de este tipo de peroxidasas (rábano picante, palma africana, peroxidasa aniónica de cacahuete, palma real y palma *Chamaerops excelsa*). Se observó que son enzimas termoestables, que poseen un intervalo de pH muy amplio en el que son activas y que además poseen una elevadísima actividad en diferentes situaciones. El interés que aporta esta elevada estabilidad es que para muchas aplicaciones biotecnológicas se requieren pH's bajos para que los procesos sean óptimos para el medio ambiente. Por ello, nuestro grupo siempre ha realizado los estudios de estabilidad a pH 3,0, pH al que la enzima retiene el 100% de su actividad y su estructura nativa intacta. Los objetivos del actual trabajo son:

- Elegir de entre varias especies de palmas, la que posea más actividad peroxidasa, para, a continuación, purificar dicha enzima.
- Optimizar el proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Hasta el momento se habían purificado peroxidasas de palmeras, pero los rendimientos eran muy escasos.
- Caracterizar bioquímicamente la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), determinando su masa molecular, pl, factor Rz, contenido en carbohidratos, coeficiente de extinción molar y estado de agregación.
- Llevar a cabo diferentes estudios de estabilidad térmica, utilizando como técnica la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para, así, poder caracterizar su proceso de desnaturalización y, si fuera reversible, calcular sus parámetros termodinámicos. Estos estudios se realizarán aplicando, además, las técnicas de dicroísmo circular (DC) y Fluorescencia, para, finalmente, comparar los parámetros obtenidos.
- Estudios de estabilidad frente a los cambios de pH, curvas de titulación proteica.
- Estudios de estabilidad frente a la presencia de agentes químicos desnaturalizantes, para determinar los parámetros del desplegamiento de esta enzima y compararlos con los datos de desnaturalización térmica.

- Estudios cinéticos para, de modo comparativo, analizar cuáles son los mejores sustratos para esta enzima y para poder comparar sus parámetros cinéticos con los de otras peroxidasa ya estudiadas. Estos estudios se complementan con el análisis de inhibición por sustrato.
- Análisis del mecanismo cinético que sigue la peroxidasa en su reacción de oxidación.
- Caracterización espectral de los estados enzimáticos intermedios durante la reacción catalítica.
- Análisis de su estructura secundaria mediante DC y de su estructura terciaria mediante fluorescencia y estudios de actividad.
- Determinación de la secuencia primaria mediante espectrometría de masas complementada con técnicas de Biología Molecular.
- Determinación de su estructura tridimensional mediante difracción de Rayos X. Se complementan estos resultados con un análisis de acoplamiento estadístico (SCA).

El objetivo final es definir una enzima con unas características 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, beneficioso para el Medio Ambiente.

4. Materiales y Métodos

4.1. APARATOS Y MATERIAL

- Agitadores magnéticos.
- Aparato de electroforesis vertical en placa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Balanza analítica Precisa 40SM-200^a (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 10.000 (12 ml) y MWCO 10.000 (0,1-0,5 ml) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL).
- Centrifugas Amicon Ultra 15 de MWCO 10.000 y 30.000 (Millipore Corp., Billerica, MA).
- Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B Superspeed (E.I du Pont Instruments Canada Company, Ontario L5M2H3, Canadá).
- Centrifuga Allegra™21R (Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834-3100, USA).
- Columna cromatográfica con camisa de 1,5 x 50 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Columna cromatográfica de 0,5 x 10 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Columna cromatográfica de Superdex 200 10/30 HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- Columna cromatográfica de fase reversa Lichrosphere RP100C₁₈ (250 x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Amersham Biosciences).
- Conductímetro ATC HI 9835 (PCE Group Ibérica S.L., 02500, Albacete, España).
- 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 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).
- Espectrofotómetro de absorción UV-Visible Hitachi U-2000 (Hitachi Co., Ltd. Tokio, Japón).
- Espectrómetro de masas MALDI-TOF, modelo Voyager-DE-Pro (Applied Biosystems, Framingham, USA).
- Espectrómetro de masas QTrap (Applied Biosystems, Profana, Dinamarca).
- 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).
- IEF Model 111 Mini IEF Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA).
- Jeringas (Hamilton Company CH-7402 Bonaduz, GR, Suiza).
- Liofilizador Benchtop 3L (The Virtis Company, INC. Gardiner, New York 12525, USA).
- Material de uso corriente en un laboratorio de Bioquímica.
- Membrana de diálisis de celulosa de 76 mm de anchura que retiene proteínas con un peso molecular > 12.000 Da (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63103, USA).
- 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.
- Picadora doméstica (Grupo Moulinex, 92979, París, Francia).
- 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).
- Secuenciador de ADN modelo 377DNA (Applied Biosystems, Profana, Dinamarca).
- Sonda de temperatura (Omega Engineering, Inc. New Cork, USA).
- Termociclador Touch-Down (Applied Biosciences Inc. Foster City, CA 94404, USA).
- Ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I (Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834-3100, USA).
- Ultracentrífuga Beckman Optima Class S XL-100K (Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834-3100, USA).

4.2. REACTIVOS

- En el proceso de purificación se ha utilizado polietilenglicol 10000 (PEG), sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄), fosfatos tales como NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄, NaCl, TRIS-HCl, todos ellos productos de gran pureza de Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Se han utilizado como sustratos de actividad peroxidasa guayacol (2-metoxifenol), ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal diamónica, pirogallol (1, 2, 3-bencenotriol), o-dianisidina, dihidrocloruro de o-fenilendiamina, catecol (1,2-bencenodiol) y ácido ferúlico, todos ellos de elevada pureza procedentes de Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de Merck (Darmstadt, Alemania). Ácido clorhídrico (HCl), hidróxido sódico (NaOH), hidrocloreuro de guanidina sólido, hidrocloreuro de guanidina (solución 8 M), ácido cítrico, citrato sódico y tampón HEPES son de Sigma (St. Louis, MO, USA). Ácido bórico y ácido perclórico son de Panreac (Barcelona, España).
- Los reactivos necesarios para llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida como: 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 (St. Louis, MO, USA). El β-mercaptoetanol es de Merck (Darmstadt, Alemania). 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).
- Las resinas utilizadas durante el proceso de purificación son Fenil-Sefarosa CL-4B de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y DEAE-Toyopearl 650M de Tosoh corporation (Tokio, Japón).
- Para la determinación proteica por el método de Lowry se utilizan albúmina de suero bovino (BSA) y carbonato sódico (Na₂CO₃) de Sigma (St. Louis, MO, USA). El sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O), el tartrato sódico y el reactivo folin-ciocalteu son de Panreac (Barcelona, España).
- Los reactivos usados en las técnicas de Biología Molecular son bicarbonato amónico (BCA), 4-vinilpiridina, acetonitrilo (ACN), ácido trifluoroacético (TFA), yodoacetamida (IAM), ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, dietilpirocarbonato (DEPC), todos ellos de Sigma (St. Louis, MO, USA). La tripsina de páncreas bovino es de Roche Farma, S.A (Madrid, España). El kit para la extracción

de ARN de plantas es de Invitrogen (Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, USA). El ditiotreit ol (DTT), el tampón de First strand 5x, el inhibidor de la ribonucleasa, la retrotranscriptasa del virus de la leucemia *Moloney Murine* (MMLV RT) y el vector pGEM-T son de Promega Corporation (Madison, WI 53711, USA). Los dNTP son de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania). El linaje de *E. coli* DH5 α es de Novagen (Madison, WI, USA).

- Los reactivos usados en las técnicas citolográficas son tampón MES y etilenglicol, ambos de Sigma (St. Louis, MO, USA).
- El marcador de PM para SDS-PAGE Novex Sharp Pre-Stained es de Invitrogen (Invitrogen Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, USA).
- En isoelectroenfoque se ha utilizado el kit de calibración de amplio rango: pI 4,45-9,6 de Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Kit de calibración de bajo peso molecular (LMW) para una columna de Superdex 200 10/30 HR (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).
- 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).

4.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.3.1. PURIFICACIÓN DE PEROXIDASA DE PALMA REAL

Se purifica la peroxidasa que se encuentra en las hojas de la palmera real de Cuba (*Roystonea regia*), especie tropical muy escasa en la península. Las hojas proceden de un ejemplar de 7-8 años que se encuentra en el campus de la Universidad de Alicante en San Vicente del Raspeil. Es en la Comunidad Valenciana donde existe una mayor variedad de palmeras debido a su adecuado clima.

El proceso de purificación consta de las siguientes etapas (Esquema 3):

1. Recolección y limpieza de las hojas
2. Homogeneización.
3. Extracción de pigmentos por reparto bifásico.
4. Fraccionamiento cromatográfico:
 - 4.1. Cromatografía hidrofóbica.
 - 4.2. Cromatografía de intercambio iónico.
 - 4.3. Cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular.

♦ **Recolección y limpieza de las hojas**

El ejemplar de palmera que se usará para la purificación de la peroxidasa tiene una altura de 3 m, tronco oscuro y homogéneo muy característico de esta especie y seis brazos, de los cuales se corta uno para la recolección de sus hojas. Desde que se corta la rama hasta que comienza el proceso de purificación pasan 24 h (8 h a TA y 16 h a 4-5 °C).

En primer lugar, se eliminan todas las hojas de la rama, limpiándolas con un paño húmedo y quitándoles 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, se congelan en N₂ líquido y se Trituran con un picador doméstico (Moulinex). El proceso es bastante eficaz, ya que las hojas se reducen casi en su totalidad a polvo. Se pesa ese material, del cual se extraerá la proteína. La eliminación de la vaina central supone una pérdida de ~ 40% de su masa.

♦ **Homogeneización**

Se procederá a la extracción a 20 °C de las proteínas solubles, para lo cual se utiliza H₂O 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 pasará a la fase acuosa durante este proceso.

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 H₂O y se filtra como se explicó anteriormente. Es muy eficaz, con ayuda de las gasas, extraer la fase acuosa, utilizando la técnica de lavar la ropa. Se hace una estimación del volumen de H₂O que se pierde con el extracto cuando se filtra a vacío, la pérdida es de ~ 4%.

Una vez eliminado el material sólido, se centrifuga la fase acuosa para retirar lo que ha superado el proceso de filtración. Se usa una centrífuga a una velocidad de 10.000 rpm, a 4-5 °C durante 10-15 min. Se centrifugan fracciones de 50 ml, apareciendo un precipitado verde muy oscuro, de aspecto arcilloso, que se elimina fácilmente por decantación.

♦ 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, 10.000 wt) y sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄).

Sobre el extracto de las hojas, se adiciona un 14% (m:v) de PEG 10.000 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, ya que este hecho podría causar la desnaturalización de la enzima. Cuando todo el PEG se ha solubilizado, se mide de nuevo el volumen y se adiciona (NH₄)₂SO₄ al 10% (m:v) en fracciones de no más de 100 g con agitación suave hasta su completa disolución.

Esta solución se deja en reposo en un embudo de decantación durante 4-5 h a 4-5 °C para la formación de las dos fases, cada una de la cuales posee aproximadamente el 50% del volumen inicial. La fase superior, de color oscuro, es donde se encuentran la mayoría de 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. Esta fase se centrifuga a 10.000 rpm y 4-5 °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.

♦ 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.

-Cromatografía hidrofóbica

Esta cromatografía se lleva a cabo a TA con un equipo de baja presión. Se utiliza una columna de vidrio de 50 cm^3 ($1,4 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$) que se empaqueta manualmente con 45 cm^3 de Fenil-Sefarosa CL-4B. 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 III), se equilibra el relleno con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, $1,7 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a una velocidad de flujo 1 ml min^{-1} . Cuando se satura, se lava la columna con 4-5 volúmenes de tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, $2,0 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posteriormente se eluye la enzima con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, $0,2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a la misma velocidad de flujo, recogiendo 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 5,0 mM, pH 8,3, durante 24 h en cámara fría, con agitación constante, realizando un cambio de tampón. Este proceso es necesario para que funcione correctamente la siguiente cromatografía, pero con él hay un aumento de volumen del 20-25%. Por ello, la muestra dializada se concentra cuatro veces por centrifugación a 3.000 rpm, 4-5 °C, durante 40 min, con centricones de 10 kDa y 12 ml que permiten el paso de sales, agua y solutos de pequeño tamaño molecular a través de su membrana pero no de proteínas de elevada masa molecular.

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

← Aumento del efecto salino								
PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	CH_3COO^-	Cl^-	Br^-	NO_3^-	ClO_4^-	I^-	SCN^-
	NH_4^+	Rb^+	K^+	Na^+	Cs^+	Li^+	Mg^{2+}	Ba^{2+}
Aumento del efecto caotrópico →								

-Cromatografía de intercambio iónico

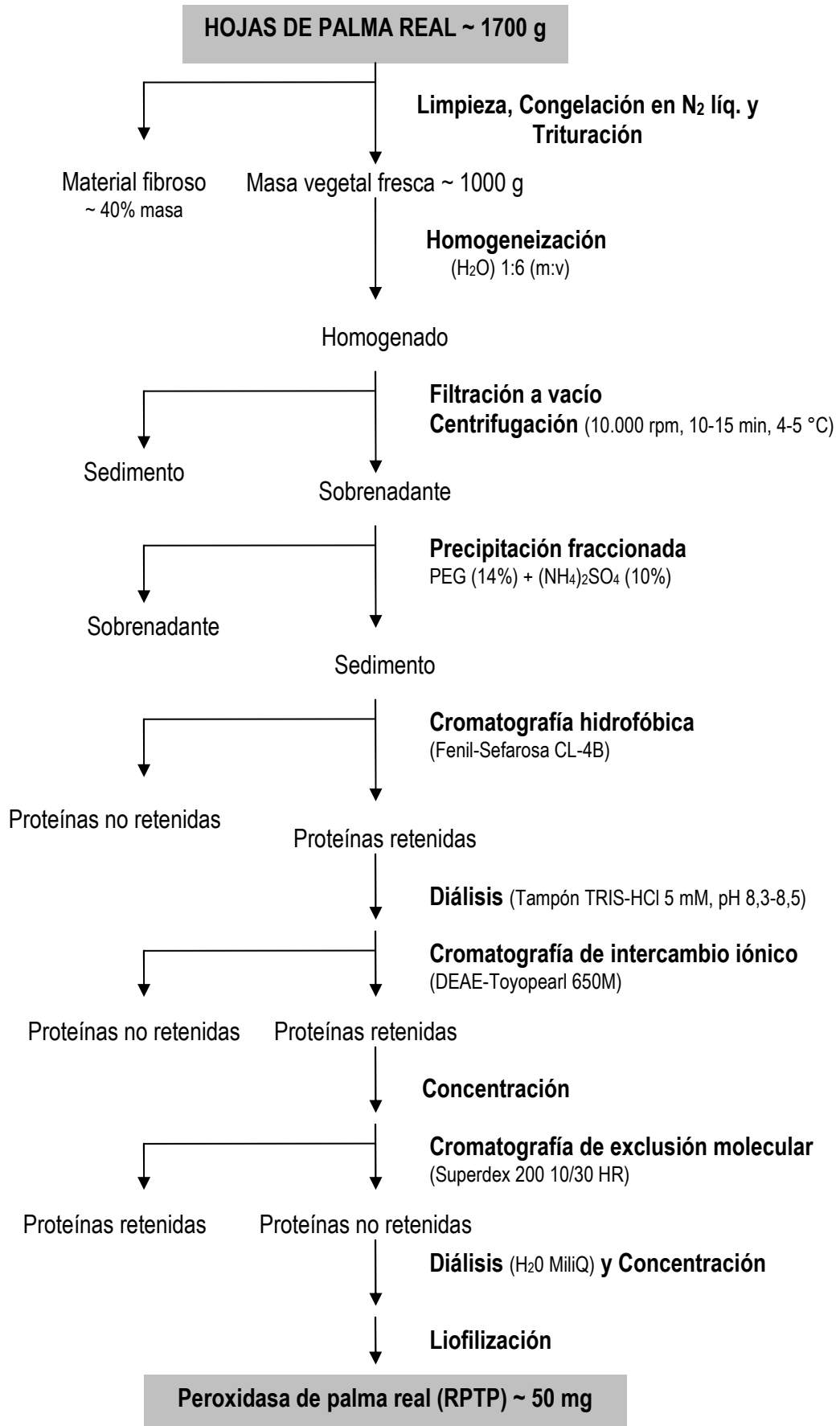
Esta cromatografía FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) se lleva a cabo a TA. Se empaqueta manualmente una columna de vidrio (1 cm x 30 cm), con 12 cm³ de DEAE-Toyopearl 650M (tamaño medio de partícula 40-90 µm y diámetro de poro 1000 Å), resina cargada positivamente con restos dietilaminoetil (-O-CH₂-CH₂-HN⁺-(C₂H₅)₂) a los que se unen las proteínas que estén cargadas negativamente. Se utiliza como tampón de equilibrado TRIS-HCl 5,0 mM, pH 8,1-8,5, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. 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 8,1-8,5, 1 M de NaCl, con un gradiente lineal de 0-300 mM de NaCl y una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹, recogiendo fracciones de 0,5 ml.

Todas las fracciones del pool se juntan y antes de pasarlas por la siguiente columna se concentran 8 veces con centricones de 10 kDa y 12 ml, a 3.000 rpm y 4 °C durante 40 min.

-Cromatografía de exclusión molecular o gel-filtración

Esta cromatografía FPLC se lleva a cabo a TA. Se utiliza como fase estacionaria Superdex 200 10/30 HR empaquetada comercialmente (matriz de agarosa y dextrano con un tamaño de poro de 13 µm, 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 8,1-8,5. La velocidad de flujo es de 0,5 ml min⁻¹.

La muestra obtenida de esta cromatografía se concentra empleando un centricon de 10 kDa en una centrífuga a 3.000 rpm y 4 °C durante 40 min. Se pierde un 1% de actividad en el filtrado. El concentrado se dializa frente a agua MiliQ 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 3. Representación esquemática del proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (RPTP).

4.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

4.3.2.1. Análisis de la actividad enzimática

La actividad peroxidasa se puede medir utilizando una gran variedad de sustratos tales como: ABTS, ácido ferúlico, catecol, guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina o pirogallol. Son el ABTS y el guayacol los más comúnmente utilizados para este fin. Los productos de oxidación de estos sustratos absorben en la región visible del espectro a diferentes longitudes de onda (Tabla IV).

Tabla IV. Características de los sustratos utilizados para medir la actividad peroxidasa. Los datos de concentraciones óptimas son los correspondientes a la peroxidasa de palma africana (Sakharov *et al.*, 2002). AH₂ corresponde al sustrato reductor.

Sustrato	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	T (°C)	t (min)	[AH ₂] (mM)	[H ₂ O ₂] (mM)
ABTS	414	31100	25	3-4	0,8	0,8
Ácido Ferúlico	318	6000	25	1-2	1,5	0,06
Guayacol	470	5200	25	3-4	18,0	4,9
Pirogallol	420	2640	25	3-4	4,0	4,0
o-Dianisidina	420	30000	25	3-4	3,0	0,1
o-Fenilendiamina	445	11100	25	3-4	2,0	0,75
Catecol	295	1700	25	2-3	14,0	2,0

La actividad peroxidasa se determina espectroscópicamente. Una alícuota de solución enzimática (1-20 μ l) se adiciona a 2 ml de tampón fosfato 10,0 mM, pH 6,0 que contiene 18,0 mM guayacol y 4,9 mM H₂O₂ como sustratos. Los cambios de absorbancia debidos al producto de oxidación del guayacol se siguen a 470 nm durante 3-5 min y 25 °C.

Una unidad de actividad peroxidasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ 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 (U mg⁻¹).

La medida de actividad está directamente relacionada con la pendiente de la recta $A_{470}(t)$ (Fig. 3). Los ajustes de regresión lineal poseen sus mejores coeficientes de correlación cuando los valores de absorbancia se encuentran entre $0(t_0)$ y $0,5 - 1(t_f)$.

En el cálculo de la actividad peroxidasa hay que tener en cuenta: el volumen de la alícuota de enzima, el volumen de la mezcla de reacción, un factor de conversión para expresar el resultado en 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 ~ 7%.

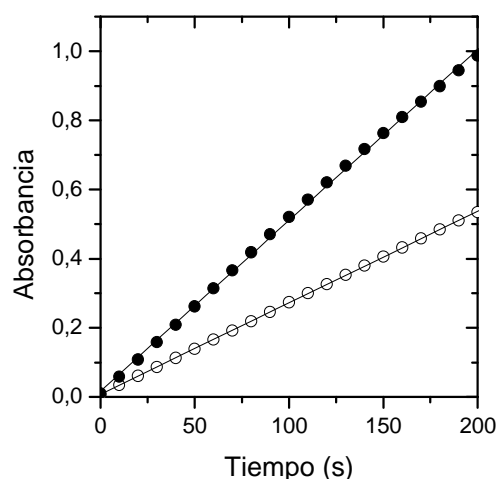


Figura 3. Curva cinética de la oxidación del guayacol con RPTP (1 μ l) a 470 nm.

Puntos blancos, concentración de peroxidasa 400 nM;

$$y = (0,00735 \pm 4,38633E-4) + (0,00265 \pm 3,75207E-6) x, (R = 0,99998 \pm 0,00104)$$

Puntos negros, concentración proteica 700 nM;

$$y = (0,01649 \pm 0,00361) + (0,00494 \pm 3,0867E-5) x, (R = 0,99963 \pm 0,00857)$$

La actividad enzimática expresada en U ml⁻¹, es de 61,2 y 114,0, respectivamente.

4.3.2.2. Análisis del contenido proteico en solución

Existen varios métodos para determinar la concentración de proteína en disolución. Los métodos más empleados son los de Bradford y de Lowry, midiéndose, en ambos, las absorbancias de determinados compuestos coloreados que se forman a partir de la proteína y que, por tanto, se pueden seguir espectrofotométricamente en la zona visible (Bradford, 1976; Lowry *et al.*, 1951).

Experimentalmente, en primer lugar, se construye una recta de calibrado a partir de una disolución madre de BSA 1 mg ml⁻¹ (M = 66 kDa, $\epsilon_{280} = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), con cantidades que oscilan entre 0 y 150 μ g (0-150 μ 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 μ l con agua MiliQ. Sobre este volumen se adicionan 2 ml de reactivo de cobre alcalino (1 ml de CuSO₄ al 1% (m:v), 1 ml de tartrato sódico al 2% (m:v) y 98 ml de Na₂CO₃ al 2% (m:v) en 0,1 M NaOH), se agita con el vortex y se incuba durante 10 min a TA. Pasado ese tiempo, sobre cada muestra se adicionan 100 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu, se agita con 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.

4.3.2.3. Análisis de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida

Cuando se purifica una proteína, hay que calcular su grado de pureza para estimar la eficacia del proceso de purificación. Además, si se quieren hacer estudios 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 tienen 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 de 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 masa 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 V). Se trabaja con unas concentraciones finales de proteína ~ 0,5 mg ml⁻¹ y las disoluciones utilizadas para realizar este tipo de electroforesis son las siguientes:

- Proteo-Gel: 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 de 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 β -mercaptoetanol al 4% (v:v).

La tinción del gel se hace de la siguiente manera:

- ◆ 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.
- ◆ 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 coomassie 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).
- ◆ Destinción: Suele ser suficiente decolorar con agua destilada durante 1 noche. Si se desea una decoloración más rápida, se puede lavar varias veces con una solución de ácido acético:etanol:agua (1:3:6 v:v:v).

Tabla V. Protocolo para la preparación de los geles concentrador y separador.

Reactivos	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
Proteo-Gel	330 μ l	1683 μ l
H ₂ O MiliQ	1500 μ l	2500 μ l
Solución A	630 μ l	
Solución B		1250 μ l
SDS 10%	33 μ l	50 μ l
TEMED	3 μ l	5 μ l
APS 10%	10 μ l	15 μ l

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

4.3.2.4. Determinación de pI

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 las proteínas en función de su pI (punto isoeléctrico, es decir, el 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 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 V (40 min).

El gel se tiñe de la misma manera que en el caso de la electroforesis. Debido a las características del gel y de la proteína en cuestión, en algunas ocasiones este proceso de tinción no funciona y se puede teñir

satisfactoriamente, para el caso de peroxidasas, con un sustrato cromogénico acompañado de peróxido de hidrógeno.

Se trabaja con unas concentraciones proteicas similares a las usadas en electroforesis, ~ 0,1-0,5 mg ml⁻¹. Del mismo modo, se puede estimar el pI de las proteínas utilizando para ello un kit de calibración de proteínas de pI conocidos. Representando la movilidad relativa (R_f) frente al pI, se construye una recta de calibrado, con la que se podrá conocer el pI de otras proteínas, interpolando su movilidad relativa en esa recta.

4.3.2.5. Determinación del coeficiente de extinción

Otros métodos más sencillos para determinar la concentración de proteínas en disolución se basan en el hecho de que las proteínas absorben luz en la zona ultravioleta del espectro (280 nm), debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp y Phe). El coeficiente de extinción molar de una proteína a una longitud de onda depende del número de residuos aromáticos que tiene. Así, al espectro de absorción, con un máximo alrededor de 280 nm, el aminoácido que más contribuye es el triptófano ($\epsilon_{278} = 5580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), seguido de la tirosina ($\epsilon_{275} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y de la fenilalanina ($\epsilon_{263} = 125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Si se conoce o se determina el coeficiente de extinción molar de la proteína (ϵ) a una longitud de onda determinada, aplicando la ecuación de Lambert-Beer, con una simple medida espectroscópica de su absorbancia a esa misma longitud de onda, se puede determinar la concentración proteica en disolución.

Además, conociendo el número de cada uno de estos aminoácidos en la secuencia proteica, con la herramienta ProtParam (parámetros de proteínas), del programa de proteómica ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) se puede calcular, de manera teórica, el coeficiente de extinción de la proteína a 278 nm. Asimismo, midiendo la absorbancia a esa longitud de onda, se puede conocer el % proteico de una disolución aplicando la ecuación de Lambert-Beer.

Existen una gran cantidad de métodos para determinar el coeficiente de extinción molar de una proteína (Pace *et al.*, 1995): análisis de la composición de aminoácidos (Benson *et al.*, 1975), método del peso seco (Hunter, 1966; Kupke y Dossier, 1978 y Nozaki, 1986), determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl (Jaenicke, 1974) y el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967; Gill y von Piel, 1989). Otros métodos para determinar el coeficiente de extinción están basados en medidas espectrofotométricas directas de muestras puras, o en técnicas colorimétricas como Lowry o Bradford, ya comentadas. Estas últimas requieren un gran consumo de muestra y, además, van acompañadas de errores.

De todos los métodos anteriormente citados, el más preciso es el método de Edelhoch que se basa en el conocimiento de la secuencia primaria de la proteína y en la suposición de que en una proteína desnaturizada, con hidrocloreto de guanidina 6 M, los únicos residuos aminoácidos que contribuyen a la absorbancia entre 276-282 nm son la tirosina, el triptófano y la cisteína (a, b y c son el número de Tyr, Trp y Cys de la proteína, respectivamente). De este modo, se tiene que:

$$\epsilon_{\text{GuHCl}} = a\epsilon_{\text{Tyr}} + b\epsilon_{\text{Trp}} + c\epsilon_{\text{Cys}} \quad (20)$$

$$\frac{A_{\text{GuHCl}}}{\epsilon_{\text{GuHCl}}} = C_{\text{desnaturizada}} \quad (21)$$

$$C_{\text{desnaturizada}} = C_{\text{nativa}} \quad (22)$$

$$\frac{A_{\text{nativa}}}{C_{\text{nativa}}} = \epsilon_{\text{nativa}} \quad (23)$$

Es decir, en primer lugar, dado que se conocen los coeficientes de extinción molar de tales aminoácidos, se puede conocer el coeficiente de extinción molar de la proteína desnaturizada (Ec. 20). Con este dato y midiendo la absorbancia a esa longitud de onda se conoce la concentración de la proteína desnaturizada (Ec. 21), como ésta será la misma que la de la disolución de proteína nativa (Ec. 22), midiendo la absorbancia de esta solución proteica nativa se puede determinar el coeficiente de extinción molar de la proteína nativa a esa longitud de onda (Ec. 23).

Si se comparan los coeficientes de extinción molar de proteínas determinados por el método de Edelhoch y experimentalmente, se comprueban diferencias que oscilan entre el 3,8 y el 14,9%, por lo que el método de Edelhoch presenta sus limitaciones. Entre ellas, asumir que las proteínas no contienen cromóforos que absorban a 280 nm, por lo que proteínas tales como catalasas, hemoglobina y peroxidasas, que tienen grupos prostéticos que absorben cerca del UV-cercano y Visible, no se pueden analizar de este modo. Además, supone que el cálculo de la composición de aminoácidos es correcto y hay que considerar que el simple error en un triptófano conllevaría una gran variación en el valor del coeficiente de extinción molar de la proteína.

Por todas estas limitaciones y por las características de la proteína objeto de este estudio, una peroxidasa cuyo grupo prostético es un grupo hemo, que absorbe en el UV-cercano, se ha decidido emplear una metodología tradicional, como es la medida de la absorbancia de diferentes disoluciones proteicas de concentración conocida por pesada.

En este sentido, se parte de una muestra proteica liofilizada ($14,3 \pm 0,1$ mg) que se disuelve en 10,0 ml de agua MiliQ (pH = 6,4). Se dializa esta disolución durante 24 h frente a agua MiliQ, con cambio del disolvente cada 2-3 h y en cámara fría (4-5 °C), con agitación constante. Esto se hace para retirar los posibles restos salinos de la última etapa del fraccionamiento cromatográfico. Pasado este tiempo, se liofiliza la muestra. Se pesa una cantidad de esta proteína liofilizada ($4,1 \pm 0,1$ mg) y se disuelve en un volumen concreto de agua MiliQ (4,9839 ml), dato obtenido a partir de la calibración de un picnómetro. De esa disolución, por dilución, se preparan otras disoluciones de la proteína, midiéndose la absorbancia a 280 y 403 nm de cada una de ellas. Finalmente, representando la absorbancia de cada disolución frente a su concentración proteica, se determina, aplicando la ecuación de Lambert-Beer, el coeficiente de extinción a esas dos longitudes de onda en $\text{mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$. Si se conoce la masa molecular de la proteína se podrá determinar el coeficiente de extinción molar (en $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.3.2.6. 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, es decir, en función de su masa molecular. Por tanto, mediante este método, las proteínas son fácilmente separables de 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 (Sefadex), agarosa (Sefarosa o Bio-gel A) o poliacrilamida (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 menor 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⁻¹. Se trabaja con un equipo ÄKTA_{FPLC}. Como sistema de calibración se utiliza el kit de gel-filtración de GEHealthcare LMW (Tabla VI).

Tabla VI. Características de las proteínas del kit de calibración de gel-filtración de GEHealthcare LMW.

Proteína	M (Da)	Origen	Concentración (mg ml ⁻¹)
Aprotinina	6.500	Hígado bovino	3
Ribonucleasa A	13.700	Páncreas bovino	3
Anhidrasa carbónica	29.000	Eritrocitos bovinos	3
Ovoalbúmina	43.000	Huevo de gallina	4
Conalbúmina	75.000	Clara de huevo de pollo	3

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

4.3.2.7. Análisis de estado de agregación mediante ultracentrifugación analítica

La ultracentrifugación analítica (UCA) es todavía hoy la técnica más versátil, rigurosa y exacta para determinar la masa molecular y las propiedades hidrodinámicas y termodinámicas de una proteína y otras macromoléculas (ácidos nucleicos, virus, ribosomas y polímeros sintéticos). La razón es que el análisis de los resultados del método de sedimentación está firmemente basado en la Termodinámica.

Cuando una partícula de soluto está suspendida en un disolvente y se introduce en un campo gravitacional (como es el campo centrífugo), está sometida a tres fuerzas. En primer lugar, una fuerza gravitacional (F_s), directamente proporcional a la masa de la partícula en gramos (m) y a la aceleración (en el rotor la aceleración está determinada por la distancia de la partícula al eje del rotor (r) y por la aceleración angular al cuadrado (ω^2)), por lo que $F_s = \omega^2 m r = (M/N) \omega^2 r$, siendo M la masa molecular y N el número de Avogadro. Opuestas a esta fuerza existen otras dos, la fuerza de flotación (F_d), determinada por el principio de Arquímedes, que es igual al peso del fluido desplazado por la partícula: $F_d = -\omega^2 m_o r = -m p v \omega^2 r = -(M/N) p v \omega^2 r$, donde v es el volumen en ml que cada gramo de soluto ocupa en solución y ρ es la densidad del solvente (g ml⁻¹), y la fuerza de fricción (F_f), proporcional a la velocidad (u), $F_f = -f u$, donde f es el coeficiente de fricción que depende del tamaño y la masa de la partícula. F_d y F_f son negativas porque son

fuerzas opuestas a la fuerza de sedimentación F_s . En un corto periodo de tiempo ($\sim 10^{-16}$ s) las tres fuerzas se equilibran (Ec. 24).

$$F_s + F_b + F_f = 0 \quad (24)$$

$$\frac{M}{N} \omega^2 r - \frac{M}{N} v \rho \omega^2 r - f u = 0 \quad (25)$$

$$\frac{M}{N} (1 - v \rho) \omega^2 r - f u = 0 \quad (26)$$

$$\frac{M}{N} \frac{(1 - v \rho)}{f} = \frac{u}{\omega^2 r} = s \quad (27)$$

En la Ec. 26, se agrupan, por un lado, los términos que dependen tan sólo de la partícula y, por otro, los términos que engloban las condiciones experimentales. El término $(u/\omega^2 r)$ (Ec. 27) indica la velocidad de la partícula por unidad de aceleración gravitacional, también llamado coeficiente de sedimentación (s). El coeficiente de sedimentación tiene unidades de s , siendo sus valores $1-100 \times 10^{-13}$ s para muchas sustancias. La unidad, llamada Svedberg (S) en honor a Thé Svedberg, se define como 10^{-13} s.

La ultracentrífuga analítica debe tener un rotor que controle con exactitud la velocidad y la temperatura, además de llevar acoplado un sistema de detección que permita registrar la distribución de concentraciones de la macromolécula en función del tiempo. Los detectores pueden estar basados en métodos refractométricos (cuando el índice de refracción de la muestra es superior al del solvente) o en medidas de absorbancia. En este caso, tiene una lámpara de xenón de alta intensidad, gracias a la cual se pueden medir absorbancias entre 190 y 800 nm.

Los experimentos de UCA se dividen en dos categorías: los de velocidad de sedimentación y los de equilibrio de sedimentación (Berkowitz, 2006). Normalmente cuando se usa esta técnica la información más útil se adquiere realizando ambos tipos de experimentos.

En los experimentos de equilibrio de sedimentación (Laue, 1995; Vistica *et al.*, 2004), las muestras se someten a campos centrífugos moderados hasta que se igualan las fuerzas opuestas de centrifugación con las de flotación y fricción (condición de equilibrio). En estas condiciones, las especies macromoleculares se distribuyen formando un gradiente de concentración que se caracteriza porque: no varía con el tiempo, es independiente de las propiedades hidrodinámicas (forma) de las macromoléculas y depende única y

exclusivamente de la masa molecular de la especie que sedimenta. Si la muestra contiene partículas de diferente masa, el dato obtenido es una masa molecular promedio.

En los experimentos de velocidad de sedimentación (Schuck, 2000) las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado, de manera que la fuerza centrífuga es mucho mayor que las demás, por lo que existe un transporte neto de materia hacia el fondo de la celda. Es un método hidrodinámico de transporte que permite fraccionar las moléculas en base a las diferencias de su coeficiente de sedimentación (masa, densidad y forma macromolecular). Con estos experimentos, se puede llegar a conocer el grado de homogeneidad o heterogeneidad de las especies macromoleculares que sedimentan. Este fraccionamiento también puede ser muy útil para detectar y cuantificar la estequiometría y la afinidad de complejos macromoleculares y para estimar la forma aproximada de las macromoléculas en disolución.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se llevan a cabo en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I, equipada con celdas de doble sector de 1,2 cm de longitud de paso óptico, recubiertas por gruesas piezas de carbón Epon, en un rotor An60-Ti a 25 °C. Las celdas se llenan: una con 100 µl de disolución proteica 1 mg ml⁻¹ en tampón citrato 20,0 mM, pH 3,0 en presencia de GuHCl 6 M y la otra con 110 µl de tampón. Se registran datos de absorbancia a 275 nm. Las muestras se centrifugan a 24.000 y 32.000 rpm y el equilibrio se confirma por el solapamiento de barridos consecutivos. La masa molecular de las muestras se determina mediante el programa de ajuste no lineal SEDPHAT.

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizan en la misma ultracentrífuga a 25 °C y 45.000 rpm usando 380 µl de unas soluciones proteicas de 1,0 y 2,5 mg ml⁻¹, las cuales se dializan previamente frente a tampón HEPES 20 mM, pH 7,0 y tampón citrato 20 mM, pH 3,0. La distribución radial de la proteína se mide por absorción a 280 nm cada 4 min durante 3 h. Los coeficientes de sedimentación y de difusión se analizan usando el método del programa SEDFIT, que ajusta los datos a la ecuación de Lamm (Lamm, 1929). Esta ecuación representa el cambio de los perfiles de concentración de una partícula, en una celda en forma de sector circular, sometida a un campo de fuerzas centrífugo, en función del radio del rotor y del tiempo. Esta ecuación en su forma diferencial se expresa como:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(rD \frac{dC}{dr} - s\omega^2 r^2 C \right) \quad (28)$$

donde C es la concentración de la macromolécula a la distancia r (del centro de rotación al punto medio del límite de concentración) en el tiempo t; ω es la velocidad angular; s el coeficiente de sedimentación y D el

coeficiente de difusión. El cálculo de la masa molecular a partir de los datos experimentales obtenidos se realiza a partir de la ecuación de Svedberg (Ec. 29).

$$M = \frac{sRT}{D(1 - v\rho)} \quad (29)$$

donde R es la constante de los gases; v el volumen específico parcial; s el coeficiente de sedimentación; D el coeficiente de difusión y ρ la densidad de la disolución.

4.3.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

4.3.3.1. Titulación proteica: desnaturalización inducida por el pH

La mayoría de las proteínas se desnaturalizan a valores de pH muy altos y/o muy bajos. La desnaturalización ocurre porque las proteínas tienen numerosos grupos ácidos o básicos y las variaciones de pH cambian la carga neta de la proteína hasta que se llega a un estado en el que la proteína plegada ya no es estable. El incremento de pH puede tener como resultado la pérdida de protones de las cadenas laterales de aminoácidos como lisina, tirosina, histidina, arginina y cisteínas libres. Por el contrario, una disminución de pH hace que los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos aspartato y glutamato se protonen. Estos cambios en el grado de protonación de los restos aminoácidos modifican la red de interacciones electrostáticas (puentes salinos) y los puentes de hidrógeno que existen a pH neutro.

El pH también tiene efecto sobre la actividad enzimática porque puede desnaturalizar la proteína, cambiar la forma iónica de aminoácidos del centro catalítico (afectando k_{cat}) o de unión al sustrato (afectando K_m), o por modificación de la forma iónica del sustrato (afectando K_m). Midiendo la actividad enzimática a distintos pH's, se obtendrá la curva de estabilidad enzimática frente al pH o curva de titulación proteica.

Una disolución proteica de concentración 10 μ M en tampón universal (CH_3COOH , H_3PO_4 , H_3BO_3 - NaOH) 10 mM a pH 7,0 y 25 °C, se somete a modificaciones de pH (hasta pH 1 con HCl concentrado y hasta pH 13 con NaOH concentrado). Para cada uno de los pH's, se registra la actividad enzimática usando guayacol como sustrato, utilizando para ello un espectrofotómetro. Se registran, también, la intensidad de fluorescencia a 350 nm y la posición del máximo de fluorescencia (λ_{max}), usando como longitud de onda de excitación 296 nm, y midiendo el espectro de emisión entre 300 y 400 nm. Se trabaja a una velocidad de barrido de 240 nm min^{-1} y una anchura de rendija de los monocromadores de excitación y emisión de 5 nm, utilizándose un espectrofluorímetro.

4.3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido 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, 1990), 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).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) registra de manera continua la capacidad calorífica aparente de una disolución de proteína u otra macromolécula biológica en función de la temperatura, obteniéndose un termograma. Suele estar caracterizado por una banda de absorción de calor debido a una transición inducida térmicamente, por lo que, de acuerdo con el segundo principio de la Termodinámica (supuesto un proceso de equilibrio), se correspondería a un proceso endotérmico. El tratamiento de este parámetro permite caracterizar la transición termodinámicamente y, así, determinar parámetros como cambios de entalpía (ΔH), entropía (ΔS), energía libre de Gibbs (ΔG) y capacidad calorífica (ΔC_p). Además, permite conocer la existencia de estados intermedios.

4.3.3.2.1. Instrumentación

El primer calorímetro de barrido por compensación fue descrito por Pierre y Roux (1923) para la determinación del calor específico del cuarzo. Años después, Sykes (1935) construye un calorímetro de célula simple adiabático y lo usa para medir el calor específico de diferentes metales (cobre, bronce). Moser (1936), usa ese mismo instrumento para medir el calor específico de metales como la plata, el níquel y el cuarzo. El primer calorímetro de barrido con diseño “*twin*” (células gemelas), que mide por compensación de potencia fue descrito por Clarebrough en 1952 como “*DPS calorimeter*” y se usaba para medir el calor producido al calentar cobre, plásticamente deformado, en un intervalo de temperaturas concreto. El primer calorímetro de barrido con diseño “*twin*”, que mide por compensación, se aplica a muestras líquidas, es de alta sensibilidad y es capaz de medir la energética del proceso de desnaturalización inducido por la temperatura de biopolímeros, fue descrito por Privalov y colaboradores (1972). Desde tal fecha, diferentes casas comerciales han ido desarrollando estos instrumentos, mejorando sus características y rango de aplicación.

Para registrar las curvas de desnaturalización térmica de la RPTP se ha utilizado un microcalorímetro diferencial de barrido de alta resolución MC-2, que posee dos células de disco circular constituidas por una aleación de tantal o 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 min⁻¹ y unas concentraciones proteicas comprendidas entre 0,1 y 4,0 mg ml⁻¹.

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

- ◆ Se llaman diferenciales, ya que miden la diferencia de capacidad calorífica entre dos células lo más semejantes posible (gemelas). Una actúa de referencia y contiene el disolvente y en la otra se encuentra la disolución de la macromolécula en estudio.
- ◆ El barrido de temperatura se lleva a cabo de manera continua. La desventaja de ello es que la muestra es difícil que se encuentre en todo momento en equilibrio térmico, por ello la velocidad de barrido no puede ser muy alta ($\leq 2,0$ °C min⁻¹).
- ◆ Funcionan de modo adiabático. Ello se consigue recubriendo ambas células con dos corazas concéntricas, una interna y otra externa que las aíslan del medio exterior.
- ◆ El bloque calorimétrico es fijo, es decir, las células no se desmontan. Ello permite una mayor reproducibilidad de los datos experimentales.
- ◆ Para poder trabajar a temperaturas iguales o superiores a las de ebullición, poseen un sistema de presurización para evitar la formación de burbujas.
- ◆ Carecen de agitación mecánica para evitar, así, el calor producido por efecto Joule, ya que ello introduciría una perturbación térmica del mismo orden de magnitud, e incluso mayor, que la propia medida. La ausencia de agitación genera una mayor hermeticidad de las células necesarias para presurizarlas.

Otras consideraciones a tener en cuenta son: a) se debe trabajar con macromoléculas de elevado grado de pureza, con concentraciones bajas, del orden de unos pocos mg ml⁻¹, para, de este modo, considerar despreciables las interacciones intermoleculares y evitar, así, agregaciones inespecíficas, b) se trabaja con volúmenes muy pequeños, ya que la viscosidad en células de elevado tamaño dificultaría la homogeneidad térmica y conllevaría el uso de agitación, disminuyendo este hecho la sensibilidad y precisión del método. Si se trabaja en estas condiciones, los calores puestos en juego son muy pequeños y, por ello, es conveniente trabajar con bajas velocidades de barrido para evitar posibles gradientes de temperatura. Si se tienen en cuenta todas las consideraciones anteriores, se obtendrá un instrumento de gran precisión y elevada sensibilidad.

4.3.3.2.2. Experimento calorimétrico

Antes de realizar un experimento calorimétrico hay que estar seguros de que la biomacromolécula con la que se va a trabajar posee un elevado grado de pureza. Además, hay que conocer con exactitud su concentración y debe de encontrarse disuelta en el tampón de trabajo. Para ello se pueden hacer dos cosas: si estaba disuelta en agua, dializar la muestra durante 24 h frente a ese tampón o, si estaba liofilizada, disolverla directamente en ese tampón. Las muestras y soluciones amortiguadoras de trabajo deben estar previamente filtradas y desgasificadas y deben inyectarse en las células con sumo cuidado para evitar la formación de burbujas de aire, que puedan interferir en la adquisición de los datos experimentales.

En primer lugar, hay que lavar exhaustivamente 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 de barrido y tiempo de equilibrado entre el final de un barrido y el 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 (en μW) 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 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 (Fig. 4).

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 muy importante para el análisis posterior, ya que, si la transición es reversible, se realiza 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.

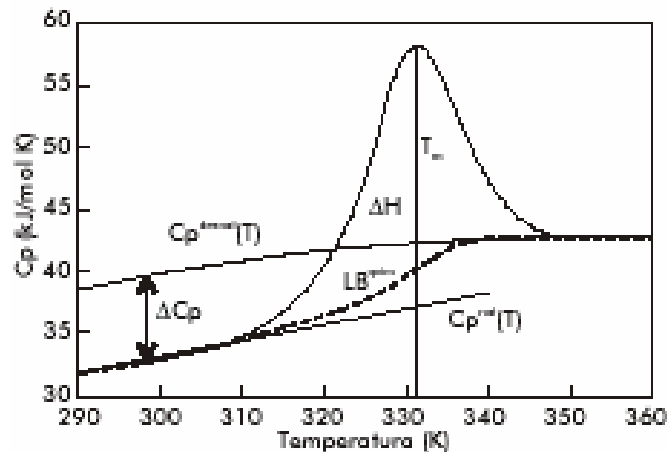


Figura 4. Parámetros termodinámicos que se pueden obtener directamente de un termograma. $C_{p^{\text{desnat}}}(T)$: capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado desnaturalizado, $C_{p^{\text{nativo}}}(T)$: capacidad calorífica de la biomacromolécula en estado nativo, $LB^{\text{química}}$: capacidad calorífica intrínseca, ΔC_p : variación de capacidad calorífica entre los dos estados de la macromolécula biológica, ΔH : entalpía calorimétrica y T_m : temperatura a la que aparece el máximo de la curva.

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

4.3.3.2.3. Análisis de los termogramas

Los valores absolutos de la capacidad calorífica parcial de la proteína se pueden obtener a partir de la diferencia de capacidades caloríficas entre la muestra y la referencia. Sin embargo, estos valores absolutos no se requieren para la mayoría de aplicaciones, sino que, normalmente, los resultados de los experimentos

de DSC se dan como perfiles de exceso de capacidad calorífica ($\langle \Delta C_p \rangle$) frente a la temperatura, perfiles que se calculan restando la capacidad calorífica parcial de la proteína a la capacidad calorífica de referencia.

$$\langle \Delta C_p \rangle = C_p - C_{p,N} \quad (30)$$

donde C_p es la capacidad calorífica de la referencia y $C_{p,N}$ es la capacidad calorífica de la proteína en estado nativo. $C_{p,N}$ sólo se conoce para temperaturas que se encuentran por debajo de la transición. Por ello, este nivel de referencia debe obtenerse por extrapolación de la dependencia frente a la temperatura (usualmente lineal) de los valores de la pre-transición. De acuerdo con los tratamientos teóricos que se detallarán más adelante, dos términos contribuyen a los valores de $\langle \Delta C_p \rangle$ obtenidos, tomando la capacidad calorífica de la proteína nativa como nivel de referencia. La contribución mayor procede de la dependencia con la temperatura de las concentraciones de los estados de la proteína significativamente poblados y es responsable de la presencia de una transición en el termograma $\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$. El segundo término puede identificarse con la capacidad calorífica promedio de los estados de la proteína y se conoce con el nombre de línea base química, dado que une, de forma suave, los valores pre- y post-transición $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$. Esta línea base química podría también utilizarse como nivel de referencia para el cálculo de los valores de $\langle \Delta C_p \rangle$. Por supuesto, la capacidad calorífica promedio de los estados de la proteína no es conocida de antemano, pero se supone que cualquier función razonable que una suavemente los valores de la pre- y post-transición es una aproximación aceptable de la verdadera línea base química.

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle \Delta C_{p,tr} \rangle - \langle \Delta C_{p,bl} \rangle \quad (31)$$

4.3.3.2.3.1. 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.

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

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (33)$$

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

$$x_D = \frac{[D]}{[N] + [D]} = \frac{K_D}{1 + K_D} \quad (34)$$

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

$$\Delta H_N^D = H(D) - H(N) \quad (35)$$

$$\Delta S_N^D = S(D) - S(N) \quad (36)$$

$$\Delta G_N^D = G(D) - G(N) \quad (37)$$

El exceso entálpico y el exceso de capacidad calorífica, son datos que se calculan teniendo en cuenta las ecuaciones de van't Hoff (Ec. 39) y Kirchoff (Ec. 38), que definen la dependencia de la K_D y la entalpía del proceso con respecto la temperatura, respectivamente.

$$\frac{\partial \Delta H_D}{\partial T} = \Delta C_p \quad (38)$$

$$\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} = \frac{\partial H}{RT^2} \quad (39)$$

$$\frac{\partial \Delta S_D}{\partial T} = \frac{\Delta C_p}{T} \quad (40)$$

$$\langle H \rangle = x_N H_N + x_D H_D \quad (41)$$

$$C_p = \frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} = x_D \Delta C_{Np}^D + \frac{K_D}{(1+K_D)^2} \frac{(\Delta H_N^D)^2}{RT^2} \quad (42)$$

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 Ec. 42 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:

$$\Delta S(T_{1/2}) = \frac{\Delta H(T_{1/2})}{T_{1/2}} \quad (43)$$

Del mismo modo, los valores de ΔH , ΔS y ΔG , a una temperatura T , se pueden calcular utilizando las ecuaciones termodinámicas habituales:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_o) + \Delta C_p (T - T_o) \quad (44)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_o) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_o}\right) \quad (45)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_o) + \Delta C_p (T - T_o) - T \Delta S(T_o) - T \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_o}\right) \quad (46)$$

donde T_o 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 (ΔH^{vH}) o entalpía aparente, que se obtiene a partir de la forma (anchura) de la transición (Ec. 47).

$$\Delta H^{vH} = 4RT^2 \left[\frac{\Delta C_p^m}{\Delta H(T_m)} \right] \quad (47)$$

donde ΔC_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 $\Delta H^M/\Delta H_N^D$ 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 dos estados (Privalov, 1979). Cuando $r < 1$ existirán estados intermedios significativamente poblados y puede existir agregación durante el proceso de desnaturalización. En cambio si $r > 1$ existirá disociación durante el proceso de desnaturalización, lo que suele ocurrir en el caso de proteínas multiméricas. En estos casos, la T_m sí depende de la concentración de proteína utilizada (Sturtevant, 1987).

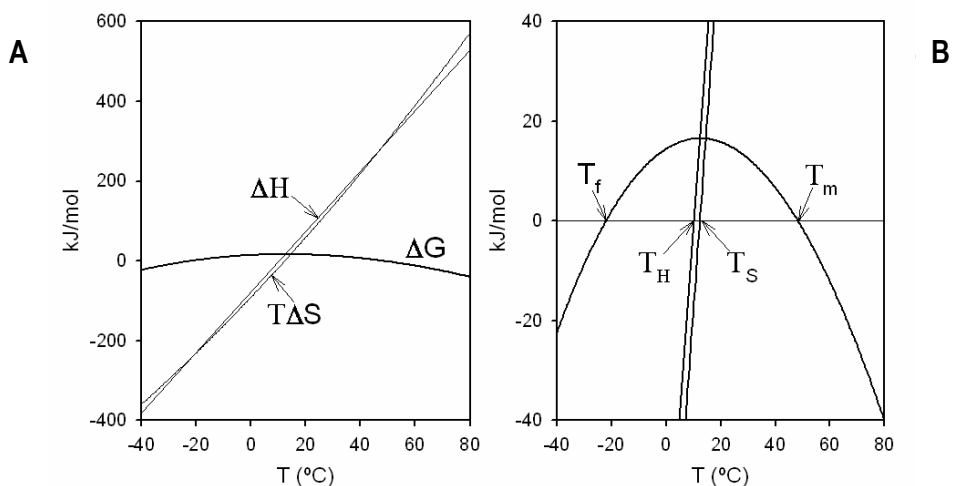


Figura 5. (A) Efecto de la T sobre ΔH , ΔS y ΔG asociados al desplegamiento proteico. (B) Ampliación de la Fig. 5A que muestra las principales características de la curva de estabilidad (perfil de ΔG frente a temperatura). Se señalan las temperaturas de desnaturalización caliente (T_m) y fría (T_f), así como las temperaturas de inversión de la entalpía y entropía.

En la desnaturalización térmica de una proteína, la dependencia de ΔG_D con la temperatura se denomina curva de estabilidad (Fig. 5). Varios trabajos han destacado las propiedades más importantes de dicha curva (Becktel y Schellman, 1987; Schellman, 1987): su pendiente viene dada por la expresión $-d\Delta G_D/dT = \Delta S_D$ y muestra un único máximo a la 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 $d^2\Delta G_D/dT^2 = -\Delta C_p/T$ y sólo adquiere valores negativos, dado que el ΔC_p de desnaturalización es siempre positivo. El máximo de ΔG_D se presenta a temperaturas bajas, ya que en esas condiciones está favorecido el estado nativo; este valor a TA 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

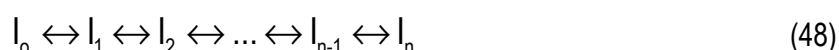
desnaturalización, T_m . El punto de corte a bajas temperaturas, T_f , es el resultado de la extrapolación de la curva, por lo que podría esperarse que hubiera una desnaturalización proteica en frío. Este fenómeno se predijo hace 40 años (Brandts, 1964) y se demostró que ocurre experimentalmente (Privalov, 1986). La desnaturalización fría es una propiedad común de muchas proteínas globulares (Griko *et al.*, 1988; Tamura *et al.*, 1991; Azuaga *et al.*, 1992).

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

4.3.3.2.3.1.2. Modelo de equilibrio de varios estados (multiestado)

Se han encontrado un gran número de proteínas, especialmente las más complejas, para las que el modelo de dos estados no es válido al tratar de explicar los datos obtenidos por DSC. Esto se puede deber a: 1) que exista una población de estados intermedios significativamente poblados en equilibrio con los estados nativo y desplegado (Xie *et al.*, 1991; Montgomery *et al.*, 1993); 2) cambios en el grado de asociación de la proteína concomitantes con su desplegamiento (Conejero-Lara y Mateo, 1996); 3) que se den ambas situaciones simultáneamente (Thompson *et al.*, 1993; Azuaga *et al.*, 1995; Filimonov y Rogov, 1996).

Un método general para el análisis de los datos en equilibrios sin cambio en el grado de asociación fue propuesto por Freire y Biltonen (1978). El esquema general de equilibrio supone una serie de estados monoméricos poblados en el proceso de desnaturalización (Ec. 48).



donde I_0 es el estado nativo, I_n el estado completamente desplegado y existen $n - 2$ estados intermedios. Se analizará este mecanismo mediante el uso de la función de partición (Q). Se define el peso estadístico (ω_i) como la relación de concentraciones entre un estado i y el estado de referencia I_0 (Ec. 49).

$$\omega_i = \frac{[I_i]}{[I_0]} = K_i = \exp(-\Delta G_0^i / RT) \quad (49)$$

El peso estadístico es constante para cada uno de los equilibrios, y se puede expresar, también, en términos de la energía libre de Gibbs. Toda la información relevante del sistema va a estar contenida en la

función de partición (Q), la cual se define como suma de todos los pesos estadísticos, considerando que el peso estadístico del estado de referencia toma el valor uno (Ec. 50).

$$Q = \sum \omega_i = 1 + \sum_{i=1}^n \exp(-\Delta G_i / RT) \quad (50)$$

La fracción de moléculas de proteína (x_i) contenidas en el estado i (Ec. 51).

$$x_i = \frac{[I_i]}{\sum_{i=0}^n [I_i]} = \frac{\exp(-\Delta G_i / RT)}{Q} \quad (51)$$

La entalpía media del sistema $\langle \Delta H \rangle$ será el promedio de las contribuciones de todos los estados presentes (Ec. 52).

$$\langle \Delta H \rangle = \sum_{i=1}^n \Delta H_i x_i = \sum_{i=1}^n \left(\Delta H_i \frac{\exp(-\Delta G_i / RT)}{Q} \right) \quad (52)$$

La capacidad calorífica se obtiene (Ec. 53) derivando la Ec. 52 respecto a T .

$$C_p = C_p(I_o) + \frac{\partial \langle \Delta H \rangle}{\partial T} = \frac{(\langle \Delta H^2 \rangle - \langle \Delta H \rangle^2)}{RT^2} + \langle \Delta C_p \rangle \quad (53)$$

Mediante un procedimiento recurrente, se pueden determinar el número de estados intermedios y llegar a caracterizarlos termodinámicamente. En estos estados la proteína mantiene parte de su estructura nativa intacta y la otra parte desnaturalizada.

4.3.3.2.3.2. Desnaturalización térmica irreversible

En otras ocasiones, la desnaturalización térmica es irreversible. La proteína pierde su estructura nativa para no volverla a recuperar. En este caso, no se puede analizar dicho fenómeno basándose en la termodinámica de equilibrio, sino que estos sistemas se abordarán desde un punto de vista cinético.

Con frecuencia las alteraciones irreversibles son lentas, por lo que en principio se pensó que la técnica DSC no podría registrar los cambios irreversibles por el escaso tiempo que duraba el experimento. Por ello, todos los termogramas se analizaban utilizando la termodinámica de equilibrio. Sin embargo, hay que señalar que las transiciones están altamente distorsionadas por la cinética del proceso irreversible, tal como

muestra el efecto de la velocidad de barrido sobre los perfiles calorimétricos (Sánchez-Ruiz *et al.*, 1988; Morin *et al.*, 1990; Kurganov *et al.*, 1997). Por todo ello, estos procesos se deben estudiar utilizando ecuaciones cinéticas.

4.3.3.2.3.2.1. Modelo de Lumry-Eyring

El modelo de Lumry-Eyring (1954) indica que en la desnaturalización proteica irreversible están implicados dos pasos: un desplegamiento reversible de la proteína nativa (N) y una alteración irreversible de la proteína desplegada (U) hasta alcanzar un estado final (D), que es incapaz de retornar al estado nativo (Lyubarev y Kurganov, 1998; 1999; Sánchez-Ruiz, 1992). Procesos responsables del paso irreversible pueden ser: agregación, autólisis, alteración química de residuos aminoácidos, etc.

El modelo de desnaturalización irreversible en dos pasos se define de la siguiente manera:



Como aproximación, se considera que la entalpía del proceso de equilibrio es constante (ΔH_U). Por ello, la dependencia de la constante de equilibrio con la temperatura viene dada por la siguiente expresión:

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{x_U}{x_N} = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_U}{R} \left[1/T - 1/T_{1/2} \right] \right\} \quad (55)$$

donde x_U y x_N son las fracciones molares de proteína en los estados desplegado y nativo, respectivamente y $T_{1/2}$ es la temperatura para la cual $K = 1$.

Se asume que el paso irreversible tiene una constante cinética de primer orden que varía con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius, de la siguiente forma:

$$k(\text{min}^{-1}) = A \exp(-E_A / RT) = \exp \left\{ -\frac{E_A}{R} \left[1/T^* - 1/T \right] \right\} \quad (56)$$

donde A es el factor preexponencial, E_A es la energía de activación, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y T^* la temperatura a la cual $k = 1 \text{ min}^{-1}$.

La ecuación de velocidad para la formación irreversible de D es:

$$\frac{d[D]}{dt} = k[U] \quad (57)$$

Teniendo en cuenta que $K = x_D / x_N$, $x_N + x_D + x_U = 1$ y $v = dT / dt$, fácilmente se pueden calcular las fracciones molares de cada uno de los estados significativamente poblados (Ec. 59-61).

$$\frac{dx_D}{dT} = \frac{1}{v} \frac{kK}{(K+1)} (1 - x_D) \quad (58)$$

$$x_D = 1 - \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \right\} \quad (59)$$

$$x_U = \frac{K}{K+1} \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \right\} \quad (60)$$

$$x_N = \frac{1}{K+1} \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \right\} \quad (61)$$

Por lo que el exceso de entalpía aparente (Ec. 62) será:

$$\langle \Delta H \rangle = x_U \Delta H_U + x_D \Delta H \quad (62)$$

donde ΔH_U e ΔH son las entalpías de los estados U y D, respectivamente (tomando N como estado de referencia). Se supone que la entalpía del paso irreversible es nula y, por tanto, $\Delta H_U = \Delta H$ (Ec. 63), por lo que:

$$\langle \Delta H \rangle = \Delta H (x_U + x_D) = \Delta H (1 - x_N) \quad (63)$$

El exceso de capacidad calorífica viene dado por la Ec. 64, en la que tras las sustituciones adecuadas y considerando que ΔH es constante, se llega a la expresión final para el exceso de capacidad calorífica (Ec. 65).

$$C_p^{ex} = -\Delta H \frac{dx_N}{dT} \quad (64)$$

$$C_p^{ex} = \frac{K\Delta H}{(K+1)^2} \left\{ \frac{k}{v} + \frac{\Delta H}{RT^2} \right\} \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \frac{kK}{K+1} dT \right\} \quad (65)$$

4.3.3.2.3.2.2. Modelo simple de dos estados

Es el modelo más simple que se conoce, la desnaturalización consiste en una transformación unimolecular de la proteína desde estado nativo (N) al estado desnaturalizado (D), siguiendo una cinética de primer orden, con una constante de velocidad k (Ec. 66).



Este modelo fue utilizado por primera vez por Sánchez-Ruiz *et al* (1988), indica que la constante de velocidad es dependiente de la temperatura según la ecuación de Arrhenius (Ec. 56).

La ecuación de velocidad para este modelo (Ec. 67).

$$d[D]/dt = -k[N] \quad (67)$$

Si la temperatura es variable y su cambio en función del tiempo es constante ($dT/dt = \nu$), entonces:

$$d[D]/dT = -(1/\nu)k[N] \quad (68)$$

La integración de esta ecuación permite calcular la proporción relativa del estado N, γ_N (Ec. 69) en función de la temperatura ($\gamma_N = [N]/[N]_0$, donde $[N]_0$ es la concentración de proteína en estado nativo a la temperatura inicial T_0).

$$\gamma_N = \exp\left\{-1/\nu \int_{T_0}^T \exp\left[E_A/R\left(1/T^* - 1/T\right)\right] dT\right\} \quad (69)$$

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

$$C_p^{ex} = d\langle\Delta H\rangle/dT = (1/\nu)\Delta H \exp\left\{E_A/R\left(1/T^* - 1/T\right)\right\} \exp\left\{-1/\nu \int_{T_0}^T \exp\left[E_A/R\left(1/T^* - 1/T\right)\right] dT\right\} \quad (70)$$

asumiendo que ΔH (entalpía de desnaturalización) es constante durante la transición, es decir, con perfiles obtenidos utilizando la línea base química (Kurganov *et al.*, 1997). Con este modelo, se caracteriza la desnaturalización térmica de muchos sistemas, estimándose la E_A y la T^* del proceso.

4.3.3.3. Desnaturalización inducida por agentes químicos

Una manera sencilla de determinar la estabilidad conformacional de una proteína es mediante el estudio de su desnaturalización química reversible, utilizando como agentes desnaturalizantes el hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) o la urea. El mecanismo mediante el cual estas moléculas desplazan el equilibrio hacia el estado desnaturalizado no está claro, aunque parece que dichos agentes químicos se unen con más fuerza al estado desnaturalizado que al estado nativo y, además, podrían debilitar la cohesión de la proteína con el agua que es la responsable del efecto hidrófobo.

Para determinar la estabilidad de una proteína basta con registrar, a distintas concentraciones de agente desnaturalizante, el valor de una propiedad que cambie cuando la proteína se despliega. Normalmente se registran cambios en propiedades espectroscópicas de la proteína, tales como, la fluorescencia o el dicroísmo circular, que al ser representadas frente a la concentración de agente desnaturalizante dan lugar a curvas sigmoideas. A concentraciones de agente desnaturalizante en la zona de transición, los dos estados, nativo y desplegado, se encuentran en cantidades fácilmente cuantificables, por lo que es fácil determinar la constante de equilibrio (K_D), y, a partir de ella, la diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG°) (Ec. 71)

$$K_D = (y_N - y) / (y - y_D) = \exp(-\Delta G^\circ / RT) \quad (71)$$

donde y_N e y_D , son los valores de la propiedad espectroscópica de la proteína, en estado nativo y desnaturalizado, respectivamente y R la constante de los gases.

Al representar ΔG° de equilibrio frente a la concentración de agente desnaturalizante, los puntos se ajustan a una línea recta, que permite mediante extrapolación lineal determinar la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturalizante (Ec. 72) (Pace, 1986; 1990).

$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ (H_2O) - m [GuHCl] \quad (72)$$

donde ΔG° es la energía libre de Gibbs de equilibrio, $\Delta G^\circ (H_2O)$ es la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturalizante, parámetro que indica la estabilidad proteica, $[GuHCl]$ es la concentración de agente desnaturalizante y m es una constante de proporcionalidad que está relacionada con el cambio de área apolar expuesta al disolvente asociado a la desnaturalización (Myers *et al.*, 1995). Como el valor de estabilidad calculado depende de m y este dato a veces no se determina con suficiente precisión en el ajuste lineal, es frecuente referirse a un parámetro que se puede determinar con mayor precisión, que es el valor de

la concentración de agente desnaturante a la cual existe el mismo número de moléculas proteicas en estado nativo que en estado desplegado ($D_{1/2}$) (Ec. 73).

$$[D_{1/2}] = \Delta G^0(H_2O) / m \quad (73)$$

Para llevar a cabo estos experimentos, se utiliza una solución madre de GuHCl de alta concentración en tampón fosfato 20 mM, pH 7,0. Se mezclan diferentes volúmenes de esta solución con la solución proteica de manera que la concentración de la proteína sea constante (10 μ M) y se registran los cambios de elipticidad a 222 nm y 25 °C, con concentraciones de GuHCl que oscilan entre 0 y 7,2 M a pH 7,0. Estas soluciones se incubaron durante una noche a 25 °C para alcanzar el equilibrio químico.

Debido a que el GuHCl es una sustancia altamente higroscópica, es conveniente determinar su concentración por refractometría (Ec. 74).

$$[\text{GuHCl}] = 57,147(n_{\text{HG}} - n_{\text{T}}) + 36,68(n_{\text{HG}} - n_{\text{T}})^2 - 91,6(n_{\text{HG}} - n_{\text{T}})^3 \quad (74)$$

donde n_{HG} y n_{T} son los índices de refracción de las disoluciones de GuHCl y de tampón, respectivamente.

4.3.3.4. Fluorescencia intrínseca de proteínas

La fluorescencia es un proceso de emisión de radiación en el 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 moléculas excitadas y moléculas de disolvente) o la conversión interna (relajación entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y 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 aquél que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado.

La fluorescencia intrínseca de proteínas es una herramienta útil para obtener información sobre la conformación, dinámica e interacciones intermoleculares de estas especies (Permyakov, 1993). Las sondas fluorescentes intrínsecas de las proteínas son los aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe). Esta metodología también permite caracterizar cambios en el entorno de estos residuos aminoácidos durante el proceso de desnaturalización, obteniendo información estructural y parámetros fisicoquímicos. Es posible que los cambios en algunas proteínas no estén localizados cerca de los dominios en los que se encuentran estos aminoácidos, en cuyo caso esta técnica no sería útil.

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

Residuo aminoácido	Absorbancia		Fluorescencia		Sensibilidad
	λ_{\max} (Excitación)	ϵ_{\max} ($M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{\max} (Emisión)	Φ_F	$\epsilon_{\max} \Phi_F$
Trp	280	5600	348	0,20	1100
Tyr	274	1400	303	0,14	200
Phe	257	200	282	0,04	8

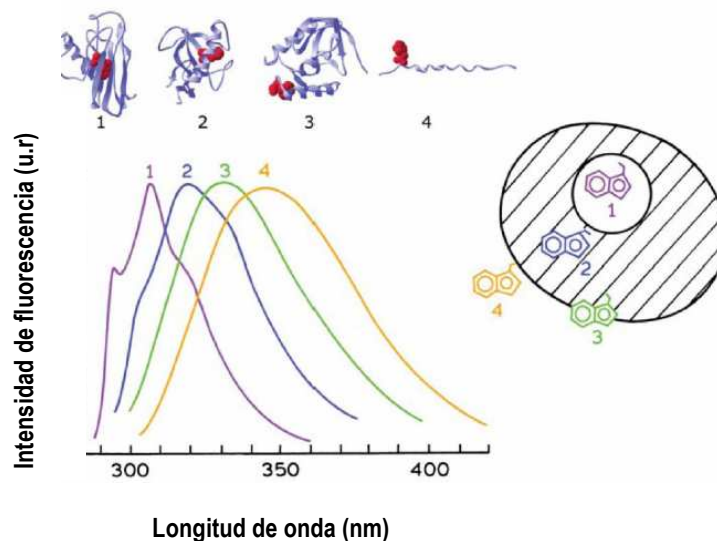


Figura 6. Localización del aminoácido Trp en diferentes proteínas: (1) azurina, (2) ribonucleasa, (3) ribonucleasa de estafilococcus y (4) glucagón. Se observa que a medida que el Trp es más accesible a las moléculas de disolvente, el máximo de emisión de fluorescencia se desplaza hacia mayores longitudes de onda.

Cuando una proteína contiene Trp, la contribución del resto de aminoácidos al espectro de emisión de fluorescencia es pequeña, ya que la Tyr y la Phe tienen rendimientos cuánticos (Φ_F) muy inferiores a los del Trp (Tabla VII). 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 los 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 triptófano al disolvente, siendo mayor la longitud de onda a mayor exposición (Fig. 6). 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 habrá contribución del Trp y de la Tyr, en cambio, si se excita a longitudes de onda superiores a 295 nm, sólo habrá emisión de fluorescencia por parte del triptófano.

La desnaturalización de las 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 del 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^- , Cl^- , O_2 , etc), que proporciona 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).

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 de excitación 296 nm y se registran los espectros de emisión entre 300-400 nm, con una velocidad de barrido de 240 nm min^{-1} y una anchura fija de rendija de 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 (λ_{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 $1,8 \text{ K min}^{-1}$. 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 $10 \mu\text{M}$ en tampón universal 10 mM, pH 7,0.

Los datos obtenidos experimentalmente se transforman en fracción de proteína desnaturizada utilizando un ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados (Ec. 75).

$$F_d = (y - y_N) / (y_D - y_N) \quad (75)$$

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 desnaturizada, parámetros obtenidos por regresión de las líneas bases pre- y post-transición, siendo x el parámetro variable (en este caso I_F a 360 nm).

Cuando la desnaturalización térmica indica una transición irreversible cooperativa hacia el estado desnaturizado (perfil sigmoideo), se pueden analizar esos datos usando un ajuste de regresión no lineal (Ec. 76).

$$F_d = 1 - \exp \left\{ -\frac{1}{V} \int_{T_0}^T \exp \left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\} \quad (76)$$

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

4.3.3.5. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una de las técnicas espectroscópicas más sensibles para obtener información estructural de una proteína (contenido de estructuras secundarias) (Sreerama et al., 1999), y para determinar si algún tratamiento (T , pH o agentes químicos) alteró su estructura terciaria (no se puede determinar, pero se pueden observar las modificaciones) (Venyaminov y Vassilenko, 1994; Yang *et al.*, 1996).

Cuando la luz quiral, circularmente polarizada, atraviesa una muestra ópticamente activa (molécula con un centro de asimetría), sus componentes de luz se 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 (Θ) frente a la longitud de onda (Kuwajima, 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_α 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 enlaces peptídicos son asimétricas y tienen espectros de DC característicos (Tabla VIII).

Tabla VIII. Máximos y mínimos que aparecen en los espectros DC de las proteínas en función de su estructura secundaria. En la estructura mixta (*) predominan las bandas de α -hélice sobre las de hoja β . A veces, puede aparecer un hombro entre 210-220 nm, por el solapamiento de ambas estructuras.

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

Para realizar espectros DC en la región del UV-lejano hay que seleccionar con mucho cuidado las disoluciones amortiguadoras, las sales y otros aditivos que puedan absorber en ese intervalo de longitudes de onda. El mejor tampón es fosfato 10 mM, si bien TRIS-HCl, perclorato y borato a bajas concentraciones, también se pueden 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 en un espectropolarímetro Jasco-715 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⁻¹. Cada espectro es el promedio de cuatro, los cuales se registran con una velocidad de barrido de 50 nm min⁻¹ y se corrigen restándoles la línea base (espectro de la disolución amortiguadora), convirtiéndose las señales en valores de elipticidad molar (Ec. 77).

$$[\Theta] = 10M_{res} \Theta_{obs} l^{-1} \rho^{-1} \quad (77)$$

donde M_{res} es la masa molar media por residuo, calculada a partir de la secuencia primaria de la proteína, y que tiene un valor de 104,5 g mol⁻¹; Θ_{obs} es el valor de la elipticidad en grados (°) a una longitud de onda determinada; l es la longitud de paso óptico en dm y ρ la concentración de proteína en mg ml⁻¹.

Se registran espectros de DC a 25 °C de la proteína nativa a pH 7,0 y 3,0 y de la proteína térmicamente 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 termostático, a una velocidad de calentamiento de 1K min⁻¹.

La curva de desnaturalización se transformó en fracción de proteína desnaturalizada por ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados (Ec. 75).

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 a la Ec. 76. 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 DC tiene diferentes grados de exactitud en función de la estructura que se esté determinando. Ello depende de la intensidad de las señales características de cada tipo de estructura secundaria. Si la estructura es de α -hélice (97% de exactitud), hoja β (75%), giros (50%) y en caso de tener otro tipo de estructura (89%) (Manavalan y Johnson, 1987).

Para determinar la estructura secundaria de una proteína a partir de su espectro DC, se utilizan bases de datos de espectros de DC de proteínas de referencia, compuestas de elementos de estructura secundaria conocida. Se combinan resultados procedentes de varios programas que utilizan diferentes funciones matemáticas para construir el grupo de proteínas de referencia (Johnson, 1990; Greenfield, 1996). Los programas usados son SELCON3 (Sreerama y Woody, 2000), CDSSTR (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 clase de estructura terciaria de proteínas globulares. El método proporciona resultados con un 100% de exactitud si la estructura es toda α , un 85% si la estructura es $\alpha + \beta$ y un 75% si es toda β (Venyaminov y Vassilenko, 1994).

4.3.3.6. Efecto de la fuerza iónica

La fuerza iónica es un factor que influye en la estabilidad de las proteínas ya que una modificación de la concentración salina puede alterar los puentes salinos, los cuales contribuyen a la estabilidad proteica.

Una volumen de disolución proteica (100 μ l) se incuba en tampón universal 20 mM, pH 7,5, a 25 °C durante unos min. La I se incrementa entre 0 y 5 M por adición de volúmenes crecientes de NaCl 2 M y 5,2 M en tampón universal 20 mM, pH 7,5.

Se registra espectrofotométricamente la actividad enzimática de RPTP, usando como sustrato guayacol 18,0 mM, en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0, y como cosustrato H₂O₂ 4,9 mM. Sobre 2 ml de la disolución anterior, se adiciona una alícuota de proteína (5 µl), incubada a diferentes concentraciones salinas. Se registra la actividad peroxidasa por triplicado para cada una de las concentraciones salinas.

4.3.4. ESTUDIOS CINÉTICOS Y MECANISMO CATALÍTICO

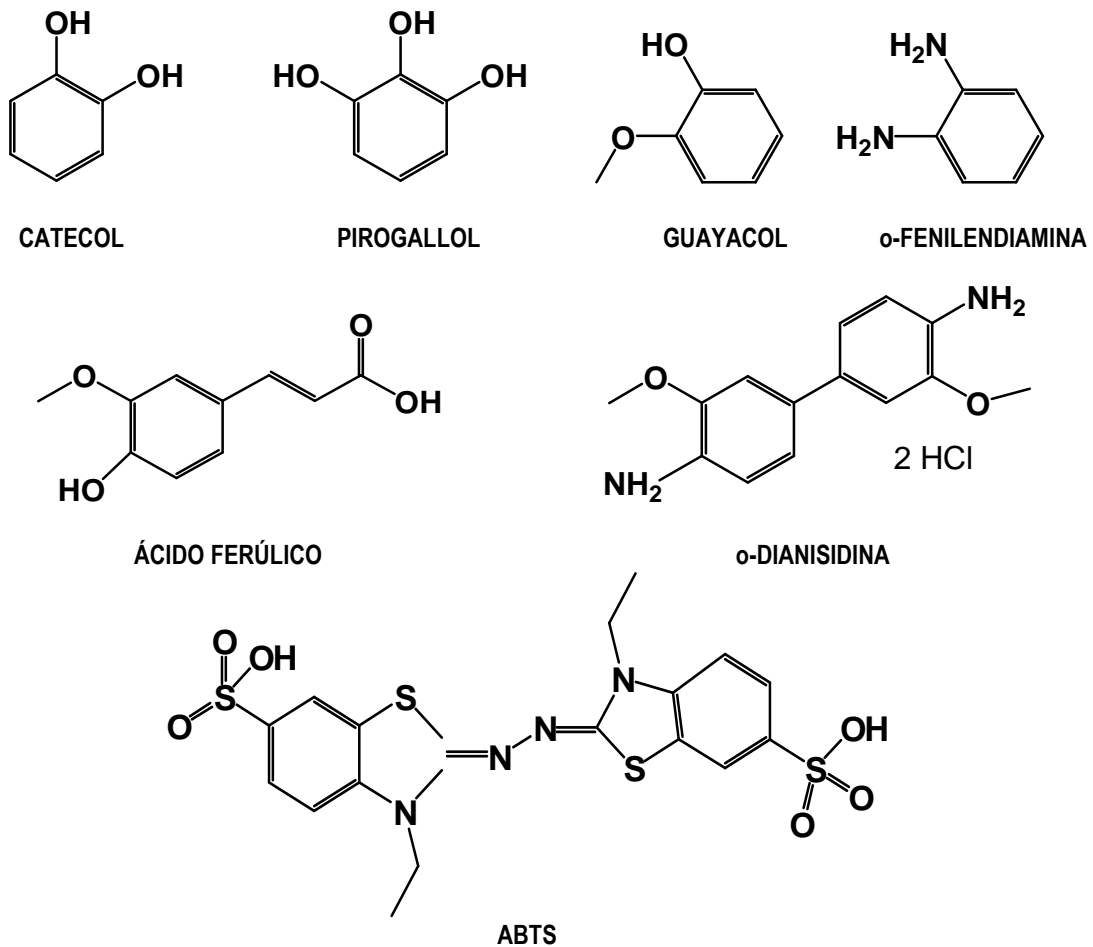
4.3.4.1. Estudio cinético de especificidad por sustrato

Se han determinado las condiciones experimentales óptimas catalíticas de la peroxidasa de palma real (RPTP). Para ello, se ha realizado un seguimiento espectroscópico de los productos de oxidación de los sustratos en distintas condiciones de pH y concentración de tampón, calculando la actividad enzimática en cada caso. Esta actividad se ha medido en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, adicionándose 2 ml de mezcla de reacción con concentraciones constantes de ambos sustratos (AH₂ y H₂O₂) y un parámetro variable (pH o concentración de tampón, en cada caso). La concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se mide espectrofotométricamente a 240 nm ($\epsilon_{240} = 43,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción se inicia por adición de una alícuota de enzima (1-20 µl), agitándose la mezcla de reacción y registrando el producto de oxidación durante un promedio de 200 s (este tiempo depende del sustrato utilizado). Todos los ensayos se llevan a cabo con tampón universal (H₃BO₃-CH₃COOH-H₃PO₄-NaOH) entre 0 y 500 mM y pH que varía entre 1,5 y 12,5 (estos intervalos de pH también dependen del sustrato). Inicialmente, se trabajará con unas concentraciones de sustratos óptimas para la peroxidasa de palma africana (AOPTP) (Sakharov *et al*, 2002) y, finalmente, se determinarán las condiciones óptimas, para la enzima objeto de estudio, la RPTP. Para ello, se mantendrá constante la concentración de un sustrato y se modificará la del otro, manteniéndose también constantes el pH, la concentración de tampón y la temperatura.

Existen una gran variedad de sustratos de distinta naturaleza (orgánica e inorgánica) para las peroxidases. En este trabajo, se utilizan siete sustratos: cuatro de naturaleza fenólica (guayacol, catecol, ácido ferúlico y pirogallol) y tres de naturaleza no fenólica (o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS) (Esquema 4). Las longitudes de onda de medida para cada sustrato, los coeficientes de extinción molar de sus productos de oxidación y el tiempo de medida se citan en la Tabla IV.

Bibliográficamente, se ha comprobado que, para hacer un seguimiento de la actividad peroxidasa durante un proceso de purificación se utilizan en mayor medida el guayacol (2-metoxifenol) y el ABTS. La actividad peroxidasa es bastante alta con estos sustratos y, además, se sigue el producto de oxidación en

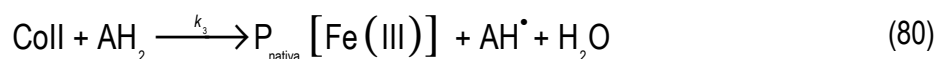
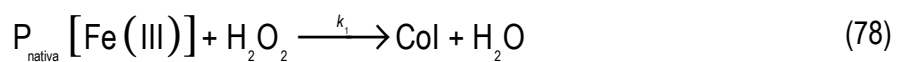
una zona del espectro visible (470 y 414 nm, respectivamente), zona con medidas de absorbancia más fiables y para la que no se requieren aparatos muy sofisticados.



Esquema 4. Estructuras químicas de los sustratos que se utilizan para hacer los estudios de cinética enzimática.

4.3.4.2. Determinación del mecanismo catalítico y de sus parámetros cinéticos

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son unas enzimas que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, usando un peróxido, normalmente H_2O_2 , como molécula aceptora de electrones. La enzima pasa por diferentes estados enzimáticos durante el ciclo catalítico (Esquema 5)



Esquema 5. Etapas del ciclo catalítico de las peroxidasas (Ec. 78-80). La Ec. 81 es la reacción global.

donde P_{nativa} es la enzima en su forma nativa, que se oxida mediante un paso mono-electrónico a Col (Ec. 78). El Col acepta un protón y un electrón del sustrato reductor (AH_2), dando lugar a su correspondiente radical libre (AH^\bullet) y a una forma enzimática distinta denominada Coll (Ec. 79). Finalmente, otra molécula de sustrato reductor reacciona con la forma enzimática Coll, regenerando la enzima en su forma nativa y otra nueva molécula radicalaria AH^\bullet (Ec. 80). La Ec. 81 es la reacción global del ciclo catalítico.

La caracterización de este comportamiento cinético bi-sustrato fue descrito por R. Alberty (1953) y recibió el nombre de mecanismo *ping-pong* (Cleland, 1970) (Fig. 7).

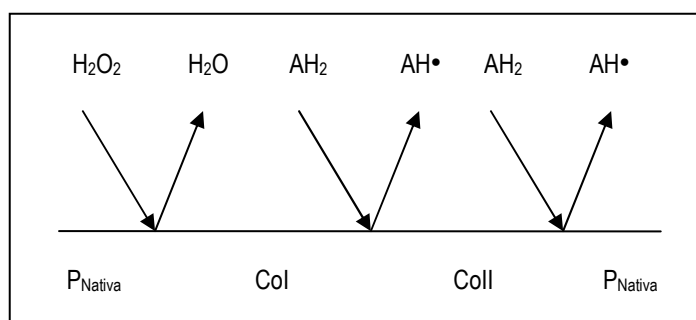


Figura 7. Esquema del mecanismo *ping-pong* de la peroxidasa.

La mayoría de las peroxidases oxidan sustratos siguiendo el mecanismo anterior. Para comprobar que la peroxidasa de palma real (RPTP) oxida sustratos siguiendo, también, este mecanismo, se harán una serie de experimentos con medidas de velocidades iniciales, utilizando para ello el seguimiento espectrofotométrico del producto de oxidación de uno de los dos sustratos. En unas condiciones óptimas de medida, previamente establecidas, para cada uno de los sustratos, a 25 °C y concentración enzimática constante, se fijará la concentración de un sustrato (H_2O_2) y se modificará la del otro (AH_2), observando que el perfil velocidad de reacción *versus* concentración del sustrato variable se ajusta bien a una cinética *michaeliana*. Este estudio se hará para diferentes concentraciones constantes del sustrato H_2O_2 . Si al hacer las representaciones de dobles inversos ($1/v$ *versus* $1/C$) para cada concentración del sustrato constante, se obtiene un conjunto de rectas paralelas, este hecho indicaría que la enzima sigue un mecanismo *ping-pong*. En este caso, al representar la ordenada en el origen ($1/V$) de las anteriores rectas paralelas y la inversa del parámetro ($1/K$), frente al inverso de la concentración de sustrato constante, se obtienen relaciones lineales, de las cuales se pueden determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Los resultados de este estudio indicarían el ajuste de los datos cinéticos a un mecanismo *ping-pong* pero no descartarían completamente un mecanismo secuencial (Kedderis y Hollenberg, 1983; Segel, 1975). Un tipo de experimento que distingue entre un mecanismo *ping-pong* y un mecanismo secuencial consiste en preparar una serie de disoluciones de ambos sustratos, en las que la relación de concentraciones $[H_2O_2] / [AH_2]$ se mantenga constante.

Si al hacer las representaciones de dobles inversos, se obtiene una tendencia lineal, la cinética enzimática sigue un mecanismo *ping-pong* (Ec. 82). En cambio, si la tendencia es parabólica, seguiría un mecanismo secuencial.

$$v = \frac{V_{\max} [\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}_2]}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2} [\text{AH}_2] + K_m^{\text{AH}_2} [\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}_2]} \quad (82)$$

Cuando la concentración del sustrato reductor permanece constante, mediante una serie de pasos matemáticos se puede transformar la Ec. 82 en una ecuación que representa una hipérbola rectangular (Ec. 83) (Everett *et al.*, 1990).

$$v = \frac{V[\text{H}_2\text{O}_2]}{K + [\text{H}_2\text{O}_2]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K}{V} \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (83)$$

Los parámetros V y K vienen dados por las Ec. 84 y 85, respectivamente.

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{[\text{AH}_2]}} \Rightarrow \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{V_{\max}} \frac{1}{[\text{AH}_2]} \quad (84)$$

$$K = \frac{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}}{1 + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{[\text{AH}_2]}} \Rightarrow \frac{1}{K} = \frac{1}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}} + \frac{K_m^{\text{AH}_2}}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}} \frac{1}{[\text{AH}_2]} \quad (85)$$

Mediante una serie de ajustes de los datos experimentales, se pueden calcular las constantes de Michaelis de ambos sustratos ($K_m(\text{AH}_2)$, $K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$), 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* ($k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]_0$), que se define como los moles de sustrato transformados por mol de enzima y por unidad de tiempo, donde $[E]_0$ es la concentración enzimática inicial. Finalmente, se determinan las constantes de especificidad para cada uno de los sustratos (k_{cat} / K_m).

4.3.4.3. Inhibición competitiva por sustrato

Normalmente 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 ($1/v$ versus $1/C$), se obtienen 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 Ec. 86 describe el proceso de inhibición competitiva por sustrato para un mecanismo *ping-pong*, fijando como sustrato inhibitor el sustrato reductor ($K_{IS}^{AH_2}$).

$$v = \frac{V_{\max} [H_2O_2]}{K_m^{H_2O_2} \left(1 + \frac{[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}} \right) + [H_2O_2] \left(1 + \frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]} \right)} \quad (86)$$

$$v = \frac{V[H_2O_2]}{K + [H_2O_2]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K}{V} \frac{1}{[H_2O_2]} \quad (87)$$

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^{AH_2}}{[AH_2]}} \quad (88)$$

$$K = \frac{[AH_2] K_m^{H_2O_2} \left(1 + \frac{[AH_2]}{K_{IS}^{AH_2}} \right)}{[AH_2] + K_m^{H_2O_2}} \quad (89)$$

$$\frac{K}{V} = \frac{K_m^{H_2O_2}}{V_{\max}} + \frac{K_m^{H_2O_2}}{V_{\max} K_{IS}^{AH_2}} [AH_2] \quad (90)$$

Mediante una serie de pasos matemáticos, se puede transformar la Ec. 86 en una ecuación que describe una hipérbola rectangular (Ec. 87). Los parámetros V y K vienen dados por las Ec. 88 y 89, respectivamente. De la Ec. 90 se puede determinar el valor de la constante de inhibición competitiva para el sustrato inhibitor.

4.3.4.4. Determinación de las constantes microscópicas (k_1 y k_3) del mecanismo catalítico

La reactividad de la peroxidasa de palma real (RPTP) con el peróxido de hidrógeno y el sustrato reductor se determina cuando se conocen los valores de las constantes microscópicas k_1 y k_3 , siendo k_1 la constante de formación del Col y k_3 la constante de reducción del Coll.

Se determina la eficacia catalítica de esta enzima durante el proceso de oxidación de un grupo de sustratos de diferente naturaleza (Tabla IX).

Tabla IX. Condiciones experimentales, para cada uno de los sustratos, utilizadas en los protocolos para el cálculo de las constantes microscópicas k_1 y k_3 . Para todos los sustratos se utiliza tampón citrato, excepto para el guayacol que se usa tampón fosfato. Las concentraciones para el estudio del sustrato ABTS son molares (M).

Sustrato	[Tampón] (mM)	pH	[H ₂ O ₂] (mM)	[AH ₂] (mM)	[RPTP] (M)
Guayacol	10,0	6,88 ± 0,07	1,0-8,0	1,0-18,2	5,6054 · 10 ⁻¹⁰
ABTS	10,0	3,04 ± 0,02	2 · 10 ⁻⁴ -5 · 10 ⁻⁴	2,5 · 10 ⁻⁵ -4,5 · 10 ⁻⁵	6,0502 · 10 ⁻¹⁰
Ácido ferúlico	10,0	4,09 ± 0,06	0,1-1,0	0,02-0,08	8,9125 · 10 ⁻¹⁰
o-dianisidina	30,0	6,05 ± 0,03	0,2-2,0	0,05-0,1	2,9708 · 10 ⁻¹⁰
o-fenilendiamina	10,0	6,06 ± 0,04	0,5-3,0	0,5-2,0	1,0246 · 10 ⁻⁹
Catecol	30,0	3,52 ± 0,02	0,2-1,0	5,0-20,0	3,5009 · 10 ⁻⁹

Los ensayos espectrofotométricos de oxidación de sustratos se llevan a cabo a 25 °C, en un medio de reacción que contiene un sustrato a concentración constante y donde se varía la concentración del otro. La reacción se inicia con la adición de RPTP y se realiza a diferentes concentraciones del sustrato que se mantiene constante. Se registra la evolución cinética del producto de oxidación de cada sustrato (Tabla IX). La concentración de enzima se determina espectrofotométricamente a 403 nm ($\epsilon_{403} = 59,1 \pm 0,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), al igual que las concentraciones de ABTS ($\epsilon_{340} = 3,66 \cdot 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y de ácido ferúlico en etanol ($\epsilon_{234} = 12,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para cada sustrato, se intenta trabajar en las condiciones óptimas de pH y de concentración de tampón. Para el sustrato ABTS, el pH óptimo es 2,5. Dado que ese pH, la RPTP se encuentra en la zona transicional, los resultados no son reproducibles puesto que la enzima se encuentra, parte en estado nativo y parte en estado desnaturalizado, por lo que la cantidad de enzima en cada uno de estos estados varía mucho con el pH en esa zona. Por estas razones, se trabaja a pH 3,0. Con los sustratos que presentan el máximo de actividad a pH 5,0-5,5, el pH de trabajo también sufre una modificación, ya que el pH óptimo está muy cercano al pI de la enzima y, así, durante la reacción de oxidación aparecería agregación proteica, alterando los resultados cinéticos. Por ello, con estos sustratos se trabajará a pH 6,0.

Para calcular las constantes microscópicas (k_1 y k_3) de la oxidación de sustratos por RPTP, se ajustan las velocidades de oxidación de estos compuestos, para cada concentración de H₂O₂ y de AH₂, teniendo en cuenta la aproximación del estado estacionario y suponiendo que $k_2 > k_3$, como ocurre en el mecanismo de

reacción generalmente aceptado para la mayoría de las peroxidases (Esquema 5). Así, se obtendría la ecuación de velocidad (Ec. 91) para el mecanismo cinético de las peroxidases (Morales y Ros-Barceló, 1997).

$$v = \frac{2[E]k_3[AH_2][H_2O_2]}{(k_3/k_1)[AH_2] + [H_2O_2]} \quad (91)$$

De la ecuación anterior, se puede determinar la dependencia de la v con las concentraciones de ambos sustratos (H_2O_2 y AH_2) (Ec. 92 y 93).

$$v = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]} \rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{A} + \frac{B}{A} \frac{1}{[H_2O_2]} \quad (92)$$

$$v = \frac{A^*[AH_2]}{B^* + [AH_2]} \rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{A^*} + \frac{B^*}{A^*} \frac{1}{[AH_2]} \quad (93)$$

donde $A = 2[E]k_3[AH_2]$, $B = (k_3/k_1)[AH_2]$, $A^* = 2[E]k_1[H_2O_2]$, $B^* = (k_1/k_3)[H_2O_2]$ y $[E]$ es la concentración de enzima. Al representar los dobles inversos ($1/v$ versus $1/[H_2O_2]$), se pueden calcular, a partir de la Ec. 92, los valores de A y de B para cada concentración de sustrato reductor. Si, a continuación, se representa A versus B (Ec. 94), se puede llegar a determinar la constante microscópica k_1 . El mismo procedimiento se llevará a cabo para conocer la constante k_3 . Se llevará a cabo la representación de dobles inversos ($1/v$ versus $1/[AH_2]$) y se podrá calcular, para cada concentración de peróxido de hidrógeno, los valores de A^* y B^* . Al representar A^* versus B^* (Ec. 95), se podrá determinar el valor de la constante microscópica k_3 .

$$A = 2[E]k_1B \quad (94)$$

$$A^* = 2[E]k_3B^* \quad (95)$$

Asimismo, se puede determinar la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m^{obs}) para la transformación del peróxido de hidrógeno y del sustrato reductor (Ec. 96 y 97).

$$k_{cat}/K_m^{obs} = \frac{2k_3[AH_2]}{(k_3/k_1)[AH_2]} = 2k_1 \quad (96)$$

$$k_{cat}/K_m^{obs} = \frac{2k_1[H_2O_2]}{(k_1/k_3)[H_2O_2]} = 2k_3 \quad (97)$$

Los ajustes lineales de dobles inversos se basan en la ecuación de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934) (Ec. 98). Asimismo, otros ajustes lineales aplicados, se basan en las ecuaciones de Hanes-Woolf (Ec. 99) y de Eddie-Hofstee (Eddie, 1942; Hofstee, 1952) (Ec. 100). Las tres metodologías de ajustes de regresión lineal se aplicarán para el tratamiento de los datos cinéticos experimentales.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (98) \quad \frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{S}{V_{\max}} \quad (99) \quad v = -K_m \frac{v}{S} + V_{\max} \quad (100)$$

4.3.4.5. Inactivación por sustrato suicida (H₂O₂)

La inactivación o inhibición por sustrato suicida es un proceso en el que un sustrato de la reacción enzimática se comporta como sustrato suicida, es decir, como inhibidor irreversible altamente específico que tiene una serie de propiedades:

- Es químicamente inactivo en ausencia de enzima.
- La molécula de inhibidor se activa específicamente por la enzima a la que va a inactivar.
- Una vez activado por la enzima, reacciona rápidamente con ella, uniéndose covalentemente a alguno de sus restos aminoácidos, inactivando de manera irreversible a la enzima.

Muchos son los estudios que han concluido que los peróxidos (sustratos oxidantes de las peroxidases) son también sustratos suicidas de las clases I, II y III de estas enzimas. Se ha propuesto un mecanismo de reacción que consiste en dos rutas competitivas del CoI de la enzima peroxidasa: una ruta catalítica y otra inactiva. El contenido de azúcares, las mutaciones puntuales de algún aminoácido y, sobre todo, la estabilidad enzimática, hacen que cada enzima tenga una sensibilidad distinta a estos sustratos suicidas. El principal objetivo de este estudio es examinar con detalle la sensibilidad de la peroxidasa de palma real (RPTP) al peróxido de hidrógeno y compararla con otras enzimas de clase I, II y III, previamente estudiadas. Todos los estudios realizados hasta la fecha con la peroxidasa de palma real revelan que nos encontramos ante la peroxidasa más estable jamás descrita. Cualquier dato que indique que es menos sensible que otras peroxidases a la inactivación, conferirán a esta enzima mayor valor añadido a la hora de poder sustituir con éxito a la peroxidasa comercial número uno, la de rábano picante, en sus aplicaciones biotecnológicas.

Las peroxidases son capaces de reaccionar con grandes excesos de peróxido de hidrógeno. Este hecho se observa, espectroscópicamente, por la aparición de una banda a 940 nm que decae con el tiempo y de un pico a 670 nm, debido a la existencia de una forma enzimática inactiva llamada complejo

verdohemoproteína P-670. Esta forma es similar al compuesto IV (CoIV), encontrado por Chance (Chance 1949), en la reacción de una peroxidasa con metilhidroperóxido.

El ciclo catalítico de una enzima peroxidasa comprende tres pasos, en el primero la enzima reacciona con una molécula de peróxido de hidrógeno dando lugar a una forma enzimática modificada denominada Col, mediante un proceso mono-electrónico en el cual el hierro hémico se oxida a estado oxiferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). Cuando un segundo electrón se mueve del anillo porfirina se genera un radical π -catiónico, donde la carga se encuentra deslocalizada sobre el anillo. En ausencia de sustrato reductor, los dos siguientes pasos del ciclo peroxidásico no ocurren. Sin embargo, si existen concentraciones en exceso de peróxidos, éstos pueden reaccionar con el Col previamente formado y llevar a la enzima por dos caminos bien diferenciados, uno catalítico y otro inhibitorio de la actividad enzimática. En función del tipo de enzima y de su resistencia a la inhibición, el porcentaje de proteína en una u otra forma será distinto. La reacción del peróxido con el Col puede ocurrir de dos modos: reducción bi-electrónica tipo catalasa, generando O_2 como producto, o una doble transferencia mono-electrónica, lo que daría lugar a una mezcla de ColI, ColII y radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

4.3.4.5.1. Sensibilidad enzimática al sustrato suicida

El estudio de inactivación consiste, en primer lugar, en evaluar la sensibilidad de la RPTP al inhibidor, para lo cual se incubarán 2,0 ml de disolución proteica 136,0 nM en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5 con diferentes relaciones de peróxido de hidrógeno durante 24 h (tiempo final) a 25 °C. La concentración de peróxido de hidrógeno se determina espectrofotométricamente, sabiendo que $\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2)_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Pasado ese tiempo se determina la actividad residual (A_R) de cada una de las muestras incubadas, por triplicado, usando guayacol como sustrato. En una cubeta de cuarzo, de 1 cm de longitud de paso óptico, se adicionarán 2 ml de mezcla de reacción que contiene 18,2 mM de guayacol, 4,9 mM de peróxido de hidrógeno, en tampón fosfato 100,0 mM, pH 6,0, y se mide la actividad enzimática en alícuotas proteicas de entre 5 y 20 μl de volumen. Se define la actividad residual como la relación entre la actividad enzimática a tiempo final y la actividad a tiempo cero ($A_R = A_t/A_0$).

Para calcular la sensibilidad proteica al inhibidor, se determina el número de recambio (r), que indica el exceso de inhibidor que será necesario para que la inactivación sea del 100%. Para ello se representa la actividad residual frente a los diferentes excesos de inhibidor y, de acuerdo con la Ec. 101, la intersección de la zona lineal de la representación con el eje de las abscisas determina el valor relacionado con la sensibilidad de la enzima al inhibidor. Esta ecuación se cumple si se tiene en cuenta que en cada ciclo catalítico se consumen dos moles de H_2O_2 (uno para formación del Col y otro para la inactivación o la catálisis).

$$A_R = \frac{A_t}{A_0} \approx 1 - \frac{1}{1-r} \frac{[H_2O_2]}{[RPTP]} \quad (101)$$

En la ecuación anterior A_R es la actividad residual, A_t la actividad a tiempo infinito (24 h), A_0 la actividad a tiempo inicial, r es el número de recambio y $[H_2O_2]$ y $[RPTP]$ son las concentraciones de peróxido de hidrógeno y de enzima al inicio de la reacción de inactivación.

4.3.4.5.2. Cinética de inactivación

La peroxidasa de palma real (RPTP), a concentración fija de 136,0 nM en 2,0 ml de tampón universal 30,0 mM, pH 6,5, se inactivada a 25 °C. Para ello, la reacción comienza con la adición del peróxido de hidrógeno (entre 0-400 mM), tomándose a intervalos de tiempo específicos una alícuota de la mezcla de incubación y midiéndose su actividad enzimática, usando guayacol como sustrato. Se representarán los datos de actividad residual frente al tiempo, siendo cada curva cinética el promedio de tres estudios. De ellas, se determinan los parámetros cinéticos del proceso de inactivación.

4.3.5. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LA RPTP

4.3.5.1. Efecto del pH en los espectros de absorción de la RPTP

Los espectros de absorción electrónica de la peroxidasa de palma real (RPTP) se obtuvieron con un espectrofotómetro, entre 250-700 nm a 25 °C y con una velocidad de barrido de 400 nm min⁻¹.

La peroxidasa de palma liofilizada se disuelve en tampón fosfato 20,0 mM, pH 5,5. Se dializa frente a este tampón durante una noche en cámara fría con agitación constante. Con 1 ml de esa disolución en una célula de cuarzo de 1 cm de paso óptico se registran sus espectros electrónicos. El pH se va modificando con HCl (conc) e NaOH (conc) entre 0,6 y 13,5. Se mide el pH de la disolución proteica antes y después de registrar cada espectro.

4.3.5.2. Determinación de las características espectroscópicas de los compuestos I, II y III de la RPTP

Las peroxidases de clase III normalmente oxidan diferentes sustratos siguiendo un mecanismo *ping-pong*, en el cual aparecen los Col y Coll, que son formas enzimáticas modificadas. El compuesto III (Coll) suele aparecer cuando se trabaja con un exceso de peróxido de hidrógeno (Gazaryan y Lagrimini, 1996). Para conocer la estructura de estos compuestos enzimáticos se prepara una disolución proteica de concentración 7,0 μM ($\epsilon_{403 \text{ nm}}(\text{RPTP}) = 59,1 \pm 0,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5.

El Col se detecta trabajando con una concentración de peróxido de hidrógeno 3,5 μM en 2 ml de la disolución proteica anterior a TA ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$). El Coll se observa con un exceso de peróxido de hidrógeno ~ 4 y el ColIII se detecta con unos excesos de peróxido de hidrógeno ~ 500 . Sobre 2 ml de disolución proteica se adicionan las cantidades de peróxido de hidrógeno necesarias ($\epsilon_{240}(\text{H}_2\text{O}_2) = 43,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), ese momento indica el inicio de la reacción que se seguirá espectrofotométricamente con el tiempo. Se registran a distintos tiempos los espectros de absorción, entre 350 y 700 nm, con una velocidad de barrido de 400 nm min^{-1} en una célula de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.3.6. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PROTEICA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X

4.3.6.1. Obtención de cristales proteicos

Para determinar la estructura de una proteína, a nivel atómico de resolución, existen hoy en día dos técnicas que son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la difracción de Rayos X. Para aplicar ésta última, es necesario crecer cristales proteicos, lo cual es tanto más difícil cuanto más grande es una molécula (las proteínas son macromoléculas). Los cristales son una repetición ordenada de una estructura fija. Las moléculas de una misma proteína pueden no ser exactamente iguales, y por tanto, no representar una estructura fija. Aunque su secuencia de aminoácidos sea la misma, en algunas ocasiones la proteína puede presentar varios conformeros que coexisten, bien de origen natural, bien como consecuencia de pequeños daños durante el proceso de purificación. Las modificaciones post-traduccionales y la formación de agregados aumentan la heterogeneidad de la muestra. Todo ello se opone al principio de uniformidad y dificulta la cristalización. Para someter cristales a un estudio estructural, éstos deben ser suficientemente grandes ($> 0,05\text{ }\mu\text{m}$, idealmente unos $0,3\text{ }\mu\text{m}$) y, además, tener un orden interno suficiente como para alcanzar una resolución mejor de 3 \AA .

Los cristales de cualquier sustancia se producen a partir de una solución sobresaturada. De este modo, se pretende obtener una solución sobresaturada de la proteína en los límites entre lo metaestable y lo inestable, intentando que dicha sobresaturación se alcance de manera lenta y gradual, para así generar unos pocos núcleos de cristalización sobre los que crezcan unos cuantos cristales, grandes y bien ordenados (Weber, 1991).

Las proteínas que se pretenden cristalizar tienen que cumplir una serie de requisitos: tener un elevado grado de pureza ($> 95\%$), encontrarse en cantidad suficiente (no menos de 20 mg), ser homogéneas (la heterogeneidad puede ser intrínseca, debida a fosforilaciones, nitrosaciones, diferentes grados de glicosilación, o experimental, debida a procesos de proteólisis, agregación o desnaturalización parcial), ser

estables en la disolución inicial y encontrarse a una concentración elevada (5-20 mg ml⁻¹, normalmente \geq 10 mg ml⁻¹). Este último factor depende de la solubilidad de la proteína. Normalmente se concentran por ultracentrifugación en una solución de baja concentración salina y de tampón.

Para alcanzar la sobresaturación, se comienza por una disolución de proteína concentrada y se aumenta aún más su concentración por eliminación gradual del agua o introduciendo cambios que reduzcan su solubilidad. Algunos factores utilizados para la obtención de soluciones sobresaturadas de proteínas son: eliminación de agua, cambios de pH, cambios de temperatura, baja fuerza iónica, alta fuerza iónica con (NH₄)₂SO₄, precipitantes poliméricos (PEG), ligandos específicos o solventes orgánicos volátiles (etanol, acetona,...) y no volátiles (etilenglicol, hexanodiol, etc).

Existen diferentes metodologías de cristalización, la más común se basa en alcanzar la sobresaturación mediante difusión de vapor. Una pequeña gota, preparada mezclando, a partes iguales, la disolución de proteína y la de cristalización, se mantiene dentro de una cámara hermética formada por un reservorio que contiene un volumen mucho mayor de solución de cristalización, sin que la gota y la solución del reservorio estén en contacto. La presión de vapor de agua es mayor en la gota que en el reservorio, y por tanto la gota pierde lentamente agua hasta que las concentraciones de agentes precipitantes en la gota y en el reservorio se igualan. Esta técnica tiene dos modalidades, la modalidad de gota colgante y la de gota asentada. En la primera, la gota se coloca sobre un cubreobjetos silicado, que luego se invierte y se utiliza para sellar un pocillo de una placa multipocillo, de manera que la gota queda colgando dentro del recinto sellado y separada de la solución de cristalización presente en el pocillo. En la segunda modalidad, la gota se asienta en una elevación plana o cóncava, situada por encima de la solución de cristalización. Antes de obtener los cristales definitivos, se buscan las condiciones óptimas de cristalización utilizando matrices de muestreo (Sparse Matriz) de 24 pocillos (Cristal Screens I, Cristal Screens II), de esta manera, a cada temperatura de estudio, se pueden explorar del orden de 80 condiciones. Una vez obtenidas las condiciones de cristalización, se comprueba que los cristales son adecuados y si no es así, se mejoran, variando el pH y las concentraciones de agente precipitante y/o aditivos.

Experimentalmente para cristalizar la peroxidasa de palma real (RPTP), se ha empleado el método de difusión de vapor de gota colgante usando matrices de muestreo Cristal Screens I y Cristal Screens II con sulfato amónico en un amplio rango de valores de pH. La gota colgante contiene 1 μ l de solución proteica de concentración 4,8 mg ml⁻¹ en tampón TRIS 5 mM, pH 7,4, más 1 μ l de solución de cristalización. En el reservorio se colocan 500 μ l de solución de cristalización a 277 K. Los cristales crecen en la gota colgante

durante 3-4 días, cuando la solución del reservorio contiene entre 2,4 y 3,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en un rango de pH comprendido entre 6,0 y 8,0.

4.3.6.2. Difracción de Rayos X de los cristales de proteína: recogida de los datos cristalográficos

Un cristal es un apilamiento de una celdilla unidad que se repite ordenadamente en las tres direcciones del espacio. Esta celdilla unidad queda definida por tres ejes (a, b y c) y tres ángulos interaxiales (α , β y γ). En el caso de las proteínas, se puede obtener la estructura tridimensional, incluyendo plegamiento y también detalles con un gran significado fisicoquímico, tales como distancias y ángulos de enlace, estado térmico vibracional de los átomos, empaquetamiento cristalino, etc, claves para entender su función biológica.

La difracción de Rayos X es el fenómeno físico de interacción de los Rayos X con los cristales. El haz de Rayos X incide sobre el cristal e interacciona con los electrones de los átomos que lo componen, haciéndolos vibrar. Los electrones oscilantes son focos de nueva radiación X que se emite de forma esférica, fenómeno llamado dispersión. Algunas veces, los Rayos X dispersados por los electrones interfieren entre sí y se anulan. En otras ocasiones, como los átomos en un cristal se encuentran ordenados, ocurre que en algunas direcciones se combinan y generan lo que se denomina dispersión cooperativa o difracción. Este fenómeno está claramente descrito por la ley de Bragg (1913), que dice que la difracción se produce entre dos planos paralelos separados una distancia (d), para un ángulo de incidencia (θ), tal que la diferencia de camino recorrido por los dos trenes de onda sea un múltiplo de la longitud de onda (λ) (Ec. 102).

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda \quad (102)$$

En la actualidad existen tres tipos de fuentes de Rayos X: los tubos de Rayos X, los tubos con ánodo rotatorio y los aceleradores de partículas. La fuente más potente es la última, la cual se emplea para la obtención de radiación sincrotrónica. No obstante, la fuente de tubos con ánodo rotatorio es la más empleada, ya que es 10 veces más potente que los tubos de Rayos X y, además, no requiere instalaciones tan especiales como los aceleradores de partículas.

En los experimentos de difracción se suelen usar los Rayos X duros, de una longitud de onda de 1 Å. Éstos se hacen incidir sobre un cristal, generando calor y radicales libres en las moléculas de proteínas y de solvente, produciendo con el tiempo daños irreparables en el cristal. Para evitar esto, se utiliza la técnica de criocristalografía, que consiste en enfriar el cristal con una corriente de nitrógeno frío (~ 100 K), saturando previamente el cristal con una solución crioprotectora (aceite mineral, glicerol, etc.), de tal modo que las moléculas de agua no estructurales se reemplacen por las moléculas del líquido crioprotector,

evitando así, la formación de hielo que generaría la rotura del cristal y la alteración de los datos cristalográficos. El cristal, una vez crioprotegido, se recoge con un brazo de fibra de nylon que se monta sobre un vástago metálico, colocándose todo ello en el extremo de una cabeza goniométrica que posee varios grados de libertad. El cristal se hace girar en intervalos de 1° , mientras se hacen incidir sobre él los Rayos X y el detector recoge la intensidad de los haces difractados. Existen dos tipos de detector: el "Imaging Plate", con un área de detección muy amplia (su diámetro puede alcanzar los 34,5 mm), permitiendo, por tanto, la detección de muchos haces difractados simultáneamente, pero en el cual el sistema goniométrico sólo permite el giro del cristal sobre el eje de montaje; el CCD "Charged Coupled Device", cuyo goniómetro tiene más grados de libertad y, mediante tres giros, permite orientar el cristal en cualquier dirección, si bien su área de detección es menor.

Del análisis de la posición e intensidad de los puntos de estas imágenes se puede deducir, con facilidad, la geometría de la celdilla elemental cristalina y su simetría (grupo espacial) que, junto a la intensidad asociada a cada punto recíproco, constituye toda la información que se puede obtener directamente de un experimento de difracción.

Además, a partir de los datos, tras la difracción de Rayos X de los cristales, se pueden determinar varios parámetros estadísticos que indican si la técnica ha sido adecuada o no. Dichos parámetros son (Blow, 2002):

- ◆ Difracciones únicas: difracciones necesarias para generar un grupo completo de difracciones mediante simetría.
- ◆ "Completeness": relación entre el número de difracciones únicas registradas y el número total de difracciones únicas teóricas.
- ◆ Multiplicidad: relación entre el número total de difracciones registradas y el número total de difracciones registradas únicas.
- ◆ Factor B: representa la disminución de la intensidad en la difracción debido al desorden del cristal. Incluye tanto el desorden estático del cristal como el desorden causado por las vibraciones térmicas. Cuando el valor de este factor es superior a 40 \AA , indica, o bien la presencia de lazos móviles, o bien que el modelo construido es erróneo.
- ◆ R_{merge} : diferencia entre los datos obtenidos experimentalmente y los calculados de forma hipotética. Cuando su valor está próximo a 0, indica que el modelo es correcto, si es superior a 0,59 indica que es erróneo.
- ◆ $I/\sigma(I)$: relación entre la intensidad de la difracción y el ruido de fondo. Su valor debe ser > 2 .

Experimentalmente, un cristal de RPTP se crioprotege con una solución de aceite mineral al 100%, se recoge con un asa de fibra de nylon y se congela con ayuda de una corriente de nitrógeno a 100 K. Todo ello se monta sobre una cabeza goniométrica de la cámara del detector del tipo "Image Plate" de MAR Research (MAR345dtb), que se alinea ópticamente y se centra. El cristal se mantiene en contacto con el flujo laminar de gas nitrógeno durante todo el proceso de recogida de datos. Como radiación se emplea la correspondiente al pico K_{α} ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) del cobre, usando como generador un ánodo rotatorio del tipo Rigaku UltraX-18 que opera a 50 kV y 100 mA y que está equipado con una lente confocal Max-Flux. Los datos de difracción son un conjunto de 96 imágenes, cada una de ellas correspondiente a un giro del cristal de 1° y un tiempo de exposición de 20 min por imagen. Los conjuntos de imágenes se tratan y analizan con los programas MOSFLM (Leslie, 1992) y SCALA (Bailey, 1994).

4.3.6.3. Determinación de la estructura y refinado

El objetivo de un estudio estructural es la determinación de la densidad electrónica, $\rho(xyz)$, para cada punto de la celdilla unidad. Inicialmente se obtiene información del espectro de difracción, si bien, para transformar esta información en información del espacio cristalino, se tiene que resolver una función denominada *transformada de Fourier* (Ec. 103), en la que intervienen los factores de estructura $F(hkl)$, definidos en cada punto del espacio recíproco (hkl) , y que contienen la resultante, en esa dirección, de la dispersión de los Rayos X. Los factores de estructura se calculan según la Ec. 104.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cos 2\pi(hx + ky + lz - \varphi(hkl)) \quad (103)$$

$$F(hkl) = \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (104)$$

Los factores de estructura son ondas y, como tales, se describen por sus módulos, $|F(hkl)|$, y sus fases, $\varphi(hkl)$. Los módulos representan la amplitud de los haces difractados y se obtienen directamente a partir de las intensidades que se recogen en el detector (Ec. 105). El problema radica en el conocimiento de sus fases, ya que éstas no se pueden medir experimentalmente y, por ello, se tiene que recurrir a distintas metodologías para resolver el problema de la fase.

$$I(hkl) = KALp |F(hkl)|^2 \quad (105)$$

Existen tres métodos para corregir el problema de la fase:

- ♦ Reemplazo isomorfo múltiple (MIR): se introducen en la estructura átomos altamente dispersores.
- ♦ Dispersión anómala múltiple (MAD): se introducen átomos dispersores anómalos.

- ♦ Reemplazo molecular (MR): se hace uso del modelo estructural de una proteína homóloga conocida. En este trabajo, se utiliza esta metodología para resolver el problema de la fase y se utiliza como modelo la estructura de la peroxidasa de rábano picante (HRP) (código 1h57 del *Protein Data Bank* (PDB), con un 36% de homología en la secuencia de aminoácidos). Para aplicar dicho modelo, se utilizan los programas CHAINSAW (Collaborative Computacional Project, Number 4, 1994), MOLREP (Vagin y Teplyakov, 1997) y Coot (Emsley y Cortan, 2004).

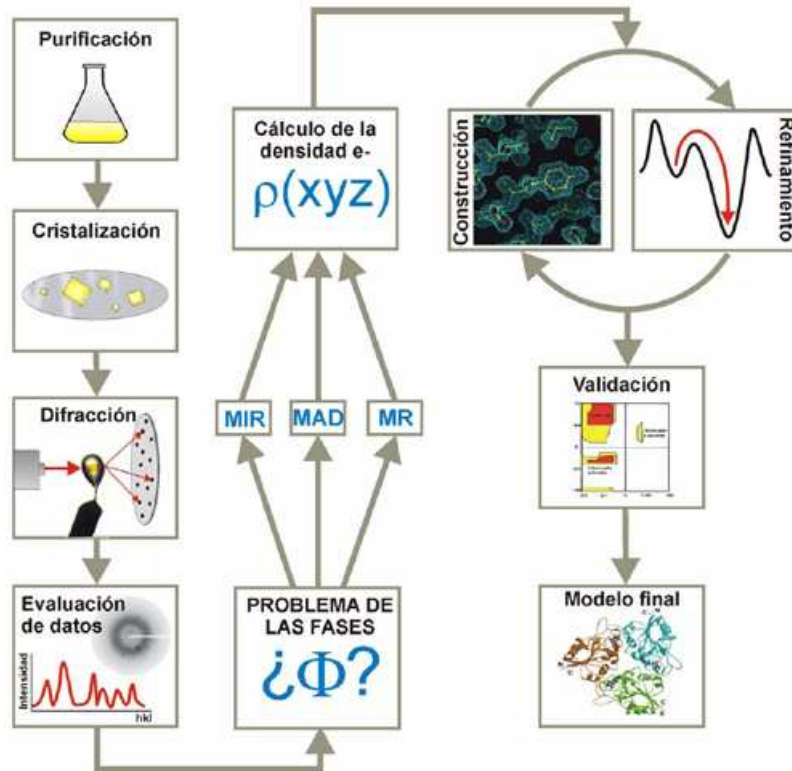


Figura 8. Esquema general que ilustra el proceso de resolución de estructuras cristalinas mediante difracción de Rayos X.

El resultado de una buena cristalización y de la determinación de la fase es una imagen tridimensional formada por nubes de electrones de la proteína, que se conoce con el nombre de mapa de densidad electrónica. A partir de este mapa y con la secuencia conocida de aminoácidos, se construye un modelo inicial de la estructura de la proteína, el cual da lugar a un modelo final tras ser sometido a una serie de refinamientos, los cuales se realizan con ayuda del programa REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997). Una de las funciones más conocidas para evaluar la bondad del refinamiento es el denominado factor de desacuerdo o factor R (Ec. 106). Este factor mide las diferencias entre el espectro observado (F_o) y el calculado (F_c), por lo que cuanto menor sea ese factor, mejor será el ajuste del modelo a los datos experimentales. Este último modelo de la estructura proteica proporciona las coordenadas cartesianas de cada uno de los átomos de la molécula, excepto las de los hidrógenos.

$$R = \frac{\sum (|F_o - F_c|)}{\sum (F_o)} \quad (106)$$

Una propiedad importante del modelo final es la resolución, es decir, la mínima distancia que puede ser definida. La unidad de este parámetro es el Å y, cuanto menor sea su valor, mayor será la resolución, es decir, el mapa de densidad electrónica será de mayor calidad.

Los experimentos de difracción de Rayos X y la interpretación de los datos obtenidos han sido realizados por el profesor D. Igor Polikarpov y su equipo, en el Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, Brasil.

4.3.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA RPTP

4.3.7.1. Espectrometría de masas

Conocer la secuencia de una proteína es importante, por una serie de razones:

- Es única, al menos en alguna zona, siendo, por tanto, la huella de identidad de la proteína.
- Define la estructura primaria de la proteína, que es fundamental para entender completamente su estructura y su función.
- La relación entre la secuencia de aminoácidos y el ADN es directa, lo que nos permite realizar estudios de Biología Molecular.

Existen diferentes técnicas para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína, la más antigua es la degradación de Edman, pero tiene sus limitaciones. Actualmente se aplica la espectrometría de masas combinada en muchos casos con estudios de Biología Molecular.

Entre las principales ventajas de la espectrometría de masas se encuentran: su alta sensibilidad, la rápida velocidad de análisis, la gran cantidad de información obtenida con cada experimento y la capacidad de caracterizar modificaciones post-traduccionales.

La base de un espectrómetro de masas son sus siete componentes principales: inyector de muestra, fuente de iones, analizador de masas, detector, sistema de vacío, sistema de control instrumental y sistema de datos. El cambio del inyector de muestra, la fuente iónica y el analizador de masas genera los diferentes tipos de espectrómetros de masas (Tabla X).

Tabla X. Variaciones de los componentes instrumentales típicos, usadas en los experimentos de secuenciación e identificación proteica.

Componente instrumental	
Inyector de muestra	1.Directo
	2.Cromatografía líquida en columna
Fuente iónica	1.Electrospray, nanospray y microspray (ESI)
	2.Desorción/Ionización láser con matriz asistida (MALDI)
Analizador de masas	1.Filtro de masas cuadrupolar
	2.Trampa iónica
	3.Tiempo de vuelo (TOF)

Cuando un analito va a ser analizado por espectrometría de masas es necesario que se encuentre en fase gaseosa y además en forma iónica, ya que la magnitud que va a registrar el detector son las relaciones m/z (masa/carga) de ese ión. Un ión en fase gaseosa se mueve fácilmente dentro de un campo electromagnético, pudiéndose controlar ese movimiento. Además, al utilizar iones en fase gaseosa aumenta la sensibilidad del instrumento.

Existen dos métodos de ionización: las técnicas ESI (*Electrospray*) y MALDI (*Matrix-assisted laser desorption / ionization*). La ionización ESI fue diseñada en 1985 (Whitehouse *et al.*, 1985; Fenn *et al.*, 1989). Una mezcla de péptidos en solución acuosa ácida se rocía a través de una aguja de pequeño diámetro, sobre la que se está aplicando un potencial positivo de gran magnitud (2 - 5 kV). Los protones de la solución ácida hacen que los péptidos estén cargados positivamente, ello hace que las gotas se muevan hacia el polo negativo del instrumento. Estas gotas viajan a través de un tubo que reduce su tamaño por evaporación debido a la existencia de un flujo gaseoso (N_2) y de calor. Este proceso se lleva a cabo hasta que se generan péptidos protonados en fase gaseosa que entran en el espectrómetro de masas. Las ventajas de esta forma de ionización son: alta eficiencia y compatibilidad con HPLC de fase reversa debido a que los solventes que se usan tienen excelentes propiedades electrospray. La desventaja principal es que la técnica es muy sensible a contaminantes como el SDS. La característica principal es que los péptidos que se forman, pueden tener diferentes estados de ionización, ya que se ioniza el átomo de nitrógeno del extremo N-terminal y los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de aminoácidos básicos (Lys, Arg e His), por ello los péptidos pueden tener carga múltiple. Los péptidos de una digestión con tripsina suelen estar doblemente cargados, ya que esta peptidasa rompe el enlace que se forma entre los aminoácidos K-X y R-X. En algunas ocasiones se utiliza para mejorar el proceso de ionización “*Sheath gas*”. Para aumentar la sensibilidad de este método de ionización se utilizan velocidades de flujo menores y agujas con diámetros más pequeños para generar las gotas (microspray y nanospray).

La ionización MALDI fue descrita el 1988 (Karas y Hillenkamp, 1988; Hillenkamp *et al.*, 1991). En este método los péptidos se disuelven en una solución que absorbe la radiación UV (solución matriz) y se depositan sobre la placa del espectrómetro. Cuando esta solución se seca la matriz cristaliza y los péptidos quedan inmersos en los cristales de la matriz. Sobre ellos, se hace incidir un pulso de láser UV que produce la vaporización de elementos de la matriz y de péptidos. El proceso de ionización ocurre por protonación de los péptidos mediante componentes ácidos de la matriz. Este sistema de ionización resiste mejor la presencia de contaminantes en la muestra (urea 0,5 M, guanidina 0,5 M, SDS 0,01%, DTT 0,5 M, glicerol 1%, metales alcalinos 0,5 M, TRIS 50 mM y fosfato 50 mM). Algunos inconvenientes son que a veces los péptidos no están incluidos en la matriz cristalizada y que si los niveles de contaminación son muy elevados pueden saturar el detector.

Existen diferentes tipos de analizadores de masas. Todos ellos registran la relación m/z de los iones del analito. La unidad de medida es el Thomson (Th) (Cooks y Rockwood, 1991). La elección del analizador determina la resolución y el rango de valores m/z que puede ser medido.

♦ Filtro de masas cuadrupolar

Fue el primer analizador que se utilizó de manera rutinaria asociado a los espectrómetros por su facilidad de uso y su alto rendimiento. Los espectros se registran a una velocidad de 1000 Th s^{-1} , adquiriendo en 1,8 s un espectro con masas comprendidas entre los 200 y los 2000 Th. La velocidad de trabajo es compatible con la técnica HPLC. Su resolución es de 1Th, por lo que puede mostrar el cluster isotópico de un ión monoisotópico, pero no de iones con cargas superiores a la unidad. La precisión en la medida es de $\pm 0,1$ Da (monoisotópicos). El rango de m/z que puede detectar es de 10 hasta 2000, rango de masas suficiente para analizar los péptidos procedentes de una digestión trípica. Su limitación de sensibilidad es que de todos los iones generados en el ionizador, son muy pocos los que son detectados (0,1%).

♦ Analizador de trampa iónica

Es más sensible y eficaz que el filtro cuadrupolar debido a su pequeño tamaño (varios cm), por lo que la mayoría de los iones que se generan en la fuente de ionización llegan al detector. El carácter compacto del sistema lo hace menos costoso. La principal característica de la trampa iónica es que presenta un tiempo de acumulación iónico, que genera un aumento de la sensibilidad. Si la generación de iones es rápida el tiempo de acumulación será pequeño, pero si los iones se producen con un flujo lento el tiempo de acumulación aumentará (250 ms). La resolución es de 1 Th. Puede detectar relaciones m/z de hasta 2000

Th, no existiendo en este caso límite inferior. Ello es óptimo es los sistemas en tándem para observar productos iónicos (Le Blanc *et al.*, 2003).

♦ **Analizador TOF “time-of-flight”**

El método de operación de este analizador es muy sencillo. Sobre los iones positivos se aplica un alto voltaje (+ 20 - + 30 kV). Estos iones se mueven en el interior de un campo eléctrico de longitud s , con una energía cinética directamente proporcional a su carga (Ec. 107). Los iones acelerados entrarán en una región libre de campo de longitud D (tubo de vuelo), su energía cinética (Ec. 108) los transportará a través de esta región, y su velocidad será inversamente proporcional a su masa (Ec. 109). El tiempo que tarde un ión en recorrer esa región D nos servirá para conocer su velocidad y en último lugar su relación m/z (Ec. 110).

$$K = EZ_e s \quad (107)$$

$$K = \frac{mv^2}{2} \quad (108)$$

$$v = \left(\frac{2EZ_e s}{m} \right)^{1/2} \quad (109)$$

$$\frac{m}{Z_e} = 2Es \left(\frac{t}{D} \right)^2 \quad (110)$$

K es la energía cinética del ión, E es el potencial inicial aplicado, Z_e la carga del ión, s la longitud del campo eléctrico, m la masa del ión, v la velocidad, t el tiempo y D la longitud del tubo de vuelo o zona libre de campo.

La resolución de este analizador se ve afectada por el proceso de ionización, por las dimensiones del tubo de vuelo y por el voltaje inicial aplicado para acelerar los iones. A veces iones con la misma relación m/z tienen energías cinéticas diferentes y llegan al detector a tiempos distintos lo que degrada la resolución del instrumento. Esto inicialmente se corrigió aumentando el potencial inicial aplicado y la longitud del tubo de vuelo. Actualmente el problema se soluciona corrigiendo el sistema con una extracción retrasada de los iones en la región libre de campo, con un reflector iónico o “*reflectrón*” o con una combinación de ambas metodologías. Estos sistemas corrigen las diferencias de energía cinética de iones con la misma relación m/z aumentando 10.000 veces la resolución. El analizador no tiene limitaciones en el rango m/z , sirve para analizar proteínas intactas, es muy sensible, muy resolutivo y los resultados se obtienen a gran velocidad.

4.3.7.1.1. Espectrometría de masas en tándem

En muchas ocasiones es necesaria la separación de un ión concreto para su posterior análisis. La espectrometría de masas en tándem introduce un paso previo para aislar ese ión con una relación m/z determinada, primera fase del análisis o separación. Posteriormente, en una segunda fase del análisis, ese ión se fragmentará y finalmente se analizan los fragmentos iónicos. En el caso de que el ión seleccionado sea un péptido los fragmentos iónicos permitirán conocer su secuencia de aminoácidos.

El proceso de fragmentación o disociación inducida por la colisión (CID) "*Collisionally Induced Dissociation*", consiste en fragmentar un ión en una región de alta presión mediante la colisión con moléculas gaseosas neutras. En este proceso parte de la energía cinética del ión se transformará en energía interna, lo que inestabilizará al ión produciendo su fragmentación.

La espectrometría de masas en tándem puede ser de dos tipos:

- ♦ Tándem en espacio: son instrumentos que tienen más de un analizador de masas, cada uno de los cuales lleva a cabo una fase del experimento de manera independiente.
- ♦ Tándem en tiempo: son instrumentos que tienen un solo analizador de masas, pero necesitan para analizar un ión en concreto, atraparlo previamente y separarlo del resto. Estos experimentos se denominan "MSⁿ", donde n determina el número de etapas del análisis de masas.

4.3.7.2. Análisis del extremo N-terminal

Para realizar el análisis del extremo N-terminal de la proteína intacta y resolver algunos péptidos de la digestión triptica se utiliza el instrumento Procise de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo establecido. El sistema de secuenciación proteico, basado en la reacción de Edman, analiza secuencialmente los aminoácidos que se van eliminando del extremo N-terminal de una proteína o de un péptido. En primer lugar hay que hacer un tratamiento previo de la muestra. Una disolución proteica (2-5 mg ml⁻¹) en tampón BCA 100 mM, pH 8,3 se desnaturaliza con GuHCl 5 M, se reducen los puentes disulfuro con 2-mercaptoetanol al 1% (v/v), durante 2 min a 85 °C y finalmente se alquilan las cisteínas con 4-vinilpiridina al 5% (v/v), durante 1 h y TA. La proteína S-piridiletalada se somete a un análisis de la secuencia del extremo N-terminal.

Los primeros datos publicados de esta técnica datan de la década de los 50 del siglo pasado (Edman 1950; 1956).

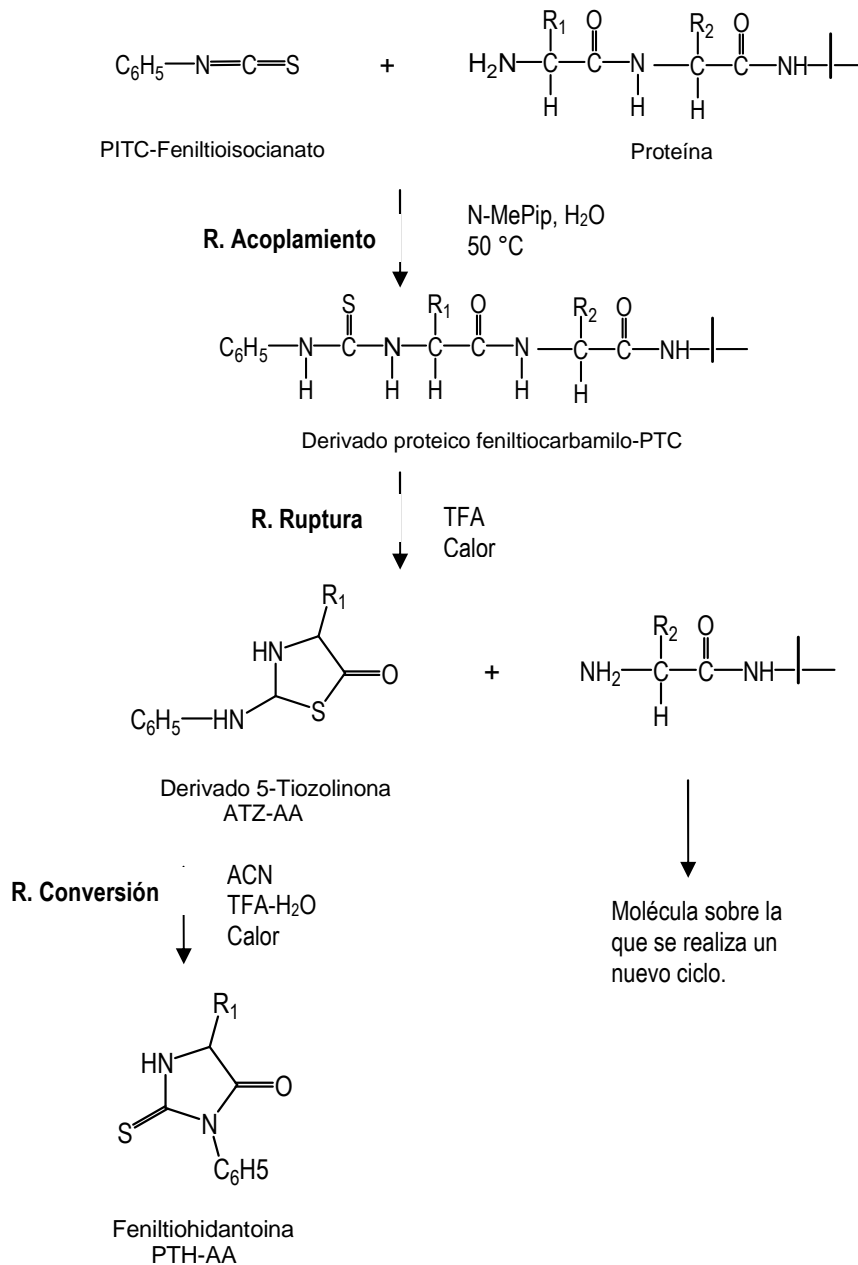


Figura 9. Etapas de la degradación de Edman.

Se utiliza la reacción de Edman para romper el enlace peptídico de aminoácido del extremo N-terminal, usando fenilisotiocianato (PITC). Este compuesto primero se une al átomo de N, del extremo N-terminal, formándose un derivado proteico feniltiocarbamilo (PTC-Proteína), el cual genera la ruptura del enlace peptídico, dando lugar a un derivado 5-tiozolinona (ATZ-AA) que se reestructura y genera el compuesto que se va a analizar mediante HPLC, feniltiohidantoina (PTH-AA) (Fig. 9). En cada ciclo se rompe un aminoácido, por lo que es una técnica bastante lenta. La automatización del sistema permite trabajar con pequeñas cantidades de proteína (1-5 pmol), que permite realizar 20 ciclos, detectando un aminoácido cuando su concentración se encuentra entre 0,2 y 1,0 pmol. Se puede aplicar a proteínas intactas, sin necesidad de

digerirlas, su sensibilidad es alta y es un método fácil de manejo e interpretación de los resultados. Los fragmentos proteicos se analizan mediante HPLC. Previamente por la columna se ha pasado una mezcla estándar de los 20 aminoácidos puros, para conocer el tiempo de elución de cada uno de ellos (calibrante). Su principal inconveniente es la lentitud (45 min por cada ciclo), su limitación es que no se puede aplicar a proteínas que tengan bloqueado el extremo N-terminal. La longitud de la secuencia proteica que puede ser determinada está limitada por la eficiencia química de la degradación y además por una serie de características de la muestra como son: la pureza, la cantidad, la masa molecular y la conformación. La eficiencia de la secuenciación desciende con cada ciclo de degradación. La degradación consta de tres etapas claramente diferenciadas (Fig. 9):

♦ **Reacción de acoplamiento**

El acoplamiento entre el átomo de N del extremo N-terminal de la proteína con el reactivo PITC, requiere un medio básico que se consigue adicionando N-metilpiperidina-H₂O. El ambiente básico desprotona los grupos -NH₂ libres para la posterior reacción de acoplamiento con PITC. La temperatura del proceso suele ser de 50 °C para que la reacción sea rápida y eficiente. Acabado el proceso, se seca para eliminar los restos acuosos y se lava con acetato de etilo y cloruro de n-butilo para eliminar los excesos de reactivos y los subproductos de la reacción.

♦ **Reacción de ruptura**

Para llevar a cabo esta etapa se requiere un medio fuertemente ácido que se consigue adicionando TFA (catálisis ácida). Se debe de conseguir la ruptura completa del compuesto ATZ-AA y evitar los subproductos no deseados por rupturas en otras zonas de la cadena peptídica. La eficiencia de la ruptura depende del aminoácido que se encuentre en el extremo N-terminal y del próximo aminoácido que se encuentre en la cadena. Después se lava para eliminar el exceso ácido y se seca para retirar el agua.

♦ **Extracción y reacción de conversión**

El compuesto ATZ-AA se extrae del cartucho, para ello se utiliza cloruro de n-butilo y acetato de etilo y se introduce en un frasco. Una vez aislado se convierte en una forma más estable PTH-AA, para ello se adiciona un pequeño volumen de ACN al 10%. Se evaporan los compuestos utilizados para la extracción y se reduce el volumen. La muestra no se debe secar completamente. Finalmente se disuelve en ACN al 10% y se introduce en el sistema cromatográfico, donde se detectará.

4.3.7.3. Digestión proteica

La digestión proteica consiste en la fragmentación de una proteína en un conjunto peptídico heterogéneo, con ayuda de diferentes enzimas de digestión. Las más empleadas son: tripsina y quimotripsina. La tripsina es una enzima de digestión muy específica, rompe el enlace peptídico de aminoácidos básicos como la lisina (K-X) y la arginina (R-X), la ruptura no se produce cuando el residuo X es una prolina. La quimotripsina produce ruptura en los enlaces peptídicos de residuos hidrofóbicos voluminosos como Phe, Trp y Tyr, cuando no forma parte del enlace la Pro. Existen otras muchas enzimas proteolíticas como la elastasa, termolisina, pepsina y endopeptidasa V8. En muchas ocasiones se emplean en las digestiones mezclas de diferentes enzimas. Una digestión proteolítica con tripsina, por la abundancia relativa de los residuos K y R, da lugar a péptidos con relaciones m/z inferiores a 2000 Th, normalmente.

La digestión proteica se puede realizar de diferentes modos:

- Incubación de la proteína pura en una disolución tamponada al pH óptimo de trabajo de la enzima de digestión (para la tripsina es de 8,0-8,3), durante largos periodos de tiempo a 37 °C, calentando (10-15 min a 100 °C) o a TA si se adiciona al medio un agente químico desnaturizante como la guanidina.
- Aislamiento de la proteína pura en un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), revelando con el colorante azul de *Coomassie*. La banda proteica se fragmenta y sobre ella se realiza la digestión de manera manual o con ayuda de un digestor automático. Ambas digestiones se llevan a cabo de la misma manera. El proceso consta de cuatro etapas:
 - ◆ **Preparación de la muestra.** Se realiza el gel al 12%, se corta la banda proteica y se fragmenta en pequeños trozos. Estos fragmentos de gel se lavan en varias ocasiones para eliminar los restos de tampones y detergentes usados durante el proceso de SDS-PAGE. En primer lugar se deshidratan con ACN al 40% y, a continuación, se rehidratan con BCA 200,0 mM.
 - ◆ **Alquilación-reducción.** Como las proteínas tienen en su estructura puentes disulfuro responsables de la estructura tridimensional, éstos se reducirán para que el proceso de digestión sea más efectivo. La reducción se lleva a cabo con DTT (10-50 mM) o con TCEP (20 mM) en tampón BCA 25 mM, a 60 °C durante 30 min. Los grupos sulfuro libres se alquilarán con IAM 40 mM en tampón BCA 25 mM, durante 30 min a 37 °C, con agitación. Se lavan los fragmentos varias veces con BCA 25 mM / ACN 50%, durante 15 min y 37 °C. Finalmente se secan durante 30 min con un SpeedVac.

- ♦ **Digestión proteica.** La enzima de digestión (tripsina) se activa en tampón BCA 25 mM, pH 8,3 y se adiciona de manera que la concentración final sea de $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Se incuba durante 1,5 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Durante este proceso se adiciona agua para evitar la evaporación total.
- ♦ **Extracción de los péptidos.** Se extrae el sobrenadante (que se recoge). Sobre los fragmentos del gel se realizan varios lavados con BCA 25 mM / ACN 9% para arrastrar todos los péptidos del gel. Este sobrenadante se junta con el anterior y se seca con SpeedVac. Luego se resuspende en ácido fórmico al 10% o en ACN 50% / TFA 0,1%.

La digestión de la RPTP se realiza siguiendo ambos procedimientos:

-Disolución de una muestra proteica pura ($2\text{-}5 \text{ mg ml}^{-1}$) en BCA 100 mM, pH 8,3 e incubación con tripsina en relación 1:100 (m/m) enzima-sustrato durante 18 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

-Digestión partiendo de una banda proteica de un gel SDS-PAGE revelado con azul de *Coomassie*, utilizando como enzima de digestión tripsina de páncreas bovino, como agente reductor DTT y realizando un proceso de digestión automática con el digestor ProGest.

4.3.7.4. Análisis de los péptidos trípticos

Para comprobar si el proceso de digestión ha transcurrido con éxito se registrará un espectro de masas de la mezcla de péptidos trípticos y se calculará la masa molecular de cada uno de ellos, usando como estándar de calibración una mezcla de péptidos trípticos de lectina de semillas de *Cratylia floribunda*, que tiene un rango de masas moleculares desde 450 hasta 3300 Da.

Para llevar a cabo este proceso, $0,65 \mu\text{l}$ de solución tríptica se mezcla en la placa Anchor del MALDI-TOF con el mismo volumen de una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en ACN al 50% y TFA al 0,1%, se deja secar y se analiza con un espectrómetro de masas MALDI-TOF, modelo Voyager-DE Pro. Mediante el programa X-TOF se hace una calibración del espectro mediante un ajuste cuadrático utilizando para ello las masas de los picos de la tripsina u otros picos conocidos. Se comprueba la calidad de los espectros de cada uno de los picos y se eliminan los de mala calidad. Si se obtiene una buena cantidad-calidad de péptidos trípticos con unas masas adecuadas, se procede a separarlos para hacer un análisis más detallado de cada uno de ellos.

La mezcla de péptidos trípticos obtenidos mediante la incubación en solución se separa mediante una cromatografía en fase reversa con un sistema HPLC ETTAN™ LC, usando una columna de licrosfera RP100C₁₈ (250 x 4 mm, con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$). En la cromatografía de fase reversa

HPLC-RPC, como resina se utiliza una matriz de sílica a la que se une un hidrocarburo saturado, insaturado o aromático. La fase estacionaria que se usa con mayor frecuencia es $[\text{SiO}_2]\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$, llamada comúnmente C_{18} . Estas fases son de naturaleza apolar, las partículas a separar son ligeramente apolares y se retienen en la matriz. Al disminuir la polaridad del disolvente se eluyen en orden decreciente de polaridad. Como la mezcla triptica se encuentra en una solución ácida los péptidos quedan retenidos en la columna. Se trabaja con una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} y se eluyen con un gradiente lineal de TFA al 0,1% en agua (Solución A) y ACN (Solución B): 5% de B durante 10 min, seguido de 5-45% de B durante 120 min y 45-70% de B durante 20 min. Los péptidos se siguen mediante su absorbancia a 215 nm (longitud de onda a la que absorbe el enlace peptídico), se recogen y se secan en un Speed-Vac. Estos péptidos aislados por HPLC se caracterizan mediante diferentes técnicas: secuenciación del extremo N-terminal, espectrometría MALDI-TOF-MS y espectrometría de masas en tándem (CID-MS/MS).

Para obtener la secuencia de los péptidos tripticos una mezcla de proteína digerida en solución se carga sobre una columna y se somete a una ionización electrospray utilizando como analizador de masas una trampa iónica (QTrap) de Applied Biosystems equipada con una fuente iónica nanospray (Protana). Los péptidos dobles y triplemente cargados obtenidos del espectro de masas MALDI-TOF se analizan mediante una técnica de mejora de la resolución, que se ejecuta a 250 Th s^{-1} , a través de un rango de masas completo. Los iones monoisotópicos se fragmentan mediante una herramienta de trabajo asociada a la trampa iónica. Los experimentos MS/MS se llevan a cabo de la siguiente manera: Q1 es la resolución ($\pm 1 \text{ Th}$), Q1/Q2 es la energía de colisión (30-40 eV), Q3 es la barrera de ingreso (8 V), la trampa iónica lineal (LIT) actúa durante 250 ms y a una velocidad de barrido de 1000 Th s^{-1} . Los espectros obtenidos de la fragmentación inducida por colisión de los péptidos, se analizan manualmente, utilizando una versión con licencia del programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), contra la base de datos SwissProt/TrEMBL (<http://us.expasy.org/sprot/>).

4.3.7.5. Extracción de ARN de las hojas de la palmera real

Cuando se trabaja con plantas uno de los problemas más frecuentes se encuentra en el proceso de extracción del ARN. Ello se debe a que la presencia de polifenoles, resinas, almidón y tejidos fibrosos dificulta la extracción y degrada este material genético. Para la extracción del ARN de las hojas de palmera real se utilizará el reactivo específico Concert Plant RNA (Invitrogen), siguiéndose el protocolo descrito. El kit está diseñado específicamente para la extracción de ARN de plantas (hojas, semillas y otros tejidos). Se ha extraído con éxito ARN de plantas como: patata, trigo, tomate, soja, arroz, hojas de pino blanco, abeto, etc.

Cuando se recogen muestras de un organismo vivo, el material genético se degrada muy rápido debido a la presencia de las enzimas RNasa y DNasa. Por ello, se cortan varias hojas de palmera real y se congelan *in situ* en nitrógeno líquido para minimizar las reacciones de degradación. En el laboratorio estas hojas se reducen a polvo con un mortero y el producto resultante se congela a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una descongelación accidental provocaría la degradación del ARN. A continuación, se puede comenzar el proceso de extracción con el reactivo específico (5 ml del reactivo por cada gramo de tejido congelado) siguiendo el protocolo establecido (Tabla XI).

Tabla XI. Etapas del proceso de extracción de ARN, utilizando el reactivo Concert Plant RNA de Invitrogen.

Paso	Proceso	Reactivo (ml)	T ($^{\circ}\text{C}$)	t (min)	Anotaciones
1	Adición del reactivo	Plant RNA (5 ml/g tejido)	4	-	Agitar hasta una completa resuspensión
2	Incubación	-	TA	5	-
3	Centrifugación	-	4	5	2600 x g
4	Filtración del sobrenadante	-	-	-	Tamiz de nylon de 100 μm
5	Adición de NaCl	NaCl 5 M (2 ml/10 ml de sobrenadante)	-	-	Agitar
6	Adición de cloroformo	Cloroformo (6 ml/10 ml de sobrenadante)	-	-	Agitar
7	Centrifugación	-	4	30	2600 x g
8	Adición alcohol -Fase acuosa	Alcohol isopropílico (0,9 ml)	TA	10	Agitar
9	Centrifugación	-	4	30	2600 x g
10	Adición de etanol-Pellet	Etanol 75% (5-10 ml)	-	-	Agitar
11	Centrifugación	-	4	5	2600 x g
12	Resuspensión	Agua libre de RNasa (250-500 μl)	-	-	Mezclar
13	Centrifugación	-	TA	1	12000 x g
14	Extraer el sobrenadante	-	-	-	Almacenar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Una vez extraído el ARN, como en cualquier otro proceso, hay que estimar su grado de pureza. Para ello, se hace una electroforesis en gel de agarosa y se determina la relación de absorbancias: A_{260} / A_{280} . La absorbancia a 280 nm se corresponde con la contaminación proteica y la absorbancia a 260 nm es debida al material genético. Cuando esa relación es $\geq 1,8$ se puede decir que la contaminación es despreciable. En nuestro caso este parámetro toma el valor de 1,9. Se obtendrá un ARN de alta pureza con un gran rendimiento, para múltiples aplicaciones posteriores como RT-PCR.

4.3.7.6. Transcripción reversa (RT)

El cADN (ADN complementario o ADN copia) se obtiene utilizando como molde una hebra de ARN, normalmente ARN_m. Esta reacción recibe el nombre de transcripción inversa o retrotranscripción (RT) y utiliza como enzima una transcriptasa inversa. Los objetivos de esta metodología pueden ser, construir una

librería de cADN, es decir, un conjunto de clones (cientos o miles) que representen la mayor cantidad posible de ARN_m de un tipo celular. En otras ocasiones, se pretende obtener un clon de cADN que se corresponda con un ARN_m concreto, del que se conoce parte de su secuencia. Este sería nuestro objetivo, aislar el cADN correspondiente al ARN_m que codifica la peroxidasa de palma real. Parte de su secuencia la conocemos mediante estudios de espectrometría de masas. A este último proceso se lo conoce con el nombre de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción reversa).

Para que se produzca una copia de ADN a partir de una de ARN, se requiere un cebador o *primer*. Normalmente se usa para ello una cola de oligo(dT), ya que en el extremo 3' de la mayor parte de ARN_m de eucariotas hay una cola de poli(A). El oligo(dT) es complementario de esa cola, se enlaza a ella y se inicia la síntesis de la primera hebra de ADN usando como molde el ARN_m y como enzima una retrotranscriptasa. Sintetizada la primera hebra de ADN y formado un híbrido ADN/ARN, la siguiente etapa sería la degradación de la hebra de ARN con una ribonucleasa (RNasa H). A partir de este momento se podría obtener un ADN de doble cadena utilizando los fragmentos de ARN como cebadores y como enzima una ADN polimerasa (librería de cADN), o se podrían amplificar fragmentos concretos de este ADN con cebadores o *primers* que forman parte del ARN_m que se quiere amplificar (RT-PCR). Normalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comienza con un ADN de doble cadena, en este caso concreto lo hace con un ARN_m.

La obtención de la primera hebra de ADN a partir del ARN_m se realiza de la siguiente manera: 2 µg ARN total se desnaturalizan mediante calentamiento a 70 °C durante 10 min, con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias de las moléculas de ARN y se mezclan con 5 µl de dietilpírocarbonato (DEPC) al 0,15%, tratado con agua, que contiene 0,2 µg del cebador Qt: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCT(T)₁₆- 3' (oligo(dT)). Todo ello se enfría y se mezcla con 4 µl de tampón de la hebra primaria 5x, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40 u/µl), 1 µl de dNTP 10,0 mM (de cada uno de ellos), 200 unidades enzimáticas de transcriptasa reversa del virus de la leucemia *Moloney Murine* (MMLV RT) y de RNasa H. El volumen final se ajusta a 20 µl y se incuba a 42 °C durante 1 h, seguido de una inactivación enzimática por calentamiento a 50 °C durante 10 min.

4.3.7.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una de las técnicas más frecuentes para amplificar fragmentos de ADN. Fue inventada en 1988 por el equipo de Kary B. Mullis (Mullis et al., 1986, Mullis y Faloona, 1987). La reacción consta de tres etapas fundamentales (Fig. 10).

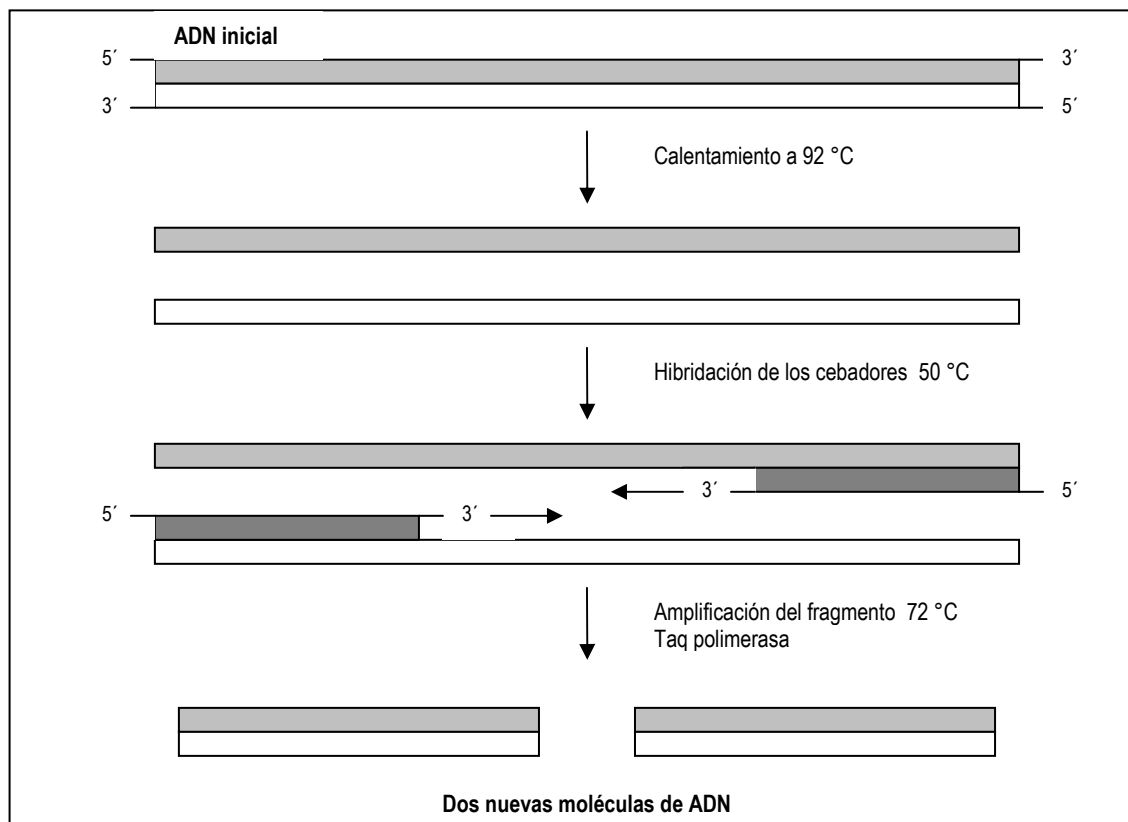


Figura 10. Amplificación de ADN mediante PCR. El conjunto de las tres etapas se denomina ciclo térmico.

- ♦ **Calentamiento:** a temperaturas > 90 °C. Tiene como objetivo separar las dos hebras de la molécula de ADN.
- ♦ **Reconocimiento y unión de cebadores:** se reduce la temperatura a unos 40 °C. El objetivo es la unión de los primers o cebadores a las zonas específicas de la hebra o molde de ADN.
- ♦ **Amplificación:** se trabaja a una temperatura intermedia de 70 °C. En esta etapa con ayuda de una ADN polimerasa y de dNTPs se amplifica la zona de ADN comprendida entre los dos cebadores.

El conjunto de estas tres etapas se denomina ciclo térmico y normalmente se suelen realizar más de 20 ciclos en cada reacción. En cada ciclo crece exponencialmente el número de fragmentos amplificados, con 20 ciclos, partiendo de una molécula de ADN, se conseguirían 2^{20} fragmentos. Los cebadores suelen ser oligonucleótidos sintetizados químicamente formados por 15-20 pares de bases. Muy importante es trabajar con una ADN polimerasa estable a altas temperaturas, para ello se usa la Taq polimerasa, perteneciente a la bacteria *Thermus aquaticus*.

El cADN se amplificó mediante PCR, utilizándose para ello 2 μ l como molde. El cebador delantero (*forward*) se sintetizó químicamente de acuerdo a la secuencia $^{94}\text{TVSCADI}^{100}$ obtenida mediante

secuenciación *de novo* de los espectros de masas de los productos iónicos de los péptidos trípticos, 5'- ACCGCTCTTGCGCCGACATC- 3' y como cebador trasero (*reverse*) se utiliza un fragmento (QI) del cebador Qt, 5'- GAGGACTCGAGCTCAAGC- 3'. Se prepara una mezcla con los cebadores, el cADN, la enzima Taq polimerasa y los dNTPs. Todo ello se introduce en un termociclador y se seguirá el siguiente protocolo de actuación (Tabla XII).

Tabla XII. Protocolo de amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR "Touch-Down 50/40". (*) La temperatura de anillamiento comienza en el primero de los 21 ciclos a 50 °C, pero en cada ciclo siguiente se reduce 0,5 °C, de manera que en el ciclo 21 es de 40 °C.

Etapas	Proceso	T (°C)	t (s)
Inicial	Desnaturalización	92	600
	Desnaturalización	92	45
5 ciclos	Hibridación	50	45
	Amplificación	72	60
	Desnaturalización	92	45
21 ciclos	Hibridación (*)	50	45
	Amplificación	72	60
	Desnaturalización	92	45
10 ciclos	Hibridación	40	45
	Amplificación	72	60
	Amplificación	72	600

Con este procedimiento y los cebadores utilizados se consigue amplificar un fragmento de aproximadamente 900 bp (nucleótidos 166-1018). Parte de este nuevo ADN secuenciado se usó para crear un nuevo cebador *reverse* 5'-CCACTGGTGTCTGTTGAAGTTGTAGAG- 3', que se corresponde con la secuencia ¹⁸³LYNFNSTSG¹⁹¹, para así poder completar la secuencia de nucleótidos de la peroxidasa de palma real. El cebador *forward* degenerado, designado por la secuencia de aminoácidos ³⁹MHFHDCFV⁴⁶, es 5'-ATGCAYTTYCAYGAYTYGTYGT- 3'. Estas dos secuencias han sido obtenidas por secuenciación del extremo N-terminal de la peroxidasa de palma nativa y análisis MS/MS de sus péptidos trípticos. Esta reacción de PCR utiliza otro protocolo de amplificación distinto del anterior (Tabla XIII).

Tabla XIII. Protocolo de amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR "Touch-Down 60/50". (*) La temperatura de anillamiento comienza en el primero de los 21 ciclos a 60 °C, pero en cada ciclo siguiente se reduce 0,5 °C, de manera que en el ciclo 21 es de 50 °C.

Etapas	Proceso	T (°C)	t (s)
Inicial	Desnaturalización	92	600
	Desnaturalización	92	45
5 ciclos	Hibridación	60	45
	Amplificación	72	60
	Desnaturalización	92	45
21 ciclos	Hibridación (*)	60	45
	Amplificación	72	60
	Desnaturalización	92	45
10 ciclos	Hibridación	50	45
	Amplificación	72	60
	Amplificación	72	600

4.3.7.8. Diseño de “primers” o cebadores

Uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR es el diseño de los oligonucleótidos cebadores (*oligos* o *primers*). Las variables que hay que tener en cuenta son:

- ♦ **Tamaño del oligonucleótido:** influye en la especificidad, en la temperatura de fusión y en el tiempo de hibridación con la secuencia complementaria. Deben tener un tamaño de entre 18 y 24 pares de bases (6-8 aminoácidos). El oligo debe de hibridar correctamente a la temperatura fijada en el termociclador y esa temperatura de hibridación debe ser del orden de 5-8 °C inferior a la temperatura de fusión.
- ♦ **Temperatura de fusión (T_m^*):** como en la reacción de PCR hay dos *primers*, éstos deberían tener una temperatura de fusión similar. T_m^* se puede calcular recurriendo a expresiones de carácter termodinámico. Una buena aproximación para su cálculo se consigue con el uso de la fórmula de Wallace ($T_m^* = 2(A + T) + 4(G + C)$). Suele proporcionar unos valores bastante exactos para oligos con un tamaño de entre 18 y 24, para oligos de tamaños extremos, los valores calculados tienen bastante error. Cuando el tamaño del oligo es de 18 y 24 pares de bases, la T_m^* tiene un valor de 54 y 72 °C, respectivamente, suponiendo que el contenido en G/C corresponde al 50%.
- ♦ **Especificidad:** hay que diseñar un oligo que en la medida de lo posible, solo se encuentre una vez en el molde de ADN.
- ♦ **Secuencias complementarias:** es importante que no exista homología intra-oligonucleótido en más de tres pares de bases porque ello generaría una hibridación interna (estructuras de horquillas). Lo mismo debe de ocurrir entre los dos *primers* de la reacción de PCR, su hibridación daría lugar a la formación de dímeros.
- ♦ **Contenido en G/C y regiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G):** un oligo debe tener entre un 45-55% de GC, además hay que evitar colas de poliA y poliT. No son adecuadas las zonas ricas en polipirimidinas y polipurinas.
- ♦ **Secuencia del extremo 3' terminal:** es necesario un residuo G o C en el extremo 3'. Este cepo GC (*CG Clamp*), asegura una hibridación correcta en este extremo, por los enlaces de hidrógeno que aparecen entre ambos residuos. La hibridación correcta de este extremo se consigue colocando de los cinco últimos residuos, en el extremo 3', dos residuos G o C.
- ♦ **Secuencia del extremo 5' terminal y regiones centrales:** en esta región también se colocan cepos GC para dar una mayor estabilidad a la hibridación.

De todos ellos los parámetros los más importantes son el tamaño del oligo, el contenido (%) en GC y la secuencia del extremo 3' terminal.

Las características de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR 1 y 2, "Touch-Down 50/40" y "Touch-Down 60/50", respectivamente, se muestran en la Tabla XIV. Son *primers* que cumplen los requisitos más importantes para que la reacción transcurra con éxito.

Tabla XIV. Características de los oligos utilizados en las reacciones de PCR. (F) *forward*, (R) *reverse*, (D) degenerado. ⁽¹⁾, ⁽²⁾ y ⁽³⁾ se corresponde con la secuencias ⁹⁴TVSCADI¹⁰⁰, ³⁹MHFHDCFV⁴⁶ y ¹⁸³LYNFNSTSG¹⁹¹, respectivamente. T_m^* se ha calculado con la fórmula de Wallace.

Primer	Tipo	Tamaño (bp)	Contenido GC/AT (%)	T_m^* (°C)	Extremo 3'
5'- ACCGTCTCTTGCGCCGACATC- 3'	F ⁽¹⁾	21	62/38	68	ACATC
5'- GAGGACTCGAGCTCAAGC- 3'	R	18	61/39	58	CAAGC
5'- ATGCAYTTYCAYGAYTGYTTYGT- 3'	F ⁽²⁾	23	D	-	TTYGT
5'-CCACTGGTGCTGTTGAAGTTGTAGAG-3'	R ⁽³⁾	26	50/50	78	TAGAG

Cuando se diseña un *primer*, como el código genético es degenerado (Apéndice I, Tabla 2), suelen presentar cierta degeneración en su estructura. A menor degeneración mayores posibilidades de éxito. La nomenclatura utilizada para expresar las degeneraciones (Apéndice I, Tabla 4), indica qué residuos pueden ocupar esa posición en la secuencia.

El *primer* obtenido con el uso de la secuencia ⁹⁴TVSCADI¹⁰⁰ no muestra ningún tipo de degeneración, ello es debido a que es una zona muy conservada en las peroxidasas de plantas. Se ha evaluado la secuencia de nucleótidos de ese *primer* en otras peroxidasas y como estaba altamente conservada en todas ellas se ha eliminado la degeneración. El *primer* de la secuencia ³⁹MHFHDCFV⁴⁶ se aplica con todas las degeneraciones, tan solo se elimina una degeneración de tipo N del último aminoácido (V). Sin embargo el *primer* de la secuencia ¹⁸³LYNFNSTSG¹⁹¹, que presenta una degeneración muy elevada, se aplica sin variabilidad, ello es debido a que se hicieron pruebas con el primer degenerado y el invariable y este ofreció mejores resultados.

Tabla XV. Oligos utilizados en la reacción de PCR con sus posibles degeneraciones (se muestran mediante subrayado). Las secuencias en negrita son las que finalmente se usan en la reacción de PCR.

Secuencia proteica	Especie (Código)	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
⁹⁴ TVSCADI ¹⁰⁰	RPTP	AC <u>N</u> GT <u>N</u> TC <u>N</u> TGYGCNGAYATH
	Arroz (Q8LHH6)	ACCGTCTCCTGCGCCGACATC
	Maíz (Q9FEQ9)	ACAGTCTCGTGCGCCGACATC
³⁹ MHFHDCFV ⁴⁶	RPTP	ACCGTCTCTTGCGCCGACATC
	RPTP	ATGCAYTTYCAYGAYTGYTTYGT
¹⁸³ LYNFNSTSG ¹⁹¹	RPTP	CTNTAYAA <u>Y</u> TT <u>Y</u> AA <u>Y</u> AGYACNAGYGGN
		T <u>R</u> T <u>C</u> N T <u>C</u> N
		CCACTGGTGCTGTTGAAGTTGTAGAG

4.3.7.9. Clonación, expresión y secuenciación de fragmentos de ADN

La clonación molecular consiste en insertar un fragmento de ADN de interés en una molécula llamada vector, que es capaz de replicarse de manera independiente en una célula huésped. El resultado de este proceso es una molécula recombinante o clon molecular, compuesto por las secuencias del ADN insertado y del vector. Para obtener grandes cantidades del inserto de ADN se replica la molécula recombinante en un huésped apropiado. Existen diferentes vectores de clonación: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y YACs (Cromosomas artificiales de levaduras) que son vectores de replicación para genes de células eucariotas. Se diferencian en el tamaño del inserto de ADN: 10, 20, 40-50 y cientos o miles de kb, respectivamente. A continuación se explicarán con detalle las características de los plásmidos, puesto que es el vector utilizado para clonar los fragmentos de ADN de la peroxidasa de palma real, obtenidos mediante PCR.

Existen dos generaciones de plásmidos: pBR322 y pUC.

- ♦ **pBR322**: el plásmido contiene un origen de replicación (*ori*), dos genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina (*Amp^r* y *Tet^r*) y múltiples sitios de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *Sall*,...) (Fig. 11A). Para clonar un fragmento de ADN en un vector se tratan ese ADN y el vector con la misma enzima de restricción para generar extremos cohesivos, luego se juntan estos fragmentos y con una ADN-ligasa se produce su unión, insertándose el ADN en el vector. Para comprobar que la clonación ha transcurrido con éxito se introduce ese vector en células hospedadoras adecuadas (*E. coli*). Se analizan esos clones para saber cuales poseen el ADN recombinante. Como el vector tenía genes de resistencia a antibióticos, se crecen las células en un medio que contenga el antibiótico cuyo gen permanece inalterado (*Tet^r*), de modo que las células que crecen en ese medio poseen el vector pero no se sabe si éste tiene el inserto de ADN. Como el inserto ha roto el gen de resistencia al otro antibiótico (*Amp^r*), solo crecerán en un medio con Amp las células que no posean el inserto. Mediante replica de la placa original de las células que han crecido con Tet en otra placa que tiene Amp, se puede saber cuales de los clones contienen el inserto. Conocidos los clones que tienen los insertos estos se pueden hacer crecer en un medio adecuado para obtener grandes cantidades de ese material genético.
- ♦ **pUC**: son plásmidos basados en los anteriores, poseen el 40% de su material genético, el cual incluye el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*). Tienen un origen de replicación (*ori*) y una pequeña región de clonación múltiple (MCS: *Multiple Cloning Sites*) formada por una gran cantidad de sitios de restricción y una porción del extremo N-terminal de la enzima

β -galactosidasa (*lacZ'*) (Fig. 11B). Con el gen de resistencia se pueden seleccionar las bacterias que han recibido una copia del vector. Para determinar qué vectores contienen el inserto de ADN nuevo, en la secuencia del plásmido existe una porción de la región N-terminal del gen que codifica la enzima β -galactosidasa (*lacZ'*). Las bacterias utilizadas como huéspedes contienen un fragmento del gen de esa misma enzima que codifica su región C-terminal. Por complementación esos dos productos cooperan para formar la enzima activa. Cuando esto ocurre, si en el medio de cultivo existe β -galactosidasa, el indicador X-gal genera colonias con una cloración azul (clones negativos). Si el fragmento del plásmido que codifica para la enzima β -galactosidasa se ha roto por inserción de un fragmento nuevo de ADN, no existe complementación entre los productos génicos del plásmido y de la célula huésped para esa enzima y por lo tanto el indicador X-gal generará colonias de color blanco (clones positivos).

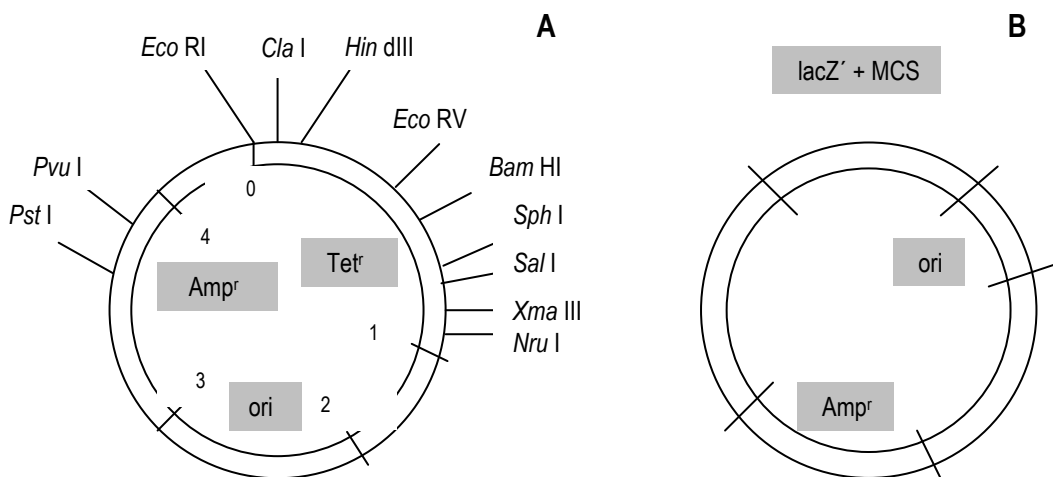


Figura 11. Mapas de los plásmidos pBR322 (A) y pUC (B).

Experimentalmente para clonar los fragmentos de material genético de la peroxidasa de palma real, obtenidos mediante PCR, se utilizará el vector pGEM[®]-T (Promega) (Fig. 12), que es un plásmido del tipo pUC. Tiene una masa molecular de 3 Kb, posee un gen que confiere resistencia a ampicilina, contiene un sitio de clonación múltiple (10-113), que posee sitios de corte para las enzimas de restricción: *EcoRI*, *BstZI* y *NotI* y esta flanqueada por secuencias de corte para ésta última, un origen de replicación del fago filamentoso f1 y una región codificante de un péptido de la enzima β -galactosidasa que permite realizar una selección de los clones por color: positivos (blancos) y negativos (azules) (Tabla XVI). Con este vector se consiguen un gran número de copias debido a que contiene promotores de dos enzimas ARN polimerasa (T7 y SP6), flanqueando la región de clonación múltiple. La reacción de ligación se lleva a cabo mediante

incubación durante 1 h a TA o durante una noche a 4 °C. Esta última opción genera en mayor número de transformantes.

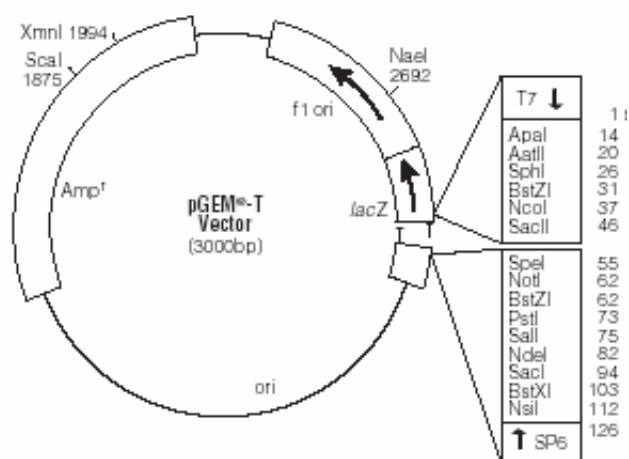


Figura 12. Mapa del vector pGEM®-T.

Tabla XVI. Puntos de referencia más importantes en la secuencia del vector pGEM®-T.

Punto de referencia del vector pGEM®-T	Situación en la secuencia
ARN polimerasa T7 (sitio de inicio de la transcripción)	1
Región de clonación múltiple (MCS)	10-113
Promotor de la ARN polimerasa SP6	124-143
ARN polimerasa SP6 (sitio de inicio de la transcripción)	126
pUC/M13 (sitio de unión del primer reverse)	161-177
Codón de inicio lacZ	165
Operón lac	185-201
Región codificante de β-lactamasa	1322-2182
Región ori del fago f1	2365-2820
Secuencias del operón lac	2821-2981, 151-380
pUC/M13 (sitio de unión del primer forward)	2941-2957
Promotor de la ARN polimerasa T7	2984-3

Para llevar a cabo la ligación del inserto del ADN con el vector, se mezclan el vector, el tampón de ligación, la ADN ligasa T4 y el producto de PCR. Se hará un control negativo que no contiene fragmento de ADN y un control positivo con un fragmento de ADN que contiene el kit. Se incuba todo ello durante una noche a una temperatura de 4 °C. Esos vectores se insertan en la progenie de células de *E. coli* DH5α, debiéndose utilizar células competentes con una alta eficiencia ($\geq 1 \times 10^8$ ufc / μ g ADN). Mediante los parámetros de resistencia a ampicilina y el revelado mediante color del crecimiento en placas de medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal), se puede ver en cuales de estas células se encuentren los fragmentos de ADN insertados. Se retira el ADN de esas colonias y se secuencia con ayuda de un secuenciador automático.

4.3.8. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO ESTADÍSTICO: SCA “*Statistical coupling analysis*”

El análisis de acoplamiento estadístico (SCA) es una técnica usada en bioinformática para medir la covariación entre parejas de aminoácidos, dentro de un conjunto de secuencias alineadas (MSA) de múltiples proteínas. Hay dos parámetros muy importantes que se obtienen al hacer uso de esta técnica: la energía de conservación de sitio (ΔG^{estad}) y la energía de acoplamiento estadístico ($\Delta\Delta G^{\text{estad}}$).

La energía de conservación (ΔG^{estad}), indica lo conservado que está un aminoácido en una determinada posición, al comparar un conjunto amplio de secuencias, a mayor valor de este parámetro mayor conservación (Ec. 111). Cada sitio viene definido por un vector, constituido por 20 probabilidades binomiales, correspondientes a las frecuencias de los 20 aminoácidos esenciales.

$$\Delta G_i^{\text{estad}} = \sqrt{\sum_x \left(\ln \frac{P_i^x}{P_{\text{MSA}}^x} \right)^2} \quad (111)$$

donde P_i^x describe la probabilidad binomial de encontrar un aminoácido x en la posición i en un alineamiento dado. P_{MSA}^x describe la probabilidad binomial de encontrar el aminoácido x en todas las MSA (*Multiple Sequence Alignment*). ΔG^{estad} se muestra en unidades arbitrarias.

La energía de acoplamiento estadístico ($\Delta\Delta G^{\text{estad}}$) entre dos sitios i y j , se define como el grado de la frecuencia de cambio que se produce en el aminoácido i , como consecuencia de una perturbación aplicada en el sitio j (Ec. 112). Indica el grado de evolución y de dependencia que existe entre esos dos residuos. Valores altos de este parámetro indican que los residuos están acoplados y han evolucionado conjuntamente.

$$\Delta\Delta G_{ij}^{\text{estad}} = \sqrt{\sum_x \left(\ln \frac{P_{i|\delta_j}^x}{P_{\text{MSA}|\delta_j}^x} - \ln \frac{P_i^x}{P_{\text{MSA}}^x} \right)^2} \quad (112)$$

donde P_i^x y P_{MSA}^x están descritos en la Ec. 111 y “ $|\delta_j$ ” es el valor medio de una perturbación en la posición j . Se expresa en unidades arbitrarias.

Esta técnica fue desarrollada originalmente en 1999 (Lockless y Ranganathan) para realizar un estudio de las interacciones energéticas en proteínas. Para ello se utilizaron datos evolutivos de familias proteicas y con ellos se midieron las interacciones estadísticas entre aminoácidos de diferentes posiciones. Las

aplicaciones de esta técnica son muy diversas: permite establecer en un conjunto proteico los residuos que están directamente acoplados con los residuos del centro activo (Estabrook *et al.*, 2005). Con ello se puede comprobar que en el centro activo no solo influyen residuos que se encuentran en él, sino que hay residuos muy alejados en la secuencia primaria, que el plegamiento hace que estén directamente implicados en las propiedades catalíticas de una enzima. Se puede establecer la importancia de las interacciones de largo alcance en la eficiencia catalítica de una enzima. Es una técnica usada como base para el diseño computacional de proteínas (Russ, 2005). Finalmente en la predicción de estructuras de proteínas nóveles, la combinación de las distancias residuo-residuo con los análisis de SCA permite distinguir entre proteínas en forma nativa y proteínas desplegadas (Bartlett y Taylor, 2008). Con estudios mutacionales se pueden confirmar estas predicciones, demostrando que la función de energía estadística es un buen indicador del acoplamiento termodinámico en proteínas.

Para realizar el análisis de acoplamiento estadístico se usan las secuencias alineadas de 1983 proteínas de la superfamilia de peroxidasas de plantas que han sido tomadas del servidor PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Después de eliminar las secuencias y fragmentos redundantes, las secuencias alineadas de 393 proteínas se sometieron al análisis SCA. Los cálculos de los parámetros ΔG^{estad} (energía de conservación de cada sitio) y $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ (energía de acoplamiento estadístico entre diferentes posiciones) se obtuvieron como se describe previamente, usando los programas escritos en lenguaje C/C++. Una perturbación válida debería estar presente, al menos, en el 25% de las secuencias alineadas. El conjunto de aminoácidos que muestran correlaciones conservadas se obtuvieron mediante análisis de grupos de la matriz de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ usando el paquete Matlab (Mathworks). La métrica ciudad-bloque fue utilizada para medir las distancias entre filas y columnas de la matriz, las cuales se agruparon usando un método completo de unión. La matriz resultante contiene 28 filas (posiciones) y 127 columnas (perturbaciones), su gráfico se obtuvo con el programa EXCEL (Microsoft).

5. Resultados

5.1. SCREENING DE ACTIVIDAD PEROXIDASA EN DIFERENTES ESPECIES DE PALMA

Se realiza un screening, con diversas especies de palmeras, buscando la mayor actividad peroxidasa, ya que esta proteína será el objeto de estudio. Nuestro grupo de investigación ya ha trabajado anteriormente con peroxidasa de palmera africana (*Elaeis guineensis*) (Rodríguez *et al.*, 2002). Debido principalmente a la gran estabilidad de esta proteína frente a la temperatura, se ha continuado el estudio de peroxidosas de otras especies de palmera (Tabla XVII), para determinar la naturaleza de este efecto. Por referencias bibliográficas, se conocía que la peroxidasa de palmera real (*Roystonea regia*) era bastante estable (Sakharov *et al.*, 2001). Por ello, se eligió como candidata idónea para su estudio y caracterización. Esta especie vegetal es muy escasa en la Península Ibérica, localizándose ejemplares en el Huerto del Cura (Elche) y en el campus de la Universidad de Alicante en San Vicente del Raspeil. Ejemplares de otras especies de palmera, que se han utilizado en este trabajo, crecen en Salamanca (Huerto de Calixto y Melibea y jardín privado) (Tabla XVII, Fig. 13).

Tabla XVII. Especies de palmeras con las que se realiza el screening de actividad peroxidasa.

Especie	Localización	Tipo de hojas	Edad (años)
Palma Real de Cuba (<i>Roystonea regia</i>)	San Vicente del Raspeil (Alicante)	Pinnadas	7-8
Palma Washingtonia (<i>Washingtonia filifera</i>)	Huerto de Calixto y Melibea (Salamanca)	Palmeadas	8-10
Palma canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)	Huerto de Calixto y Melibea (Salamanca)	Pinnadas	8-9
Palmito elevado (<i>Chamaerops excelsa</i>)	Huerto de Calixto y Melibea (Salamanca)	Palmeadas	10
Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Jardín privado (Salamanca)	Pinnadas	10

La especie *Washingtonia filifera* es una palmera de origen californiano, cuyo nombre hace honor al primer presidente norteamericano George Washington. Sus hojas son palmeadas de gran tamaño, con profundas hendiduras en sus segmentos foliares y dotadas de largos filamentos que cuelgan de ellos, su tronco puede alcanzar 1 m de diámetro y suele permanecer recubierto por hojas muertas. Son llamativas sus largas panículas de flores hermafroditas de hasta 5 m de longitud.

La palmera canaria (*Phoenix canariensis*) es originaria de las Islas Canarias y se utiliza con carácter ornamental en toda la geografía española. Posee hojas pinnadas de hasta 7 m de longitud, formando una densa corona o penacho casi esférico. El árbol puede llegar a medir 16-18 m de altura. Es una especie resistente al frío (Anglero, 1959).



Figura 13. Especies de palmeras con las que se realiza el screening de actividad peroxidasa. (A) Palmera real de Cuba (*Roystonea regia*), (B) Palmera datilera (*Phoenix dactylifera*), (C) Palmera Washingtonia (*Washingtonia filifera*), (D) Palmito elevado o palmera excelsa (*Chamaerops excelsa*) y (E) Palmera canaria (*Phoenix canariensis*).

La palmera datilera (*Phoenix dactylifera*), autóctona del norte de África, posee hojas pinnadas que forman un penacho menos denso y más desgarrado que el de la palmera canaria. En Elche se encuentra el palmeral más extenso de todo el continente europeo, en el que viven 400.000 palmeras datileras y, en menor número, otras especies de palmeras (Anglero, 1959).

La palmera excelsa, también llamada palmito elevado, *Chamaerops excelsa* o *Trachycarpus fortunei*, es una palmera originaria de China. Posee hojas de tipo palmeado en las que las hendiduras que separan los segmentos foliares alcanzan la mitad de su longitud y en ocasiones llegan hasta la base de los mismos. Las jóvenes agrupaciones de flores son de color vivo amarillo y es muy resistente al frío. Por ello, es la palmera más frecuente en el interior de la Península (Anglero, 1959).

Existen de 10 a 12 especies de palmeras del género *Roystonea* que se encuentran distribuidas desde Florida y Méjico hasta el norte de América del Sur. Las más conocidas son la palmera real de Puerto Rico (*Roystonea borinquena*) y la palmera real de Cuba (*Roystonea regia*) (Francis, 1992). Las especies de este género tienen 18 cromosomas, una vida media de 100 años y una altura máxima de 20 m, aunque se han encontrado especies de hasta 27 m. El diámetro de copa suele ser de 3,5 m, tienen hojas pinnadas y un tronco liso, aunque existen diferencias, al respecto, entre las diferentes especies de *Roystonea* (Barret, 1925; Howard, 1979; Francis, 1992).

El screening consistirá en determinar la actividad peroxidasa de una cantidad constante de biomasa fresca verde de las hojas de cada una de las especies, tras realizar los dos primeros pasos del proceso de purificación (Tabla XVIII).

En primer lugar se separan las hojas de las vainas, limpiándose bien estas hojas con un paño húmedo para eliminar el polvo y se cortan en fragmentos de 2-3 cm de longitud, retirando las porciones secas o dañadas. Esos fragmentos se congelan en N₂ líquido para facilitar el proceso de trituración y molienda, debido a que el material vegetal es muy duro y fibroso. Para la trituración, se usa un picador de carne doméstico. Es un proceso muy efectivo ya que se consigue un producto de tamaño de grano muy fino. Sobre esta masa vegetal fresca (62,0 g) se adiciona agua destilada en proporción 1:6 (v:v) (310 ml), con el fin de extraer las proteínas solubles (V₁). El proceso se lleva a cabo a TA durante 24 h, alternando la agitación manual con la mecánica. A continuación, se filtra a vacío utilizando en lugar de papel de filtro gasa estéril para retirar el material sólido. Dado que el proceso de molienda es muy eficaz, parte del material sólido acompaña a la fase acuosa, por lo que para su eliminación se centrifuga (10.000 rpm, 15 min, 4-5 °C). Se separa la fase acuosa por decantación y sobre ésta se procede a separar los pigmentos mediante una extracción bifásica (PEG 10000 14% + (NH₄)₂SO₄ 10%), en cámara fría (4-5 °C) durante 5 h. Se separan ambas fases por decantación (V₂ y V₃) y se determina, en todas las muestras por triplicado, su actividad peroxidasa, usando guayacol como sustrato, y su contenido proteico mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se observa que las actividades de los volúmenes V₁ y V₃ son similares y que la actividad de la muestra V₂ para todas las especies, no es superior al 3% (Tabla XIX).

Tabla XVIII. Cantidades de masa vegetal seca y fresca, PEG y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas para cada una de las especies de palma. V_1 se refiere al volumen obtenido después de filtrar a vacío y centrifugar. V_2 y V_3 son los volúmenes de las fases superior (desecho) e inferior (proteica) que surgen del proceso de separación de pigmentos, respectivamente.

Especie	m_{vegetal} (g)	$V \text{ H}_2\text{O}$ (ml)	V_1 (ml)	m_{PEG} (g)	$m_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ (g)	V_2 (ml)	V_3 (ml)
<i>Phoenix dactylifera</i>	62,00	310,0	275,0	38,50	30,00	150,0	149,0
<i>Phoenix canariensis</i>	62,00	310,0	270,0	37,80	29,50	150,0	150,0
<i>Washingtonia filifera</i>	62,00	310,0	290,0	40,60	32,00	150,0	175,0
<i>Chamaerops excelsa</i>	62,00	310,0	265,0	37,10	29,00	144,0	140,0
<i>Roystonea regia</i>	62,00	310,0	295,0	41,30	33,00	161,0	162,0

Tabla XIX. Actividades peroxidasa de las diferentes fracciones V_1 , V_2 y V_3 de las especies de palmas con las que se realiza el screening. Se muestra el contenido proteico obtenido, aplicando el método de Lowry y el porcentaje de actividad de cada especie con respecto a la que tiene mayor actividad total, la muestra V_3 .

Especie	Actividad Total V_1 (U)	Actividad Total V_2 (U)	Actividad Total V_3 (U)	Contenido Proteico V_3 (mg)	Actividad Especifica (U mg^{-1})	Actividad (%)
<i>Phoenix dactylifera</i>	102 ± 41	0 ± 18 ($< 3\%$)	550 ± 18	201 ± 19	$2,7 \pm 0,3$	3,4
<i>Phoenix canariensis</i>	726 ± 41	5 ± 18 ($< 2\%$)	1065 ± 18	239 ± 18	$4,5 \pm 0,3$	6,5
<i>Washingtonia filifera</i>	1450 ± 44	15 ± 18 ($< 2\%$)	1794 ± 21	520 ± 21	$3,5 \pm 0,2$	11
<i>Chamaerops excelsa</i>	8586 ± 76	202 ± 17 ($< 3\%$)	8330 ± 150	461 ± 17	$18,1 \pm 0,7$	51
<i>Roystonea regia</i>	16570 ± 202	242 ± 24 ($< 2\%$)	16313 ± 876	298 ± 19	$54,7 \pm 4,6$	100

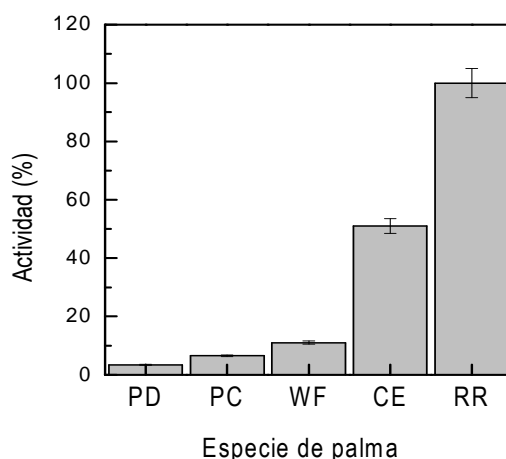


Figura 14. Estudio comparativo de la actividad peroxidasa de diferentes especies de palma en la fracción V_3 . PD (*Phoenix dactylifera*), PC (*Phoenix canariensis*), WF (*Washingtonia filifera*), CE (*Chamaerops excelsa*) y RR (*Roystonea regia*).

Para la determinación del contenido proteico se ha utilizado el método de Lowry, que aunque no es el más adecuado, ya que las peroxidasa son proteínas altamente glicosiladas, proporciona unos resultados bastantes aceptables. El contenido proteico de las muestras V_1 es similar a la suma del contenido proteico de las muestras V_2 y V_3 , como cabía esperar (Tabla XX).

Tabla XX. Contenido proteico en las muestras V_1 , V_2 y V_3 de las diferentes especies de palma, determinado por el método de Lowry (1951).

Especie	Proteína V_1 (mg)	Proteína V_2 (mg)	Proteína V_3 (mg)
<i>Phoenix dactylifera</i>	2252 ± 42	2028 ± 21	201 ± 19
<i>Phoenix canariensis</i>	2600 ± 41	2180 ± 20	239 ± 18
<i>Washingtonia filifera</i>	1839 ± 44	1220 ± 18	520 ± 21
<i>Chamaerops excelsa</i>	2231 ± 40	1760 ± 35	461 ± 17
<i>Roystonea regia</i>	2065 ± 45	1761 ± 21	298 ± 19

La finalidad de este estudio era elegir de entre las diferentes especies de palmas la que tuviera mayor actividad peroxidasa y, partiendo de ella, purificar la correspondiente peroxidasa, cuyo estudio de caracterización es el objetivo principal de este trabajo. Con los resultados obtenidos, es evidente que se procederá a la purificación de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) ya que su actividad es 2, 11, 15 y 27 veces mayor que la actividad de las palmeras *Chamaerops excelsa*, *Whashingtonia filifera*, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*, respectivamente.

Hasta el momento tan sólo se había trabajado con palmas cultivadas en climas cálidos, ya que se pensaba que la actividad proteica podía estar disminuida cuando la palma crecía en otras condiciones climatológicas. En este estudio, se ha trabajado con una palma de clima cálido, la palma real (*Roystonea regia*), pero el resto son palmas que viven en climas continentales y están sometidas durante amplios periodos de tiempo a bajas temperaturas (hasta -10 °C). A pesar de ello, se observa que siguen teniendo actividad peroxidasa. Posteriores estudios de nuestro equipo de investigación se han centrado en peroxidasa de estas palmas, observando que son igualmente estables, por lo que el clima no afecta a sus características enzimáticas (Zamorano *et al.*, 2009).

5.2. PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (RPTP)

La purificación de una proteína suele tener como objetivo final obtener el material deseado con el máximo rendimiento, utilizando el proceso más corto, y a ser posible, más económico. Hay que tener en cuenta el material del que se parte y cual será la aplicación del material purificado, ya que de ello depende el grado de pureza a obtener. Si una proteína se va a aplicar a usos terapéuticos o “*in vivo*”, su grado de pureza debe ser muy elevado, $\geq 99\%$, en cambio, si su finalidad es realizar estudios cristalográficos y de caracterización fisicoquímicos, es suficiente un grado de pureza del 95-99%. Finalmente, si se va a utilizar como antígeno para la producción de anticuerpos es suficiente un grado de pureza moderado, $< 95\%$. En nuestro caso, se requerirá una pureza elevada ya que se pretende caracterizar fisicoquímicamente la enzima y además conocer sus estructuras primaria y terciaria.

Un proceso de purificación consta de tres etapas claves que son: a) captura, que consiste en aislar, concentrar y estabilizar la proteína a purificar; b) purificación intermedia, cuyo objetivo es la eliminación de la mayor parte de los contaminantes y c) pulido, con ello se pretende obtener un elevado grado de pureza, eliminando las trazas de impurezas o productos relacionados con la sustancia de interés. Durante la captura se usan técnicas con elevada capacidad y velocidad de proceso, además de técnicas de concentración que reduzcan al volumen de muestra. En nuestro proceso como técnica de captura se utilizó la precipitación fraccionada con sulfato amónico, la cual reduce el volumen aproximadamente un 50%. Con la etapa de purificación intermedia, se eliminan los contaminantes que acompañan a la muestra. Esto se hace con la cromatografía hidrofóbica y con la cromatografía de intercambio iónico, etapas con las que se obtiene la proteína con un grado de pureza aceptable, si bien con el pulido (cromatografía de exclusión molecular) se puede mejorar este factor de purificación.

Para llevar a cabo el proceso de purificación se ha seguido el esquema desarrollado por I. Sakharov (2000, 2002, 2003) para otras peroxidases de palmas, con ciertas modificaciones que han mejorado notablemente el rendimiento del proceso. El proceso original anteponeía la cromatografía de exclusión molecular a la de intercambio iónico, lo cual se ha cambiado. Para pulir una muestra es mejor utilizar la cromatografía de exclusión molecular, método más eficiente y de mayor resolución utilizando tamaños de partícula $\leq 34 \mu\text{m}$ (en nuestro caso $13 \mu\text{m}$) que permite separar trazas de contaminantes y hasta variantes estructurales de la misma proteína, sin embargo para eliminar contaminación son suficientes medios con tamaños de partículas $\leq 90 \mu\text{m}$ (en nuestro caso el DEAE-Toyopearl 650M tiene un tamaño de partícula entre $40\text{-}90 \mu\text{m}$). Al realizar este cambio, si el objetivo final no requiriera un elevado grado de pureza, se podría eliminar la última etapa del fraccionamiento cromatográfico.

La purificación de esta proteína partiendo directamente de la planta es un proceso laborioso y bastante largo, en el que, además, durante las primeras etapas se trabaja con unos volúmenes de muestra muy grandes que lo hacen aún más tedioso.

La peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) se obtiene de las hojas de una palma de 7-8 años. Se parte de 960 g de materia fresca verde triturada. Como la peroxidasa es una proteína hidrosoluble que normalmente se encuentra en el citoplasma celular, se extrae con agua destilada en proporción 1:6 (m:v) (4,75 l), a TA durante 22-24 h. Se filtra a vacío y se hace una segunda extracción del material sólido con agua destilada (750 ml). Se retira el material sólido y el filtrado se centrifuga, retirando, por decantación, un pellet verde oscuro de apariencia arcillosa. Finalmente, se obtiene un volumen de 5,22 l en el que se encuentra la proteína de interés. Sobre este volumen, se adiciona PEG 10.000 (14%) (730,8 g) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10%) (587,0 g) para extraer los pigmentos por reparto bifásico y separar proteínas en función de la distinta solubilidad a la concentración salina de trabajo. Tras 5 h en cámara fría (4-5 °C), aparecen dos fases claramente diferenciadas, la fase superior, de color marrón oscuro, en la que se encuentran las proteínas de naturaleza apolar, fenoles, polifenoles, productos de oxidación de estos compuestos, restos celulares y PEG. En la fase inferior, de color amarillo, se encuentran las proteínas hidrosolubles. Ambas fases poseen aproximadamente un 50% del volumen inicial, la fase superior un 56 % y la inferior un 44 %. Se observa que con esta etapa se consigue un gran enriquecimiento de la muestra en peroxidasa, ya que se separan el 93% de las proteínas totales y sin embargo la actividad peroxidasa tan sólo se reduce un 5%. Hay que tener en cuenta, también, la gran reducción de volumen de este proceso, lo cual es muy útil para las etapas siguientes. La fase que contiene la actividad peroxidasa pasa al fraccionamiento cromatográfico.

• **Cromatografía hidrofóbica**

La cromatografía hidrofóbica se realiza en un equipo de baja presión que no está conectado a ningún sistema controlador de absorbancias. Por ello, el único modo de hacer un seguimiento proteico es medir la actividad enzimática de cada una de las fracciones que se recogen (15,0 ml) (Fig. 15). Con este proceso, se elimina una gran cantidad de proteínas y otros pigmentos. La resina tiene una capacidad de retención de 1800-2000 cm³ muestra / 45 cm³ fenil-sefarosa. Como fase móvil se utiliza tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La peroxidasa de palma se retiene en la columna mediante una interacción de tipo hidrofóbico y, cuando la columna se ha saturado, se eluye reduciendo drásticamente la concentración salina con tampón fosfato 100 mM, pH 6,5, 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De este modo, el pool es más estrecho que el que aparece cuando se utiliza un gradiente salino lineal. La actividad peroxidasa aparece entre las fracciones 4-13 (entre los 60 y los 195 ml de volumen de elución). Se trabaja a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹.

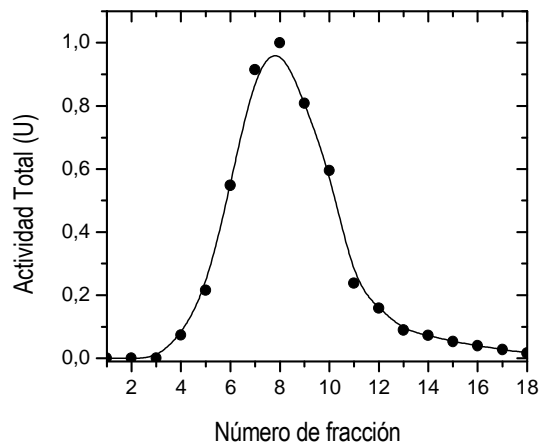


Figura 15. Pool de la cromatografía hidrofóbica registrado con medidas de actividad enzimática. Se usan como sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. Cada fracción tiene un volumen de 15,0 ml.

• Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo con un equipo ÄKTA_{FPLC}, utilizando como fase estacionaria la resina DEAE-Toyopearl 650M. Se utiliza como fase móvil, tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 8,3. La peroxidasa a este pH de trabajo se encuentra cargada negativamente ($pI = 5,2$), por lo que se retiene en la columna, uniéndose de forma iónica a los grupos DEAE (dietilaminoetil) cargados positivamente. Se eluye la proteína con un gradiente lineal de NaCl 0-300 mM, con tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 8,3, 1 M NaCl. Este equipo tiene un detector que permite registrar las absorbancias a dos 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 peroxidasas 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 peroxidasas, 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 32,5 y los 37,5 ml (Fig. 16), equivalente a una concentración salina del 19,5%. Se trabaja a una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} . Se inyectan volúmenes de entre 6,5 y 12,0 ml, dependiendo de la concentración salina. Es una cromatografía muy sensible a este parámetro y una conductividad superior a 3 mS cm^{-1} , durante la inyección, no permite la unión de la proteína a los grupos DEAE. Se recogen fracciones de 500 μl .

Otro control proteico ha sido la medida de la actividad enzimática de las fracciones del pool (C4-D7) y de otras elegidas al azar como control del proceso. La fracción C11 corresponde a un volumen de elución de

34,0 ml. Se observa que la mayor actividad se encuentra en el pool (Fig. 16A). También a los 57 ml hay una ligera pérdida de actividad, acompañada de otras muchas proteínas, que por tanto se desecha.

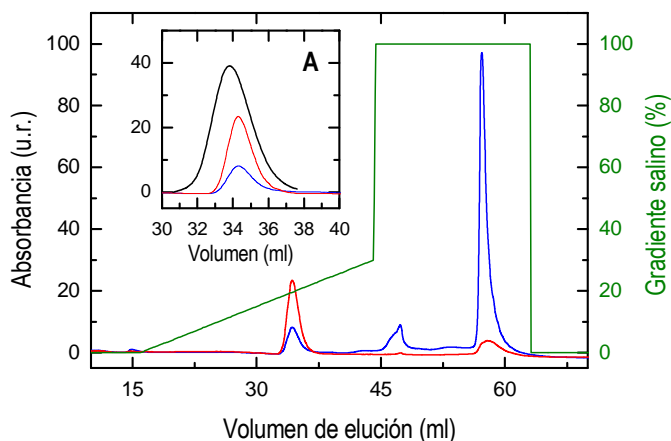


Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Toyopearl 650M. Cromatograma FPLC. Absorbancia a 280 nm (azul), absorbancia a 403 nm (rojo) y gradiente de NaCl 1M (verde). **(A)** Ampliación del cromatograma, acompañado del registro del pool por medidas de actividad (negro).

♦ Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se realiza en un equipo ÄKTA_{FPLC}, utilizando como fase estacionaria Superdex 200 10/30 HR, y como fase móvil tampón TRIS-HCl 5,0 mM, pH 8,3. Se trabaja a una velocidad de flujo de 0,5 ml min⁻¹. Se inyectan volúmenes de 400 µl y se recogen fracciones de 250 µl.

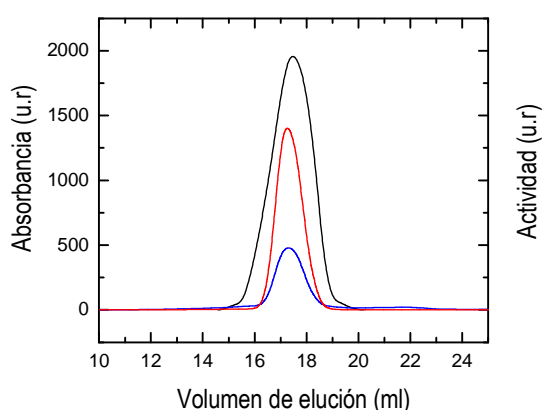


Figura 17. Cromatografía de exclusión molecular con Superdex 200. Cromatograma FPLC. Registrado por medidas de actividad (línea negra). Las líneas roja y azul pertenecen a las absorbancias a 403 y 280 nm, respectivamente, obtenidas directamente del equipo FPLC. Las fracciones B9 y C10 corresponden a unos volúmenes de elución de 14,33 y 19,96 ml, respectivamente.

Las fracciones que forman el pool cromatográfico se identifican por seguimiento de la absorbancia a 280 y 403 nm y, al igual que en la cromatografía anterior, también se registra la actividad de las fracciones del pool (Fig. 17, línea negra). Como pool cromatográfico se toman las fracciones B6-C7, fracciones que aparecen entre los 15,08 y los 19,21 ml, como se observa en el cromatograma (Fig. 17).

♦ Tabla de rendimientos

En la tabla de rendimientos se puede ver la efectividad de cada una de las etapas usadas durante la purificación proteica de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) (Tabla XXI). Un rendimiento de casi un 50% en un proceso de purificación partiendo del material vivo es muy bueno, normalmente en el caso de purificaciones vegetales suele encontrarse alrededor del 25-35%. 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 (10-12 días). Ello es debido a que para obtener una masa proteica adecuada para realizar el resto de experimentos se requiere iniciar el proceso con un gran volumen de masa vegetal. Aunque algunas etapas se realizan en cámara fría (4-5 °C), para proteger la enzima, otras en cambio funcionan mejor a TA.

Tabla XXI. Tabla de rendimientos del proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*).

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
1 Homogenado	5220	39956	614394	15,4	1	100
2 PEG + (NH ₄) ₂ SO ₄	2630	2656	579123	218,0	14	94,3
3 Fenil-Sefarosa	76	268	418002	1559,7	101	68,0
4 DEAE-Toyopearl 650M	66	62	308469	4975,3	323	50,2
5 Superdex 200	4	45	290769	6461,5	420	47,3

A lo largo de este estudio, se han realizado, en diferentes épocas del año, 4 purificaciones de peroxidasa de palma real. Los rendimientos han oscilado entre el 30 y el 47%. Cuando se ha purificado en otoño-invierno, el rendimiento ha sido menor que cuando se hace en primavera-verano (Tabla XXII). Los datos que aquí se exponen son de una purificación realizada durante el mes de junio.

Tabla XXII. Efecto de la época del año en el rendimiento del proceso de purificación.

Época de la purificación	Rendimiento (%)
Junio 2007	47,3
Septiembre 2006	33,8
Octubre 2005	36,6
Diciembre 2004	30,0

En la Fig. 18, se observa la variación del rendimiento y el factor de purificación durante el proceso en %. A medida que transcurre el proceso, como es normal, el rendimiento se reduce y la muestra se va enriqueciendo en el compuesto de interés.

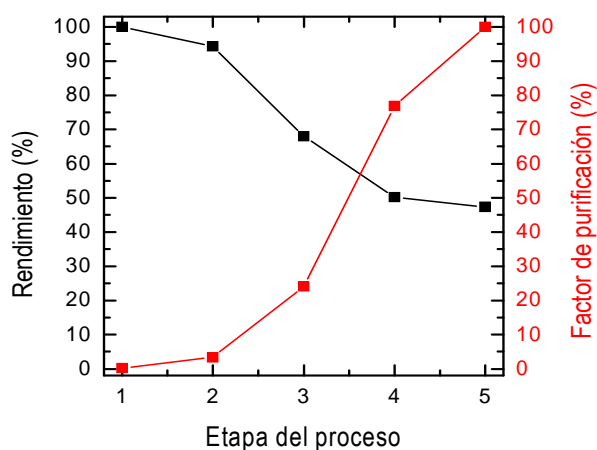


Figura 18. Variaciones del rendimiento y del factor de purificación a lo largo de las distintas etapas del proceso de purificación de la RPTP. (1) Homogeneizado; (2) Reparto bifásico; (3) Fenil-Sefarosa; (4) DEAE-Toyoearl 650M y (5) Superdex 200 10/30 HR.

1. Recolección



Palmera real (*Roystonea regia*)
(Alicante)

2. Limpieza



Proceso de Purificación Proteica
(Salamanca)
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular / Departamento
de Química-Física

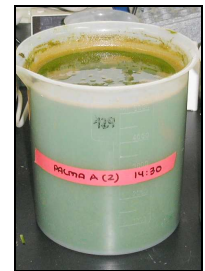
3. Congelación
(N₂ liq.) y
trituración



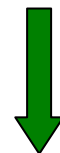
4. Homogeneización



Extracción de las
proteínas
Solubles (H₂O)



5. Eliminación de
pigmentos por
reparto bifásico



PEG
+
(NH₄)₂SO₄

6. Fraccionamiento
cromatográfico
(fase inferior)



-C. Hidrofóbica
-C. Intercambio Iónico
-C. Exclusión Molecular



8. Liofilización



7. Diálisis
(H₂O MilliQ)



RPTP

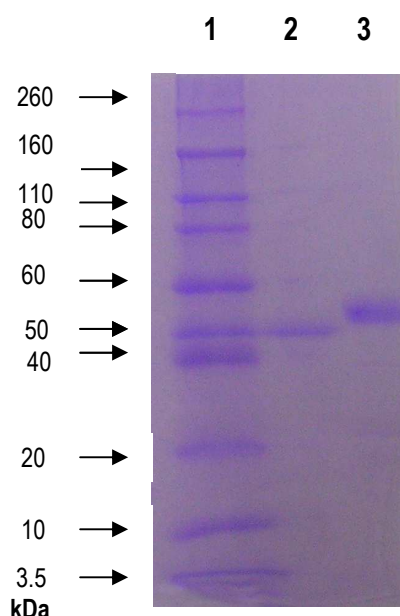
Esquema 6. Pasos del proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (RPTP).

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

5.3.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Cuando se purifica una biomolécula, 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 de Bioquímica es la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con la que además de poder determinar el grado de pureza de una muestra, se puede conocer la masa molecular de la misma, con un error del 10%.

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



**Figura 19. SDS-PAGE al 10%. Carril 1: bandas de las proteínas del marcador de masas moleculares de Novex Sharp Pre-Stained (Invitrogen Co.), carril 2: peroxidasa de palma real (RPTP) y carril 3: peroxidasa de *Chamaerops excelsa* (CEP). Los marcadores de masa molecular generan la siguiente recta de calibrado:
 $\log P_m = 2,39206 \pm 0,03193 - (1,46277 \pm 0,07505) R_f$, $R = -0,99348$.**

Se puede observar que ambas proteínas, la peroxidasa de palma real (RPTP) y la peroxidasa de *Chamaerops excelsa* (CEP), tienen un elevado grado de pureza, aproximadamente entre el 98 y el 99%. La masa molecular de cada una de ellas, determinada con esta técnica, es de $48,2 \pm 3,0$ y $54,1 \pm 3,2$ kDa, respectivamente (Fig. 19). Son masas moleculares típicas para peroxidasas de plantas.

5.3.2. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

La proteína intacta (0,5 μ l) se disuelve en el mismo volumen de disolución matriz (ácido sinapínico saturado en ACN al 50% y TFA al 0,1%) en un plato de la placa del espectrómetro de masas. Se seca y luego se hace incidir un pulso de luz UV. La proteína se ioniza, se registra su tiempo de vuelo que se relaciona con la masa molecular. Con los patrones utilizados como calibradores, se determina su masa molecular. En el espectro de masas se observa la forma proteica iónica con una y dos cargas (Fig. 20). La forma mayoritaria es la monoisotópica, con una masa molecular de 44604 Da. La masa molecular isotópica promedio es de 44596 ± 8 Da. Se observa la presencia minoritaria de un ión con relación m/z de 43759 Da.

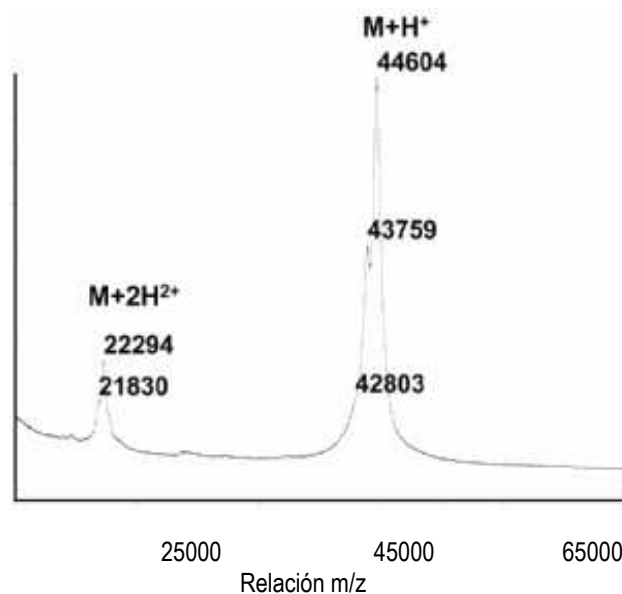


Figura 20. Determinación de la masa molecular de la RPTP por espectrometría de masas MALDI-TOF.

5.3.3. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Con este método se determinará la masa molecular de la peroxidasa de palma real (RPTP) en estado nativo. Conocido el volumen o tiempo de elución de los marcadores de masa molecular (Fig. 21A), se podrá conocer el de la proteína de interés. La mayor parte de las peroxidasas vegetales tienen una masa molecular en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de 10-55 kDa. La RPTP, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, presenta una única banda de $48,2 \pm 3,0$ kDa, esta elevada masa molecular se debe al elevado porcentaje de glicosilación de la proteína. El volumen de elución de la RPTP indica que la proteína se encuentra en forma dimérica en disolución. Estos dímeros tienen una masa molecular de 92 ± 2 kDa, aproximadamente (Fig. 21B). Se observa también en disolución un pequeño porcentaje ($\sim 2\%$) de proteína en

forma tetramérica (datos no mostrados), con una masa molecular de 200 ± 7 kDa. La peroxidasa de las hojas de la palma *Chamaerops excelsa* (CEP), también, forma dímeros en disolución, con una masa molecular de 109 ± 3 kDa y tetrámeros en baja proporción. En un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, presenta una única banda con una masa molecular de 50 ± 2 kDa (Zamorano *et al.*, 2009).

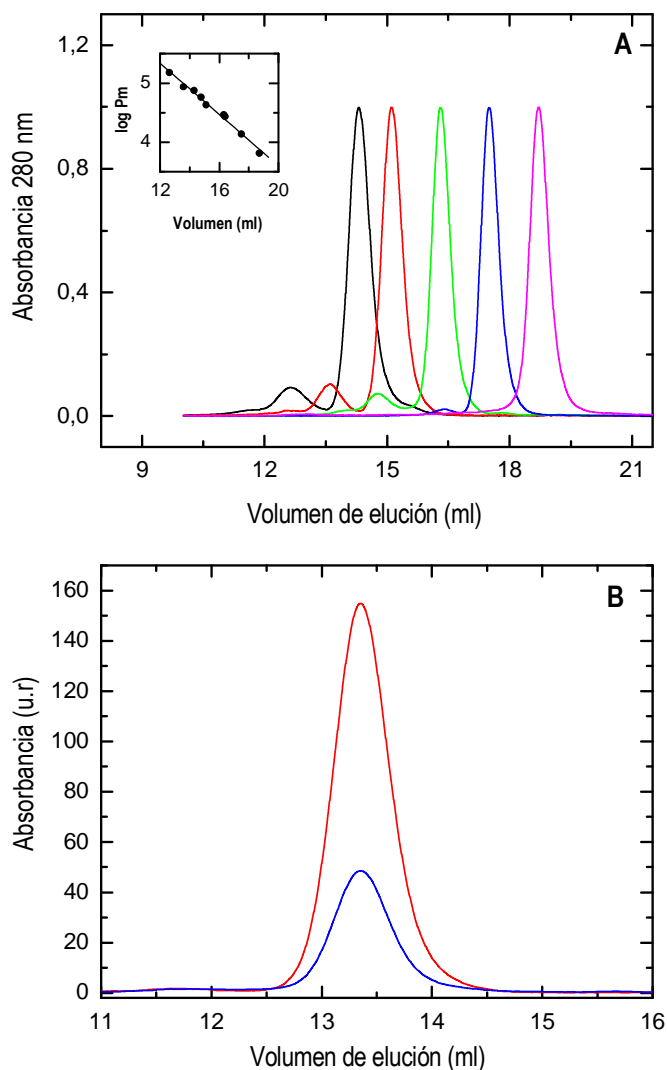


Figura 21. Cromatogramas de gel filtración de los marcadores de masa molecular (A) y de la peroxidasa de palma real (B), utilizando una columna de Superdex 200 HR 10/30 a una velocidad de flujo de $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Las proteínas que se usan como marcadores son: conalbúmina y su dímero (negra), ovoalbúmina y su dímero (roja), anhidrasa carbónica y su dímero (verde), ribonucleasa (azul) y aprotinina (rosa). Con estos nueve puntos se obtiene la recta de calibrado (Gráfico A, interior): $y = (7,90 \pm 0,14) - (0,22 \pm 0,01) \times$ ($R = -0,99348$). En el Gráfico B la línea roja corresponde a la absorbancia a 403 nm y la azul a 280 nm. La peroxidasa de palma real (RPTP) tiene una masa molecular, estimada con este método, de 92 kDa.

5.3.4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA (UCA)

Estudios previos realizados mediante cromatografía de exclusión molecular determinaron que la peroxidasa de palma real (RPTP) es una proteína dimérica en disolución con una masa molecular aproximada de 90 kDa. Además, la masa molecular, obtenida mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes de una molécula de monómero, es de $48,2 \pm 3,0$ kDa y la obtenida por espectrometría de masas MALDI-TOF es de 44596 ± 8 Da. Para examinar el estado oligomérico de la RPTP con más precisión, se han realizado una serie de experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación.

La Fig. 22 muestra las distribuciones molares normalizadas de la RPTP bajo diferentes condiciones de pH y concentración proteica. En todas las condiciones estudiadas, se obtiene una única forma mayoritaria que tiene una distribución simétrica y un coeficiente de sedimentación promedio de $6,2 \pm 0,2$ S, que corresponde a una masa molecular de $88,5 \pm 4,9$ kDa. Por tanto, la RPTP es una proteína dimérica en disolución. Cuando se trabaja a pH 7,0 con una concentración proteica de $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, se observa que, además de esta forma mayoritaria dimérica, aparece un 2% de otra población que posee un coeficiente de sedimentación de $9,9 \pm 0,5$ S y que corresponde a una masa molecular de $188,1 \pm 10,3$ kDa. A pH neutro y alta concentración proteica, se observa una pequeña cantidad de proteína en estado tetramérico (Tabla XXIII).

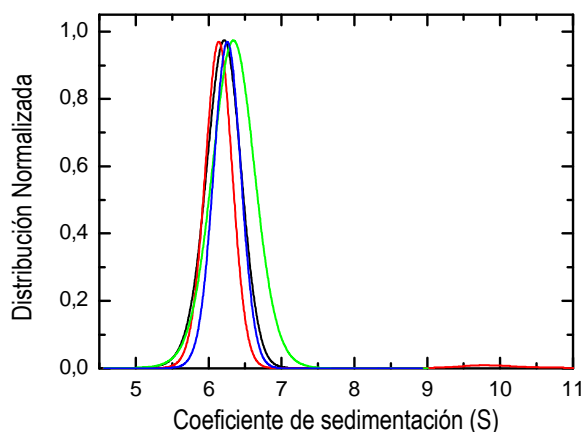


Figura 22. Experimentos de velocidad de sedimentación. Distribución molar normalizada de la peroxidasa de palma real a 25°C en tampón HEPES $20,0 \text{ mM}$ y pH $7,0$, con una concentración de proteína de $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$ (línea negra) y $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (línea roja). En tampón citrato $20,0 \text{ mM}$ y pH $3,0$ para una concentración de proteína de $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$ (línea verde) y $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (línea azul).

Tabla XXIII. Masas moleculares aparentes de la RPTP a diferentes valores de pH y concentración proteica, obtenidas mediante experimentos de velocidad de sedimentación.

pH	[RPTP] (mg ml ⁻¹)	Coefficiente de sedimentación (S)	Masa molecular (Da)
7,0	1,0	6,19 ± 0,25	87.530 ± 5.250
7,0	2,5	6,13 ± 0,19 9,94 ± 0,47	90.140 ± 4.100 188.100 ± 10.300
3,0	1,0	6,34 ± 0,31	88.250 ± 6.500
3,0	2,5	6,26 ± 0,20	88.040 ± 3.780

5.3.5. DETERMINACIÓN DEL pI

Con esta técnica 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 y su localización dentro de la célula. Este dato indica el pH al cual la proteína tiene una 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. Este dato ha sido determinado experimentalmente y también con la utilización del programa de proteómica EXPASy, una vez conocida la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de palma real.

Experimentalmente, la técnica no proporciona unos geles de IEF lo suficientemente nítidos como para mostrarlos en esta memoria, por lo que se presenta un esquema de los resultados obtenidos (Fig. 23).

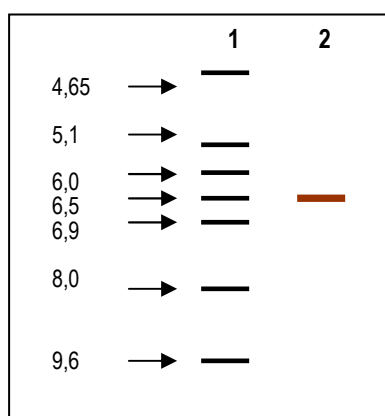


Figura 23. Esquema de IEF. Carril 1: bandas de las proteínas correspondientes al marcador de puntos isoeléctricos de amplio rango (pH 4,45-9,6) de Bio-Rad. Carril 2: banda de la peroxidasa de palma real (RPTP) revelada con el sustrato guayacol. Es un esquema y por ello las distancias entre las proteínas del marcador no son exactas. Las bandas exactas de las proteínas del marcador generan la siguiente recta de calibrado: $\log pI = 1,02387 \pm 0,01404 - (0,39645 \pm 0,02384) R_r$, $R = -0,99108$.

Realizando dos geles de IEF se obtiene un valor para el pI de la peroxidasa de palma real (RPTP) de $5,4 \pm 0,1$. El programa ExPASy nos proporciona un valor para el pI de 5,1. Se observa que, aunque el gel de isoelectroenfoque no era lo suficientemente nítido, proporciona un valor del pI bastante fiable. Por ello, teniendo en cuenta ambos resultados, el pI de la peroxidasa de palma es de $5,3 \pm 0,2$. La peroxidasa de palma real tiene una única isoenzima ácida.

Dentro de la célula existe una compartimentalización isoenzimática, la cual está relacionada con la funcionalidad de la enzima. Las isoenzimas aniónicas (pI < 7,0) se encuentran normalmente solubles en el citoplasma celular y su funcionalidad está relacionada con las reacciones enzimáticas que en él se desarrollan. En cambio, las isoenzimas catiónicas (pI > 7,0) se encuentran en la pared celular y están implicadas en el control de su crecimiento y rigidez.

La peroxidasa de palmera es una enzima aniónica y, por tanto, soluble en su mayor parte en el citoplasma celular. Esto se ha demostrado, además, observando que, en el proceso de purificación, el rendimiento no mejoraba realizando una extracción con detergentes (Triton X-100). Las peroxidases de palmeras, además, se han localizado en epidermis, hipodermo, estructuras conectoras y pared celular, no encontrándose en células del mesófilo que contienen clorofila. Además, en los tejidos hipo y epidérmico de diferentes especies de palmeras que han crecido en distintas condiciones climatológicas, se observa actividad peroxidasa en el interior y encima de la pared celular, lo que indica que el clima no influye en la localización enzimática.

5.3.6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

Es necesario conocer el coeficiente de extinción para poder determinar la concentración de una disolución proteica de manera exacta. Las metodologías empleadas más adelante requieren conocer ese dato de modo preciso, ya que se trabaja con concentraciones proteicas muy pequeñas, que no se pueden conocer con exactitud por pesada.

Antes de conocer la secuencia de aminoácidos de la RPTP, se determinó su coeficiente de extinción molar, con una técnica tan básica, como es, la medida de la absorbancia a determinadas longitudes de onda (280 y 403 nm) de diferentes disoluciones proteicas, de las que conocemos la concentración por pesada. Aplicando la ley de Lambert-Beer, se podrá estimar el valor del coeficiente de extinción a esas longitudes de onda. Una vez determinada la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de palma real (RPTP), se calcula el coeficiente de extinción mediante el uso del programa de proteómica ExPASy. Ambos valores se compararán.

Experimentalmente se determina la absorbancia a 280 y 403 nm de diferentes disoluciones proteicas en medio acuoso. Al representar estos valores frente a la concentración proteica, se generan dos rectas:

$$y = (1,39937 \pm 0,00857) x + (0,00306 \pm 0,00400); R = 0,99981 \text{ (Absorbancia a 280 nm)}$$

$$y = (0,50029 \pm 0,00717) x + (-0,00871 \pm 0,00281); R = 0,99928 \text{ (Absorbancia a 403 nm)}$$

cuyas pendientes revelan los valores de los coeficientes de extinción, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer en $\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Con este estudio, se obtienen unos valores de los coeficientes de extinción molar a 403 y 280 nm para un monómero de proteína de, $62,4 \pm 2,5$ y $22,3 \pm 0,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Se toma como valor de la masa molecular de la peroxidasa de palma real, el obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, $44596 \pm 8 \text{ Da}$. Se observa que a la vista de los coeficientes de extinción obtenidos, el valor del factor R_z (A_{403} / A_{280}) para la RPTP es de 2,80.

Teniendo en cuenta la composición en aminoácidos aromáticos de la peroxidasa de palma real, W (1), Y (6) y F (12), y los coeficientes de extinción molar a 280 nm de estos aminoácidos, 5580, 1490 y $125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, se puede determinar el valor del coeficiente de extinción a esa longitud de onda (Ec. 113):

$$\epsilon_{280} = a\epsilon_{\text{Trp}} + b\epsilon_{\text{Tyr}} + c\epsilon_{\text{Phe}} \quad (113)$$

Donde a, b y c son el número de triptófanos, tirosinas y fenilalaninas que contiene la peroxidasa de palma real. De acuerdo con esta ecuación, el valor del coeficiente de extinción molar de la peroxidasa de palma real a 280 nm es de $16,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, el coeficiente de extinción molar a 403 nm toma el valor de $44,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esta metodología proporciona un valor aproximado de los coeficientes de extinción molar que normalmente varía bastante de los valores reales.

En el caso de la peroxidasa de palma real, al conocer la secuencia de aminoácidos completa, con la ayuda del programa de proteómica ExPASy, se determina el coeficiente de extinción molar, cuyo valor es a 280 nm de $21,1 \pm 0,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y a 403 nm de $59,1 \pm 0,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para un monómero de proteína. Estos datos son más precisos que los calculados de manera experimental, ya que con esa metodología se cometen bastantes errores, aún así la variación no es superior al 5%. Se darán como valores finales de los coeficientes de extinción molar un valor medio entre el experimental y el obtenido mediante el programa de proteómica ExPASy, acompañados de la correspondiente desviación estándar:

$$\epsilon_{280}(\text{RPTP}) = 21,7 \pm 0,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ y } \epsilon_{403}(\text{RPTP}) = 60,8 \pm 2,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

5.4. ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

5.4.1. TITULACIÓN PROTEICA: DESNATURALIZACIÓN INDUCIDA POR EL pH

La estabilidad estructural y la actividad enzimática de las peroxidasa dependen del pH de la disolución (Tams *et al.*, 1996; Pina *et al.*, 2001; Zamorano *et al.*, 2004). Aunque las peroxidasa 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 de la RPTP.

La RPTP es una enzima muy estable en un rango de pH comprendido entre 2,0 y 13,0 (Fig. 24). Tiene dos cambios en la actividad enzimática, con valores de pK_a aparentes de 4,4 y 8,9 (Fig. 24A), los cuales no coinciden con los cambios de sus parámetros espectrales.

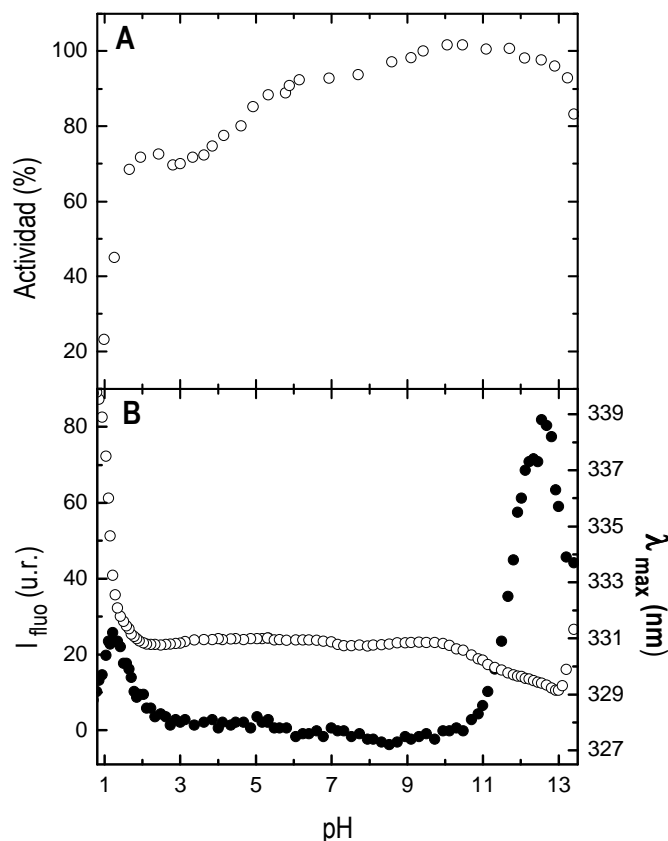


Figura 24. Efecto del pH sobre la actividad enzimática (A) y sobre los parámetros de fluorescencia (B) de la RPTP a 25 °C. Las medidas se han realizado en tampón universal 10,0 mM con una concentración proteica aproximada de 10,0 μ M. La actividad se midió usando guayacol como sustrato. En el Gráfico B los círculos blancos representan la intensidad de fluorescencia a 350 nm en unidades arbitrarias y los círculos negros representan la posición del máximo de fluorescencia del espectro (λ_{max}). Se tomó como longitud de onda de excitación de 296 nm.

Uno de los parámetros más útiles del espectro de fluorescencia de una proteína es la posición del máximo (λ_{\max}), que refleja el grado de accesibilidad de las moléculas de disolvente a los cromóforos. Se observa que dicho parámetro permanece constante (con una variación de $\pm 0,3$ nm) en un rango de pH comprendido entre 2,8 y 10,8. Ello 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 (Fig. 24B). Por ello, el rango de pH comprendido entre 3,0 y 11,0 sería el óptimo para realizar una caracterización físico-química ya que no hay cambios en los parámetros fluorescentes ni en la actividad enzimática.

La intensidad de fluorescencia o rendimiento cuántico se modifica notablemente cuando se acidifica la disolución hasta un pH $< 2,0$ (aumenta del orden de cuatro veces). Este cambio va acompañado, en primer lugar, de un desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda (3,2 nm), seguido, a pH $< 1,2$, de un desplazamiento a menores longitudes de onda debido a la agregación proteica, efecto que causa el aumento de la intensidad de fluorescencia. Esto indica que el triptófano, durante la desnaturalización ácida, se aleja del grupo hemo, que actúa como “*quencher*” y por lo tanto aumenta su rendimiento cuántico.

Si elevamos el pH por encima de 10,8, se aprecia un desplazamiento de 11,0 nm del máximo de emisión de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda, lo que implica un aumento de la polaridad de los triptófanos. Este fenómeno se aprecia hasta pH 12,5, a partir del cual el máximo de emisión se reduce, fenómeno relacionado con la agregación proteica que evita la completa hidratación de los triptófanos. A partir de pH 13,0, se observa un incremento de la intensidad de fluorescencia.

La comparación de los cambios en la actividad enzimática y en los parámetros de fluorescencia inducidos por el pH indican que sólo la intensidad de fluorescencia está relacionada con la desnaturalización proteica, mientras que la posición del máximo del espectro de fluorescencia, que refleja la polaridad de los aminoácidos aromáticos, no influye en la función enzimática de la RPTP.

Estudios de la misma índole realizados con otras peroxidasas 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 de pH comprendido entre 3,0 y 11,0, la desnaturalización ácida y básica provoca una 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 las hojas de la palmera *Chamaerops excelsa* (Zamorano et al., 2009) es estable en un margen de pH entre 2,5 y 6,0, 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, pero hay que tener en cuenta que es la peroxidasa de palma real (RPTP) la que exhibe un rango de estabilidad más amplio.

5.4.2. DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA

5.4.2.1. Análisis de la desnaturalización térmica por fluorescencia

Los aminoácidos aromáticos son los verdaderos fluoróforos de las proteínas. En función de la longitud de onda de excitación, la contribución al espectro de fluorescencia de cada uno de ellos será distinta. Se obtendrá el espectro de emisión de fluorescencia de la peroxidasa de palma real nativa y térmicamente desnaturalizada a pH 3,0 entre 300-400 nm, con una longitud de onda de excitación de 296 nm (tan sólo se detecta la fluorescencia del Trp).

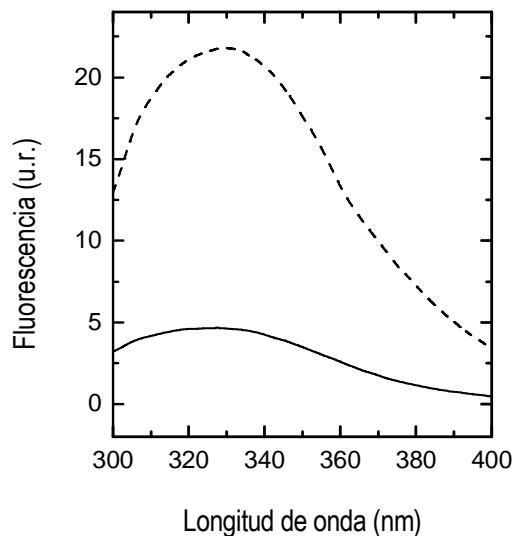


Figura 25. Espectros de emisión de fluorescencia de la RPTP nativa a 25 °C (línea continua) y térmicamente desnaturalizada a 80 °C (línea discontinua). La longitud de onda de excitación es de 296 nm.

Los cambios en el entorno de los aminoácidos aromáticos se deben a cambios en la estructura terciaria de la proteína, lo cual puede ser detectado por espectroscopia de fluorescencia intrínseca. Se observa que el espectro de la RPTP nativa tiene un bajo rendimiento cuántico, al igual que le ocurre a otras peroxidases de plantas (CEP, cHRP, AOPTP y aPrx). Ello es debido a la transferencia de energía que ocurre desde el

triptófano al grupo hemo, que actúa de “quencher”. Cuando la proteína se desnatura térmicamente, se observa que existe un aumento en la intensidad de fluorescencia, que es debido a una reorientación del grupo hemo, que se aleja del triptófano y por tanto, reduce el “quenching” (Fig. 25). Se observa también que la desnaturalización térmica, al igual que la ácida o la básica, no modifica la polaridad de los aminoácidos aromáticos, ya que el máximo de emisión de fluorescencia permanece inalterado, es decir los aminoácidos aromáticos se reorientan pero permanecen en un ambiente apolar.

Se utilizarán los cambios en la intensidad de fluorescencia a 360 nm para analizar el efecto del calentamiento en la desnaturalización proteica (Fig. 26). Un aumento de la temperatura da lugar a una transición cooperativa irreversible hasta un estado desnaturado (perfil sigmoideo), la cual se analiza por ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados (Ec. 76). De este ajuste (Fig. 26, línea) se pueden obtener los valores de la energía de activación (E_A) y de la temperatura (T^*), que son $125,4 \pm 3,3$ kcal mol⁻¹ y $341,7 \pm 2,4$ K, respectivamente.

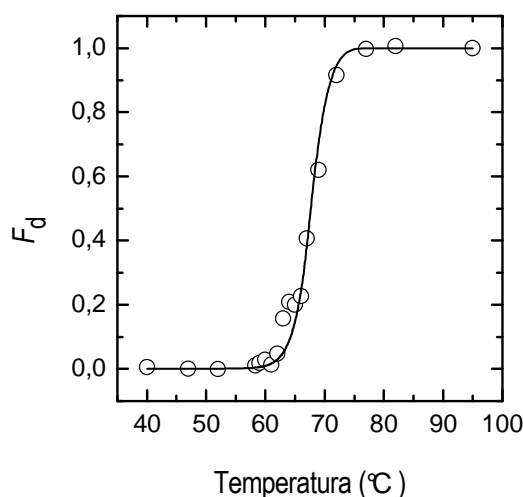


Figura 26. Fracción de proteína RPTP desnaturada durante el proceso de desnaturalización térmica, registrada por medidas de intensidad de fluorescencia a 360 nm y pH 3,0. Se utiliza una velocidad de calentamiento de 96 K h⁻¹. La línea continua es el mejor ajuste de los datos experimentales a la Ec. 76.

5.4.2.2. Análisis de la desnaturalización térmica por dicroísmo circular

Cuando la proteína se desnatura térmicamente, se obtiene un perfil espectral de DC típico de las proteínas desnaturadas, reduciéndose las bandas características de las α -hélices e incrementándose bandas típicas de la estructura desordenada, como son los mínimos a 200 nm y los máximos entre 220 y 230 nm (Fig. 27). En este caso, hay un claro aumento de la estructura desordenada a expensas del descenso de la estructura de α -hélice. También se observa un incremento de la estructura en hoja β , debido

a la agregación proteica de carácter intramolecular que va acompañada del aumento de turbidez de la muestra durante el proceso de desnaturalización. Las peroxidasa de rábano (cHRP), aniónica de cacahuete (aPrx) y de palmera *Chamaerops excelsa* (CEP) presentan este mismo comportamiento durante su desnaturalización térmica.

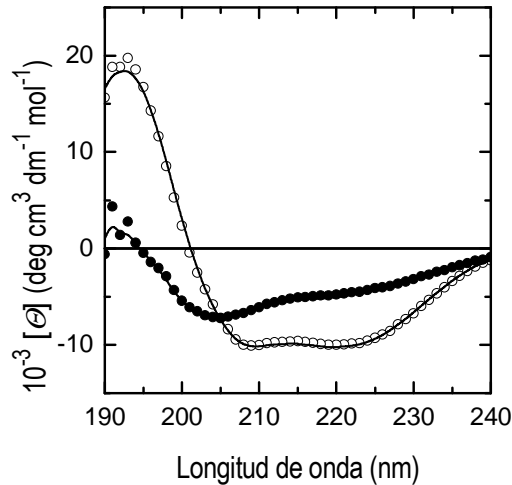


Figura 27. Espectros de DC en el UV-lejano de la RTPP a pH 3,0 y 25 °C nativa (círculos blancos) y térmicamente desnaturalizada a 80 °C (círculos negros). Las líneas continuas a través de los puntos experimentales son los mejores ajustes de esos datos con el programa CDSSTR, utilizando como conjuntos de referencia los modelos SP43 y SDP48 para las proteínas nativas y desnaturalizadas, respectivamente.

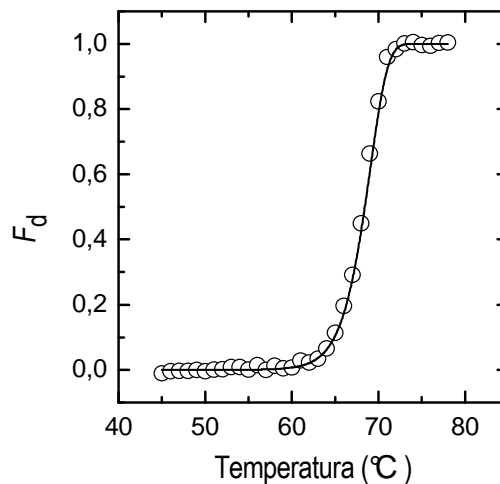


Figura 28. Fracción de proteína RTPP desnaturalizada en función de la temperatura a pH 3,0, registrada por cambios de la elipticidad molar a 222 nm, obtenidos con una velocidad de calentamiento constante de 60,1 K h⁻¹. La línea continua representa la curva teórica del ajuste de los datos experimentales al modelo irreversible de dos estados (Ec. 76).

Un parámetro significativo en la desnaturalización enzimática es la elipticidad molar a 222 nm. Durante el proceso de desnaturalización térmica se registra el cambio de este parámetro con la temperatura (Fig. 28). Se observa que sigue un perfil sigmoideo, por lo que la desnaturalización se comporta de acuerdo con una transición cooperativa irreversible hasta un estado completamente desnaturalizado. Ajustando esos datos mediante una regresión no lineal por mínimos cuadrados (Ec. 76, Fig. 28, línea), se obtienen los valores de los parámetros E_A y T^* , que son $124,1 \pm 3,1$ kcal mol⁻¹ y $343,5 \pm 1,7$ K, respectivamente. Valores que son muy similares a los obtenidos mediante los estudios de fluorescencia.

5.4.2.3. Análisis de la desnaturalización térmica mediante DSC

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 registrarán los perfiles calorimétricos de la RPTP a diferentes valores de pH (7,0 y 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.

5.4.2.3.1. Desnaturalización de la RPTP a pH 7,0

Los termogramas de la desnaturalización de la RPTP en tampón HEPES 20,0 mM y pH 7,0, se muestran en la Fig. 29. En el Gráfico A se puede apreciar el grado de reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica, correspondiendo la línea continua al primer barrido proteico y la discontinua al segundo barrido de la misma muestra proteica que fue enfriada, después de un primer calentamiento hasta 100 °C. La reversibilidad se cuantifica mediante el % de recuperación del área del termograma. Debido a la agregación que ocurre tras la desnaturalización térmica, es muy difícil observar la reversibilidad térmica de proteínas cuando se llega a una temperatura de calentamiento cercana a los 100 °C. Sin embargo, en el caso de la RPTP en estas condiciones, se observa una reversibilidad térmica a pH 7,0 muy marcada, con un porcentaje de recuperación del área del 80%. Cuando se incubaba la RPTP a temperaturas iguales o superiores a 105 °C, durante periodos de tiempo superiores a 5 min en barridos consecutivos, tan sólo se recupera un 20% de la entalpía transicional. La desnaturalización térmica a pH 7,0 se llevó a cabo con diferentes velocidades de barrido desde 0,35 hasta 1,4 K min⁻¹ y se obtuvieron los mismos perfiles calorimétricos, indicando la ausencia de efectos cinéticos en la desnaturalización térmica a pH 7,0.

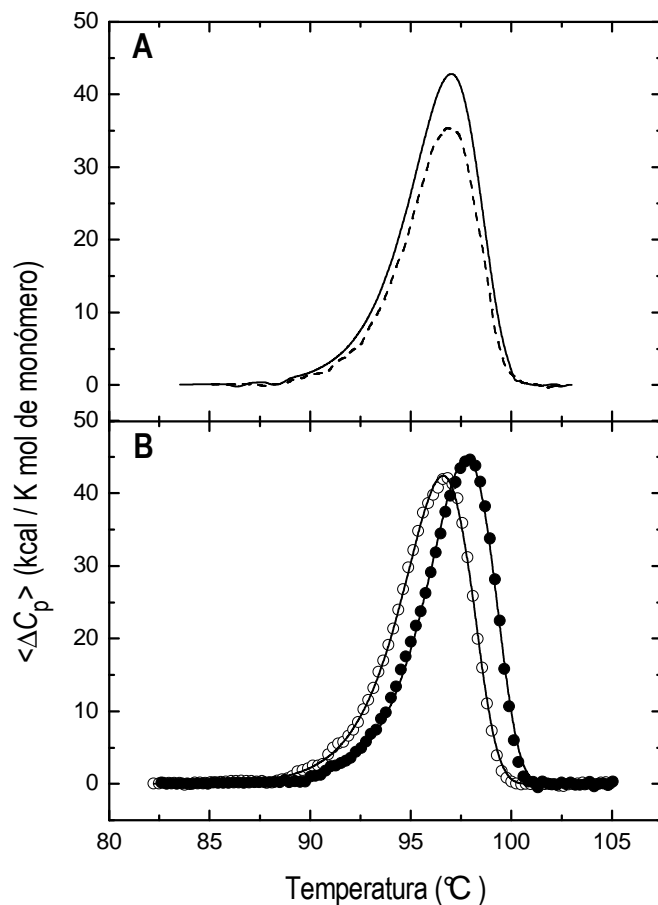


Figura 29. Perfiles calorimétricos de la RPTP en tampón HEPES 20,0 mM a pH 7,0. (A) Reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica de la RPTP a pH 7,0. Las curvas de DSC han sido registradas con una concentración de proteína 18,0 μM y una velocidad de barrido de 60,1 K h^{-1} . La línea continua expresa el primer perfil calorimétrico de la proteína nativa, calentando hasta 100 $^{\circ}\text{C}$. La discontinua corresponde al segundo barrido de la misma muestra proteica, enfriada después del primero. En el segundo perfil se recupera un 80% del área. (B) Curvas de capacidad calorífica molar en exceso de la RPTP obtenidas a diferentes concentraciones proteicas: 12,7 μM (círculos blancos) y 50,0 μM (círculos negros) a una velocidad de barrido de 60,8 K h^{-1} . Las líneas continuas representan las curvas teóricas generadas cuando se ajustan los datos experimentales a un modelo simple de dos estados acoplado a un modelo de disociación.

Debido a la naturaleza dimérica de la RPTP, la estabilidad de la forma nativa es dependiente de la concentración (Fig. 29B). Se observa que todos los picos transicionales están sesgados hacia la zona de bajas temperaturas de la transición, lo que indica que la transición está acoplada a un proceso de disociación, como indica la Ec. 117 (Manly *et al.*, 1985; Freire, 1989). La $T_{1/2}$ (temperatura del punto medio de la transición) no coincide con la temperatura a la que es máximo el exceso de capacidad calorífica (T_m). Para los perfiles calorimétricos obtenidos a diferentes concentraciones proteicas, la razón entre las entalpías de van't Hoff y calorimétrica ($\Delta H_{\text{VH}}/\Delta H(T_m)$), obtenida a una temperatura donde $\alpha = 0,5$, tiene un valor promedio de $1,30 \pm 0,05$ (Ec. 114).

$$\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H(T_m)} = \frac{2n}{n+1} \quad (114)$$

Esta razón es válida para una situación en la que el desplegamiento de una proteína oligomérica está acoplado a un proceso de disociación-desnaturalización de sus monómeros. Esa razón de entalpías toma el valor de 1,333 para dímeros (Freire, 1989).

Cuando el proceso de desnaturalización va asociado a un proceso de disociación, la temperatura (T_m) depende de la concentración de proteína utilizada, por lo que el equilibrio termodinámico predice una relación entre la concentración total de monómero (A_t) y la temperatura de desplegamiento (T_m) (Ec. 115).

$$\ln A_t = C - \frac{n\Delta H(T_m)}{(n-1)RT_m} \quad (115)$$

Al representar los valores de $\ln A_t$ frente a $1/T_m$ (Fig. 30), los puntos experimentales se ajustan a una línea recta. El valor de $\Delta H(T_m)$ se obtiene de la pendiente de esta línea y es de $192,3 \pm 8,5$ kcal mol⁻¹, muy próximo a los valores de la entalpía calorimétrica para la RPTP a pH 7,0 (Tabla XXIV).

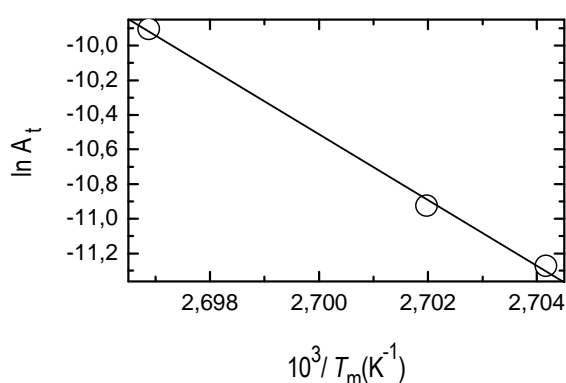


Figura 30. Representación del logaritmo de la concentración de monómero molar de la RPTP contra T_m^{-1} a pH 7,0. T_m es el valor absoluto de la temperatura a la que es máximo el exceso de capacidad calorífica (datos de la Fig. 29). La línea representa el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales.

Los datos calorimétricos obtenidos a diferentes concentraciones de RPTP fueron ajustados individualmente a un modelo de desnaturalización de oligómeros ($n = 2$) (Ec. 117). Este ajuste generó muy buenos resultados cuando n fue 2 (Fig. 28, líneas). Se hicieron otros ajustes con distintos valores de n , pero fueron peores. Los mejores valores de los parámetros termodinámicos, obtenidos con ese modelo, se muestran en la Tabla XXIV.

Tabla XXIV. Parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización térmica de la RPTP. La desviación estándar para los parámetros T_m y $T_{1/2}$ es de $\pm 0,2$ K y para la entalpía del proceso de desnaturalización el coeficiente de variación es del 5%.

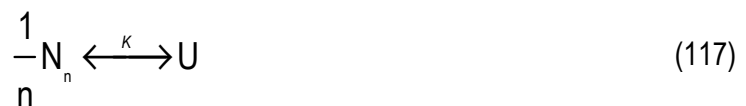
[RPTP] (μM)	pH	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{1/2}$ ($^{\circ}\text{C}$)	T_o ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(T_m)$ (kcal mol^{-1})	T_s ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta G(T_s)$ (kcal mol^{-1})
12,7	7,0	96,7	95,9	104,6	196,2	24,1	23,9
18,0	7,0	97,0	96,2	104,8	197,0	24,3	24,0
50,0	7,0	97,7	97,0	104,7	198,8	24,2	23,9
18,0	3,0	69,0	68,3	77,6	144,5	13,6	15,5

T_o es la temperatura a la cual $\Delta G^{\circ}(T) = 0$; T_s es la temperatura del máximo de estabilidad que se calcula con la Ec. 116 (Becktel *et al.*, 1987). El incremento de capacidad calorífica se calcula de la pendiente de la variación de la entalpía con la temperatura, para distintos valores de pH, que oscilan entre 3,0 y 9,0, $\Delta C_p = 2,4 \pm 0,1 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

$$T_s = \exp \left[\frac{-\Delta H(T_o)}{T_o \Delta C_p} \right] \quad (116)$$

Todos estos resultados permiten concluir que, en disolución a pH 7,0, la RPTP se comporta como un dímero que se desnaturaliza reversiblemente de acuerdo con un modelo de dos estados, acoplado a un proceso de disociación (Ec. 117-122).

Modelo de desnaturalización de dos estados acoplado con un modelo de disociación. Este modelo se corresponde con una situación en la que la proteína oligomérica se disocia en subunidades idénticas que obedecen al siguiente equilibrio:



$$K = \frac{[U]}{[N_n]^{1/n}} \quad (118)$$

donde $[N_n]$ y $[U]$ representan la concentración de oligómero plegado y monómero desplegado, respectivamente y n el número de subunidades dissociables. K es la constante de equilibrio (Ec. 118). Si α es la fracción de proteína en estado desnaturalizado y $(1-\alpha)$ la fracción de proteína en estado nativo, la constante de equilibrio viene definida por la Ec. 119.

$$K = n^{1/n} C_t^{(n-1)/n} \frac{\alpha}{(1-\alpha)^{1/n}} \quad (119)$$

donde C_t es la concentración molar total de monómeros. Usando la Ec. 119 y la expresión para el cambio de entalpía (Ec. 120), es fácil expresar la constante de equilibrio en función de la temperatura (Ec. 121).

$$\left[\frac{d \ln K}{dT} \right]_p = \frac{\Delta H(T)}{RT^2} = \frac{\Delta H_{1/2} + \Delta C_p (T - T_{1/2})}{RT^2} \quad (120)$$

$$K(T) = \frac{1}{2} \left(\frac{n}{2} \right)^{1/n} C_t^{(n-1)/n} \exp \left[-\frac{\Delta H_{1/2}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left(1 - \frac{T_{1/2}}{T} + \ln \frac{T_{1/2}}{T} \right) \right] \quad (121)$$

donde R es la constante de los gases, $\Delta H_{1/2}$ e ΔC_p son los cambios en la entalpía y la capacidad calorífica del desplegamiento, respectivamente, $T_{1/2}$ es la temperatura a la que α vale 0,5.

Conocemos $K(T)$; $\alpha(T)$ puede ser resuelto numéricamente (Ec. 121) y la función que representa el exceso de capacidad calorífica $\langle \Delta C_p \rangle$ es la derivada del exceso de entalpía con respecto de la temperatura (Ec. 122).

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{d\langle \Delta H \rangle}{dT} = \frac{d\alpha(T)}{dT} \Delta H_{1/2} + \alpha \Delta C_p \quad (122)$$

Todo el conjunto de ecuaciones anteriores (Ec. 117-122) son utilizadas para ajustar los datos experimentales.

5.4.2.3.2. Desnaturalización de la RPTP a pH 3,0

La síntesis en condiciones óptimas para el medioambiente o "síntesis verde" del polielectrolito polianilina se realiza a pH 3,0 (Caramyshev *et al.*, 2005). Así pues, encontrar las peroxidasas más estables a este pH mejoraría el rendimiento de este proceso. Este es uno de los motivos principales por los que se realizan los estudios de desnaturalización a este pH concreto. Otros motivos son: los pares iónicos contribuyen en gran medida a la estabilidad de proteínas con grupo hemo, cuando se estudia la desnaturalización a pH ácido esos pares iónicos desaparecen por protonación y de ese modo se determina la contribución de estas estructuras a la estabilidad proteica. Otras peroxidasas de plantas han sido caracterizadas a este pH, de modo que se puede hacer una comparativa y saber cuál de ellas es más estable a pH ácido. Finalmente para la RPTP este pH de estudio es bastante bueno. Como se ha visto en

estudios previos, la enzima no presenta cambios en sus propiedades enzimáticas y fluorescentes y, además, tal pH está bastante alejado del valor de su pI (5,3).

En el proceso de desnaturalización térmica a pH 3,0 lo primero que se observa es que las transiciones calorimétricas (T_m), son dependientes de la velocidad de barrido (Fig. 31). En segundo lugar, la desnaturalización térmica es un proceso irreversible, es decir un segundo calentamiento no presenta efectos térmicos. Ello indica que las transiciones térmicas son irreversibles y el proceso está controlado cinéticamente.

Como la RPTP es una proteína dimérica, la desnaturalización térmica debería ir acompañada de un proceso de disociación, lo que generaría una dependencia de T_m con la concentración proteica, como ocurría a pH 7,0 (Manly *et al.*, 1985; Freire, 1989). Los valores de T_m e ΔH_{calc} para la desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0 dependían de la concentración proteica, en un rango de concentraciones comprendido entre 0,5 y 2,4 mg ml⁻¹. La relación entre las entalpías de van't Hoff y calorimétrica, obtenida para diferentes concentraciones proteicas y velocidades de barrido, tiene un valor medio de $1,4 \pm 0,1$ (Ec. 114), válida cuando la desnaturalización de un dímero está acoplada a su disociación en monómeros. Por ello, como existe una pequeña variación en los parámetros cinéticos del proceso de desnaturalización con la concentración, en todos los experimentos que se realizan a este pH, se usará la misma concentración de proteína, para estar seguros de que los resultados obtenidos son independientes de la misma.

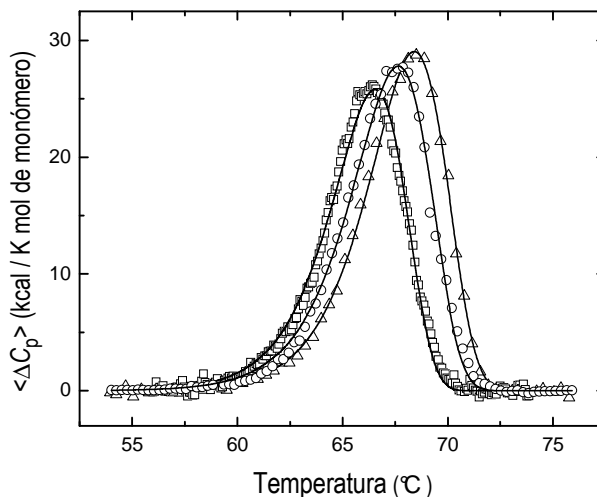


Figura 31. Variación de la capacidad calorífica molar en exceso de la RPTP con la temperatura a diferentes velocidades de calentamiento. (Cuadrados) 30,1 K h⁻¹, (círculos) 60,2 K h⁻¹ y (triángulos) 88,2 K h⁻¹, en tampón citrato 20,0 mM a pH 3,0, con una concentración proteica 18,0 μM. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de cada conjunto de datos experimentales a la Ec. 70.

Para analizar las transiciones calorimétricas de la desnaturalización de la RPTP, se debería usar un modelo que incluyera dos pasos: una disociación reversible (desplegamiento) del dímero en monómeros, seguido de una alteración irreversible de esos monómeros hasta un estado desnaturalizado desde el que no pueden retornar al estado nativo. El esquema descrito se corresponde con el modelo de Lumry-Eyring, para proteínas diméricas (Ec. 123).



donde N_2 es el dímero nativo, U es monómero desplegado, D es monómero desnaturalizado, k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa del proceso 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 una solución analítica a varias temperaturas. Por ello, es necesario aplicar un modelo más simple, que será un caso particular del modelo de Lumry-Eyring (Ec. 124). 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 (Ec. 56).

Los perfiles calorimétricos fueron analizados de acuerdo al modelo simple de dos estados (Ec. 70) de manera individual y de manera global. Con ambos ajustes, se han obtenido parámetros muy similares (Fig. 31, Tabla XXV).

Los coeficientes de correlación (r) de la Tabla XXV, han sido calculados usando la Ec. 125, en la que y_i e y_i^{cal} son los valores de C_p , experimental y calculado, respectivamente; y_i^m es el valor experimental medio de C_p y n el número de puntos.

$$r = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^{cal})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^m)^2}} \quad (125)$$

Tabla XXV. Parámetros estimados con la ecuación de Arrhenius para la desnaturalización térmica de la RPTP 18 μ M a pH 3,0. Se ajustan los datos experimentales a un modelo irreversible de dos estados.

Parámetro	Velocidad de barrido (K h ⁻¹)			Ajuste Global
	30,1	60,2	88,2	
ΔH (kcal mol ⁻¹)	121,8 \pm 0,9	140,0 \pm 1,2	144,2 \pm 1,2	
T^* (K)	341,9 \pm 0,2	342,0 \pm 0,1	342,0 \pm 0,1	342,0 \pm 0,2
E_A (kcal mol ⁻¹)	130,5 \pm 0,6	128,8 \pm 0,5	127,4 \pm 0,5	129,8 \pm 0,8
r	0,9978	0,9980	0,9984	0,9969

Se intentó ajustar los datos experimentales a otras aproximaciones del modelo de Lumry-Eyring, una de ellas incluía dos pasos consecutivos irreversibles, pero los ajustes no ofrecieron buenos resultados. Ello nos indica que el modelo simple irreversible de dos estados es suficiente para describir cuantitativamente la desnaturalización cinética de la proteína RPTP. Esta conclusión fue confirmada por el seguimiento espectral de la desnaturalización térmica de esta enzima.

5.4.2.3.3. Curvas de estabilidad de la RPTP a diferentes valores de pH

La termodinámica de equilibrio no se puede aplicar para analizar la desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0, ya que es un proceso controlado cinéticamente. Se puede obtener información termodinámica útil por extrapolación de los parámetros de la transición a velocidad de calentamiento infinita (Privalov *et al.*, 1986, 1989). Los parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0 se resumen en la Tabla XXIV.

Las curvas de estabilidad de la RPTP a pH 3,0 y 7,0 (Fig. 32), calculadas con la ecuación de Gibbs-Helmholtz (Ec. 126), dan información de la estabilidad proteica, dato relacionado con el incremento de energía libre de Gibbs a TA (Becktel *et al.*, 1987). Este valor para proteínas globulares normalmente se encuentra entre 5 y 15 kcal mol⁻¹.

$$\Delta G^\circ(T) = \Delta H(T_{1/2})(1 - T/T_0) - \Delta C_p [(T_0 - T) + T \ln(T/T_0)] \quad (126)$$

donde $\Delta G^\circ(T)$ es el cambio de energía libre estándar, T_0 es la temperatura para la que $\Delta G^\circ(T) = 0$, $\Delta H(T_{1/2})$ es la entalpía de transición experimental a la temperatura $T_{1/2}$ e ΔC_p es el incremento de capacidad

calorífica entre los estados conformacionales nativo y desnaturado. Este último dato se obtiene como pendiente de la representación de ΔH frente a la T usando un conjunto de datos experimentales obtenidos a diferentes valores de pH, en un rango comprendido entre 3,0 y 9,0, siguiendo la ecuación de Kirchoff (Ec. 38).

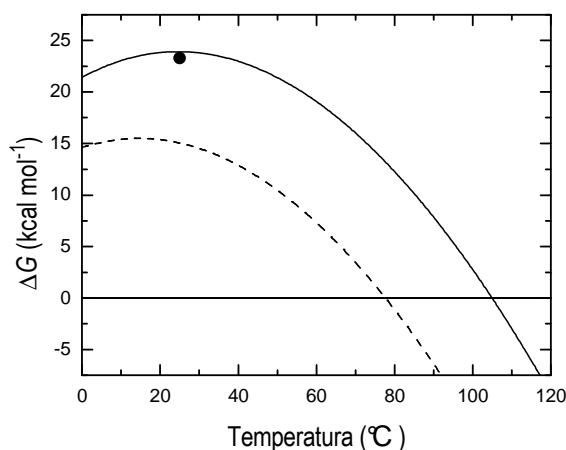


Figura 32. Curvas de estabilidad de la RPTP a pH 7,0 (línea continua) y a pH 3,0 (línea discontinua). El punto representa el valor de la energía libre de Gibbs a 25 °C y pH 7,0, obtenida de la curva de desnaturación química con GuHCl con una concentración proteica de 16,0 μM (muy próxima a la concentración de los experimentos de DSC). La curva de estabilidad para la RPTP a pH 3,0 fue calculada con los parámetros termodinámicos (Tabla XXIV), obtenidos por extrapolación de los datos experimentales hasta velocidad de calentamiento infinito. Los valores son bastante próximos a los valores reales.

El valor de ΔC_p para la RPTP es $2,4 \pm 0,1 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. La estabilidad de la enzima a 25 °C y pH 7,0 es de $23,3 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Es un valor muy alto, ya que el incremento de energía libre para procesos biológicos suele encontrarse entre 5 y 15 kcal mol^{-1} . La causa de este alto valor no se conoce con exactitud, puede ser debido a la alta estabilidad proteica, pero no está del todo claro.

La estabilidad de la RPTP a 25 °C y pH 3,0 es de aproximadamente $15,0 \pm 0,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. La diferencia de energía libre entre los valores de pH 7,0 y 3,0 es de 8 kcal mol^{-1} , este dato refleja la contribución de los pares iónicos a la estabilidad estructural de la peroxidasa de palma real (Sawano *et al.*, 2008).

5.4.3. DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA

Se muestran los espectros de DC de la RPTP con concentraciones de GuHCl de 0 y 7,1 M en tampón HEPES 20,0 mM a pH 7,0 y 25 °C (Fig. 33). En ausencia de agente desnaturante, el espectro de DC tiene las bandas características de una proteína con alto predominio de α -hélices en su estructura secundaria, siendo similar al de la proteína a pH 3,0. Sin embargo, cuando la concentración de agente

desnaturalizante es elevada, se observa que no se puede registrar correctamente un espectro de DC y por tanto no se puede analizar el contenido de estructuras secundarias en este estado. Ello es debido a que la absorción del GuHCl evita que se registren correctamente las medidas de la elipticidad molar proteica a longitudes de onda inferiores a 210 nm (Fig. 33).

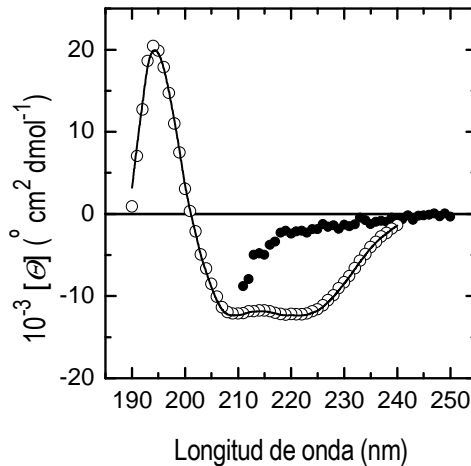


Figura 33. Espectros de DC en el UV-lejano de la RPTP 10,0 μM a pH 7,0 y 25 $^{\circ}\text{C}$: nativa (círculos blancos) y químicamente desnaturalizada con GuHCl 7,1M (círculos negros). La línea continua que pasa a través de los puntos experimentales corresponde al mejor ajuste de estos datos con el programa CDSSTR, usando como modelo de referencia para proteínas nativas el modelo SP43.

El GuHCl induce desnaturalización y desplegamiento proteico, debido a que esta molécula se une con mayor intensidad a las moléculas de proteína en estado desplegado que a las que se encuentran en estado nativo, debilitando las interacciones con las moléculas de agua y, por lo tanto, interfiriendo en el efecto hidrófobo. La elipticidad molar de la proteína a 222 nm cambia con la concentración de agente desnaturalizante durante el proceso de desplegamiento. Al representar esta propiedad frente a la concentración del agente químico, se obtiene un perfil sigmoideo (Fig. 34) que se podrá analizar de acuerdo al modelo de desnaturalización de dos estados (plegado/desplegado), acoplado al modelo de disociación (Ec. 117). Es el mismo modelo que se ha utilizado para analizar los datos experimentales de DSC. Esto se puede hacer porque la desnaturalización química es un proceso reversible

El incremento de energía libre de Gibbs entre las conformaciones proteicas, nativa y desnaturalizada, se puede determinar con una ecuación termodinámica clásica (Ec. 71). En la que ΔG° es el cambio de energía libre de Gibbs inducido por el desplazamiento del equilibrio desde un estado inicial (estado hipotético en el que la concentración de dímero y monómero es de 1M) hasta un estado final, en el que la concentración de dímero y monómero estará gobernada por el valor de la constante de equilibrio (K). Esta constante se determina fácilmente con el uso de la Ec. 118. Conocidas las constantes de equilibrio, se

pueden determinar fácilmente los valores de ΔG° para cada concentración de agente desnaturante. Al representar ΔG° frente a $[\text{GuHCl}]$, estos datos se ajustan con precisión a una línea recta siguiendo el método de extrapolación lineal (Pace, 1986) (Ec. 72). Donde $\Delta G^\circ (\text{H}_2\text{O})$ es el incremento de la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturante y m representa cómo varía el incremento de energía libre (ΔG°) con la concentración de agente químico ($[\text{GuHCl}]$).

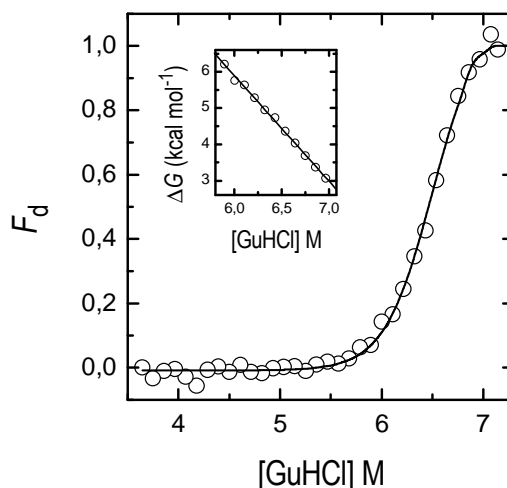


Figura 34. Fracción de proteína RPTP desnaturada en función de la concentración de agente desnaturante GuHCl, registrada por cambios de elipticidad molar a 222 nm. La línea continua es el resultado del mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de desnaturación de dos estados, acoplado con un proceso de disociación. El gráfico interior representa los incrementos de energía libre entre las conformaciones plegada y desnaturada de la RPTP, obtenidas de los cambios de la elipticidad molar con la concentración de GuHCl en la región de transición, usando la Ec. 72. La línea recta es el resultado de un ajuste lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la Ec. 72.

En el gráfico interior de la Fig. 34, se observa la variación de la ΔG° con la $[\text{GuHCl}]$. El ajuste de estos datos a la Ec. 72 arroja la siguiente recta de regresión:

$$\Delta G^\circ = 23,3 \pm 0,3 + (2,94 \pm 0,05) [\text{GuHCl}], R = 0,9987$$

Por ello, el valor de m es $2,94 \pm 0,05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$, valor un poco inferior al de otras proteínas con masas moleculares similares (Myers *et al.*, 1995). La estabilidad conformacional de la RPTP viene definida por el valor de $\Delta G^\circ (\text{H}_2\text{O})$, a 25°C , y es $23,3 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este dato es bastante próximo al valor obtenido para el ΔG por extrapolación de los parámetros termodinámicos (Fig. 32) de los datos experimentales de la desnaturación térmica registrada por DSC (Tabla XXIV).

Los resultados de ambos estudios de desnaturación, térmica y química, se ajustan perfectamente a un modelo de dos estados, en el que la población de monómeros en estado plegado es despreciable, siendo

los únicos estados significativamente poblados los dímeros plegados y los monómeros en estado desplegado.

5.4.3.1. Equilibrio de sedimentación en presencia de GuHCl 6,0 M

Los datos obtenidos mediante espectroscopia de DC indicaban que la RPTP perdía su estructura secundaria en GuHCl 6,0 M a pH 3,0. En estas condiciones, se realizará un experimento de equilibrio de sedimentación, el cual, no depende de las propiedades hidrodinámicas (forma) de la proteína, tan sólo depende de su masa molecular. Se confirma que, bajo esas condiciones experimentales, no existe ni agregación ni oligomerización proteica en disolución, aunque se observa una pequeña desviación de la idealidad cuando se ajustan los datos a una especie proteica única y simple (Fig. 35B). Se obtiene una única especie proteica con una masa molecular de $44,2 \pm 2,2$ kDa (Fig. 35A).

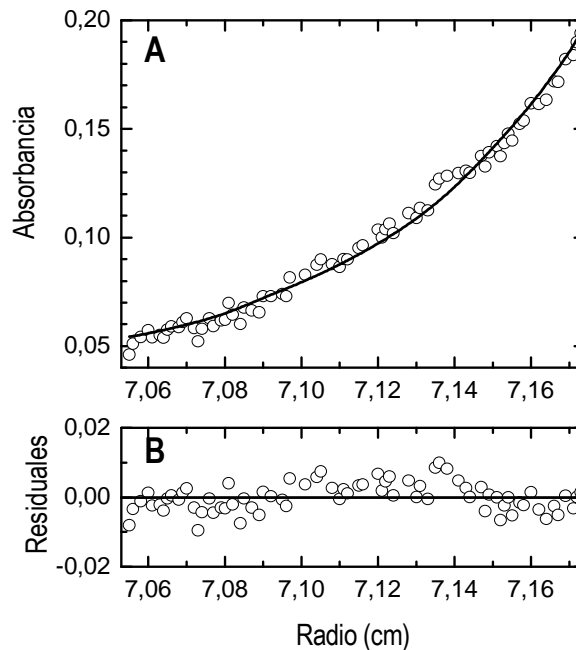


Figura 35. Experimentos de equilibrio de sedimentación. (A) Experimentos de equilibrio de sedimentación con una concentración de proteína de $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ en tampón citrato $20,0 \text{ mM}$, pH 3,0, $6,0 \text{ M}$ de GuHCl y $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La línea continua, a través de los datos experimentales, se obtiene por ajuste a una especie ideal única. (B) Residuales del Gráfico A, diferencia entre los datos experimentales y los datos del ajuste.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que existe un equilibrio entre el dímero en estado nativo (N_2) y el monómero en estado desplegado (U) (Ec. 127).



5.4.4. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA ESTABILIDAD DE LA RPTP

Se registra la actividad enzimática de la peroxidasa de palma real (RPTP) en un intervalo de fuerza iónica 0-5 M, usando NaCl (Fig. 36). Se observa que la enzima a fuerza iónica 5 M retiene un 79% de actividad, presentando su actividad máxima a 0,6 M. Es una proteína muy estable a valores altos de fuerza iónica. Hay que tener en cuenta que una proteína en disolución acuosa puede verse muy afectada por la fuerza iónica del medio. Los efectos son complejos y no predecibles, ya que aunque no hubiera cambios en la estructura tridimensional pueden producirse cambios en la actividad enzimática por alteraciones en los pK_a de los restos aminoácidos implicados en el centro activo. La peroxidasa de palma real retiene un gran porcentaje de su actividad a altos valores de la fuerza iónica. Desconocemos si hay grandes alteraciones en la estructura tridimensional (aunque podemos aventurarnos a decir que no es así). Sin embargo, el centro activo no se modifica notablemente puesto que la enzima retiene gran parte de su actividad. Este hecho es importante, ya que puede ser de gran utilidad en futuras aplicaciones biotecnológicas que requieran condiciones de fuerza iónica elevada.

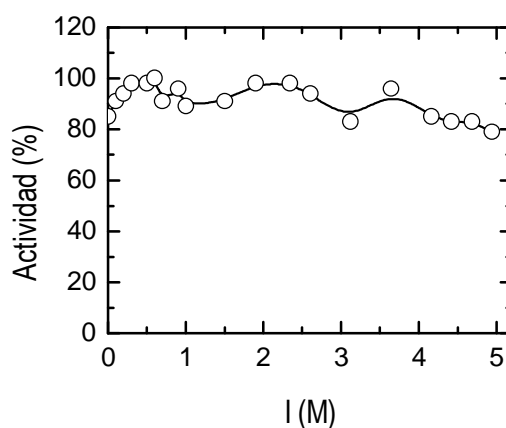


Figura 36. Actividad enzimática total (%) frente a la fuerza iónica. La concentración de proteína usada en los distintos medios de incubación fue de $2,25 \cdot 10^{-7}$ M (225 nM). La actividad se determinó usando guayacol como sustrato.

5.5. MECANISMO CATALÍTICO Y ESTUDIOS CINÉTICOS

5.5.1. ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO

Para realizar este estudio, se han utilizado los siguientes sustratos: guayacol, catecol, ácido ferúlico, pirogallol, o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS. Es bien conocido que las condiciones óptimas catalíticas varían en función de la enzima y de los sustratos utilizados (Sakharov *et al.*, 2002). En primer lugar, se examinó el efecto del pH sobre la actividad catalítica (Tabla XXVI). Para la mayoría de sustratos, la actividad máxima se encuentra entre pH 4,5 y 6,0 (Fig. 37), tan sólo el ABTS y el catecol tienen pH's óptimos fuera de este intervalo. El pirogallol también se encuentra fuera de ese intervalo, pero hay que tener en cuenta, que a pH's muy básicos (pH > 8,5) hay una reacción de oxidación no enzimática que ocurre de modo espontáneo. A partir de pH 6,0 la actividad para este sustrato es muy similar (87-100%). Debido a estos problemas, la casa comercial Sigma recomienda, para medir la actividad peroxidasa con este sustrato, el uso de pH 6,0.

Tabla XXVI. Influencia del pH sobre la actividad de la peroxidasa de palma real (RPTP) con diferentes sustratos.

pH	% Actividad						
	Guayacol	o-dianisidina	o-fenilendiamina	Ácido Ferúlico	Pirogallol	Catecol	ABTS
1,5	-	0	0	0	-	0	-
2,0	2	0	0,5	0	0	9	92
2,5	7	0	1	26	3	32	100
3,0	25	5	2	44	12	55	76
3,5	42	22	11	81	31	100	41
4,0	67	42	36	100	44	82	16
4,5	73	59	67	100	69	50	8
5,0	75	88	100	85	75	41	1
5,5	86	100	89	81	84	36	0,5
6,0	100	93	67	74	87	32	0
6,5	74	69	58	56	94	27	-
7,0	47	56	44	44	97	0	0
7,5	28	20	28	22	100	0	-
8,0	15	9	16	7	97	-	0
8,5	-	5	8	0	97	-	-
9,0	6	2	3	0	-	-	0
9,5	-	0	2	-	-	-	-
10,0	5	0	1	0	-	-	0
11,0	1	0	0	-	-	-	-
12,0	0	0	-	-	-	-	-

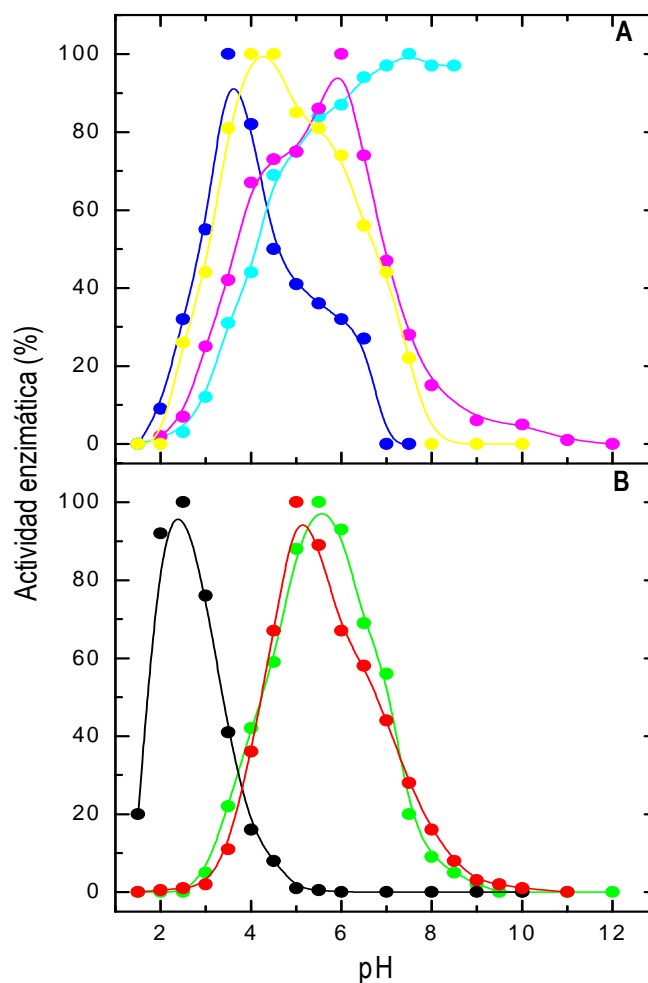


Figura 37. Influencia del pH en la actividad enzimática de RPTP. (A) Sustratos fenólicos: guayacol, ácido ferúlico, pirogallol y catecol. (B) Sustratos no fenólicos: ABTS, o-dianisidina y o-fenilendiamina. En todos los casos se ha trabajado con tampón universal 20,0 mM a TA (25 °C). La concentración de proteína empleada ha variado en función de cada sustrato.

La actividad enzimática también varía en función de la concentración del tampón (Tabla XXVII). Normalmente, la mayor actividad aparece a concentraciones bajas, < 50,0 mM, es lo que ocurre para los sustratos: guayacol, ABTS, pirogallol, ácido ferúlico y o-dianisidina. Sin embargo, el catecol tiene una actividad muy variable en función de la concentración del tampón hasta 150 mM y la o-fenilendiamina tiene su mayor actividad a concentraciones de 200-250 mM. En todos los casos, se trabaja con tampón universal entre 0-500 mM, al pH óptimo de cada sustrato, conocido del estudio previo y 25 °C. La concentración de proteína también depende del sustrato utilizado.

Las variaciones de estos dos factores modifican la naturaleza química de los sustratos, por lo que alteran la estructura química que reacciona con el centro activo de la enzima.

Tabla XXVII. Influencia de la concentración de tampón sobre la actividad de la peroxidasa de palma real (RPTP) con diferentes sustratos.

[Tampón] (mM)	% Actividad						
	Guayacol	o-dianisidina	o-fenilendiamina	Ácido ferúlico	Pirogallol	Catecol	ABTS
0	-	44	27	100	73	85	-
10	94	100	68	94	100	76	100
20	94	100	68	88	73	82	93
30	89	100	77	82	49	85	86
40	100	100	73	76	41	88	76
50	89	100	77	-	32	88	72
60	-	78	79	64	-	88	-
70	-	78	82	-	-	85	55
75	92	-	-	-	26	-	-
80	-	78	79	58	-	85	-
90	-	78	84	-	-	100	-
100	81	67	89	55	19	91	35
125	-	67	89	-	-	-	-
150	83	67	89	52	21	100	35
175	-	67	95	-	-	-	-
200	81	67	95	52	16	82	21
225	-	-	100	-	-	-	-
250	-	67	95	-	-	91	-
300	-	-	93	55	-	-	-
350	-	-	93	-	-	-	-
400	-	-	84	55	-	-	-
450	-	-	-	55	-	-	-
500	-	56	73	55	-	85	-

5.5.2. MECANISMO CATALÍTICO Y CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS k_1 y k_3

5.5.2.1. Determinación del mecanismo catalítico

La facilidad de la reacción de oxidación y la formación de compuestos coloreados son, quizás, dos de las razones por las que la reacción de la peroxidasa con compuestos fenólicos se conozca desde el año 1900. La HRP ha sido una de las pioneras en todos los estudios que han esclarecido las propiedades de este grupo enzimático. Se observa que oxida compuestos fenólicos siguiendo un mecanismo clásico *ping-pong* (Fig. 38A). Las formas enzimáticas intermedias HRP-I y HRP-II se han caracterizado espectroscópicamente y cinéticamente. Se ha estudiado la cinética enzimática de otras peroxidasas: oxidación de guayacol con peroxidasa de nabo (Hoyosa *et al.*, 1960), de ferrocitocromo c con HRP (Santimone, 1975) y con CcP de levadura (Yonetani *et al.*, 1966), entre otras, y se han obtenido los mismos resultados. Existen excepciones a este mecanismo general, que ocurren cuando se usan como sustratos compuestos sulfito o ioduro, los cuales transfieren dos electrones en un único paso, convirtiendo HRP-I en HRP sin formar el compuesto intermedio HRP-II.

En el caso de la peroxidasa de palma real (RPTP) se observa que cataliza la oxidación de una gran variedad de sustratos con peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la cinética de saturación de Michaelis-Menten. Por ello, mediante experimentos cinéticos del estado estacionario, se podrá deducir el mecanismo cinético de la reacción. En un sistema enzimático bi-sustrato, dos mecanismos generales son posibles en la interacción de los sustratos con la enzima (Fig. 38): el mecanismo secuencial (Fig. 38A-C) o el mecanismo *ping-pong* (Fig. 38B). En el mecanismo secuencial, ambos sustratos se combinan con la enzima para formar un compuesto ternario, antes de que ocurra la reacción catalítica. Los sustratos se pueden combinar de forma ordenada o al azar para formar dicho compuesto. Del mismo modo, los productos formados pueden generarse de forma ordenada o al azar. En el mecanismo *ping-pong*, no hay formación de ningún compuesto ternario, el primer sustrato se combina con la enzima para dar lugar a una forma enzimática modificada, generando el primer producto. La enzima modificada interacciona con el segundo sustrato para formar el segundo producto y generar otra forma enzimática distinta de las anteriores, que en una tercera reacción regenerará la enzima en estado nativo. Estos dos mecanismos pueden ser diferenciados por análisis cinéticos del estado estacionario, usando el procedimiento y ecuaciones descritas por Cleland.

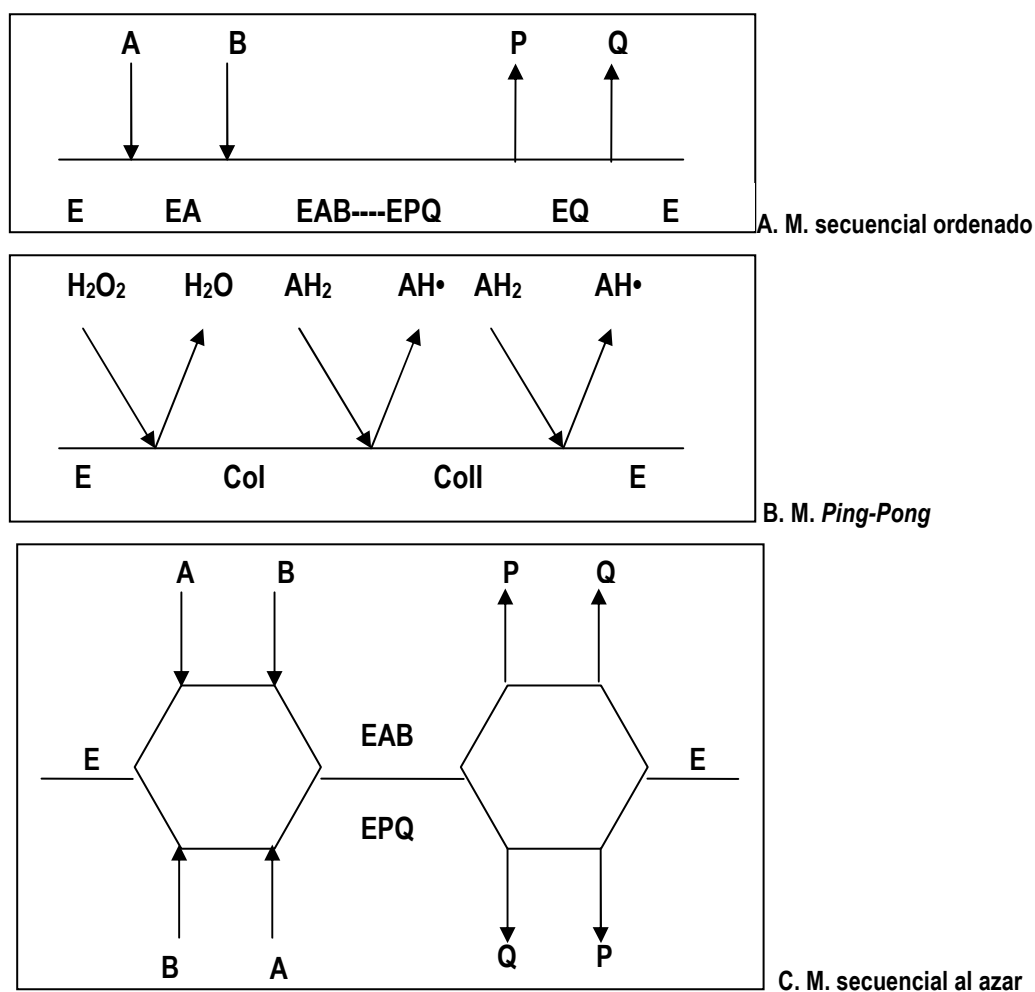


Figura 38. Esquema de los diferentes mecanismos de un sistema enzimático bi-sustrato.

Cuando las concentraciones de sustrato reductor y peróxido de hidrógeno se modifican sistemáticamente en la reacción de oxidación catalizada por la peroxidasa de palma real, los análisis cinéticos de dobles recíprocos ($1/v$ vs $1/S$) generan una serie de líneas rectas paralelas para ambos sustratos. Estos resultados son indicativos de un mecanismo *ping-pong*, en el que están implicadas dos formas enzimáticas independientes. En realidad esto no es del todo cierto, ya que las líneas aparentemente paralelas pueden cortarse lejos del intervalo de trabajo, implicando ello, un mecanismo secuencial. Para asegurarse que realmente la cinética enzimática sigue un mecanismo *ping-pong*, se registra la actividad enzimática en diferentes mezclas de reacción, en las cuales, la relación de concentraciones de ambos sustratos es constante a pH, T y I constante. Si en este estudio, el análisis de dobles recíprocos da lugar a una línea recta, el mecanismo es *ping-pong*, en cambio, si se genera una parábola, es secuencial. En todos los casos, se han generado líneas rectas (Fig. 39), por lo que no cabe duda de que el mecanismo seguido por la peroxidasa de palma real en la reacción de oxidación es un mecanismo *ping-pong*.

Tabla XXVIII. Regresiones lineales $1/v$ versus $1/S$ manteniendo constante la relación de concentraciones de sustratos. Para todos los sustratos, se trabaja en las condiciones óptimas de pH y concentración de tampón obtenidas en el estudio previo, a TA y utilizando en todos los casos tampón universal.

Sustrato	Relación (AH_2 / H_2O_2)	$1/v$ versus $1 / AH_2$ - $1/v$ versus $1 / H_2O_2$	R
Guayacol	$4,015 \pm 0,032$	$y = 130,33 \pm 14,98 + (4948,88 \pm 31,44) x$	R = 0,99986
		$y = 128,45 \pm 13,28 + (1234,99 \pm 6,95) x$	R = 0,99989
Guayacol	$8,021 \pm 0,049$	$y = 148,37 \pm 24,62 + (6033,24 \pm 133,68) x$	R = 0,99880
		$y = 143,90 \pm 25,02 + (758,86 \pm 17,04) x$	R = 0,99774
ABTS	$0,091 \pm 0,001$	$y = 25,16 \pm 13,31 + (0,0082 \pm 0,000285) x$	R = 0,99581
		$y = 24,87 \pm 12,60 + (0,0906 \pm 0,0030) x$	R = 0,99625
Ácido Ferúlico	$0,0500 \pm 0,0004$	$y = 36,80 \pm 4,58 + (11,03 \pm 0,18) x$	R = 0,99834
		$y = 30,68 \pm 3,09 + (225,72 \pm 2,41) x$	R = 0,99937
o-dianisidina	$0,0763 \pm 0,0008$	$y = 264,92 \pm 10,51 + (55,97 \pm 0,93) x$	R = 0,99836
		$y = 266,11 \pm 9,91 + (733,32 \pm 11,49) x$	R = 0,99853
o-fenilendiamina	$0,5020 \pm 0,0004$	$y = 49,25 \pm 4,07 + (140,33 \pm 1,31) x$	R = 0,99939
		$y = 48,82 \pm 4,41 + (279,61 \pm 2,74) x$	R = 0,99937
Catecol	$25,035 \pm 0,004$	$y = -284,62 \pm 14,30 + (21533,06 \pm 136,49) x$	R = 0,99984
		$y = -284,62 \pm 14,30 + (860,10 \pm 5,45) x$	R = 0,99984

Con este sencillo estudio, se comprueba que la peroxidasa de palma real (RPTP) oxida diferentes tipos de sustratos siguiendo un mecanismo *ping-pong*. Existen muchos estudios de catálisis enzimática con diferentes peroxidases, la gran mayoría de ellos concluyen, que el mecanismo que siguen las peroxidases en su proceso de oxidación es un mecanismo *ping-pong* bi-bi.

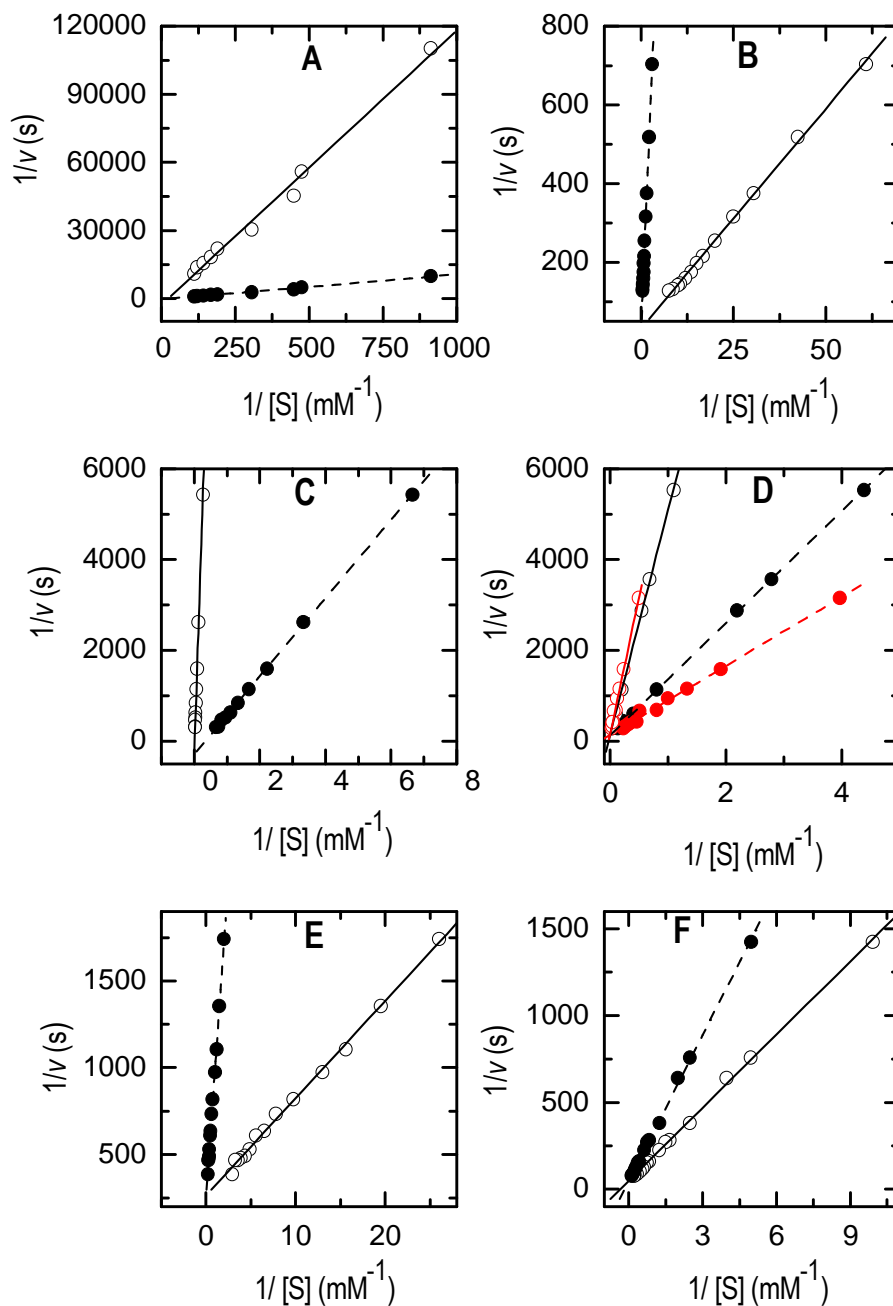


Figura 39. Representaciones gráficas de $1/v$ versus $1/S$ manteniendo constante la relación de concentraciones. Cada uno de los gráficos se corresponde al estudio de un sustrato: (A) ABTS; (B) ácido ferúlico; (C) catecol; (D) guayacol (línea negra relación ~ 4 y línea roja relación ~ 8); (E) o-dianisidina y (F) o-fenilendiamina. En ellos, la línea continua representa $1/v$ versus $1/S$, siendo S la concentración del sustrato reductor, en la discontinua S es la concentración de peróxido de hidrógeno. Las regresiones lineales de cada una de estas series de datos se muestran en la Tabla XXVIII.

5.5.2.2. Cálculo de las constantes microscópicas k_1 y k_3

En primer lugar, se observa la tendencia de la velocidad con la concentración del sustrato variable para cada una de las concentraciones de sustrato constante, ajustándose estos datos a una hipérbola rectangular, que se corresponde con una cinética *michaeliana* (Ec. 83). Al hacer la representación de dobles recíprocos, ésta nos proporciona, en todos los casos, un conjunto de rectas paralelas. Este dato, junto con los resultados del estudio anterior, nos permite concluir que la oxidación de sustratos con la peroxidasa de palma real sigue un mecanismo *ping-pong*. De cada una de estas rectas (Ec. 83), se obtiene un valor de la ordenada en el origen ($1/V$) y un valor de la pendiente (K/V) que proporcionan los valores de los parámetros V y K . Del ajuste lineal de $1/V$ vs $1/S_{cte}$ (Ec. 84), se obtienen los valores de V_{max} y K_m (S_{cte}), y del ajuste, también lineal, de $1/K$ vs $1/S_{cte}$ (Ec. 85) se obtienen los valores de K_m (S_{cte}) y K_m ($S_{variable}$). Los datos experimentales se han ajustado utilizando varias transformaciones lineales de la ecuación cinética de Michaelis-Menten: Lineweaver-Burk, Eddie-Hosftee y Hanes-Woolf (datos no mostrados). Con los resultados de los tres ajustes, se han obtenido los valores de la V_{max} y de las constantes de Michaelis para ambos sustratos. Los datos que se muestran en la Tabla XXIX corresponden al valor medio de los obtenidos por los tres ajustes.

Tabla XXIX. Resultados finales de los estudios cinéticos realizados con diferentes sustratos para la reacción de oxidación catalizada por peroxidasa de palma real (RPTP), utilizando como peróxido H_2O_2 y trabajando a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Sustrato	K_m (H_2O_2) (M)	K_m (AH_2) (M)	V_{max} ($M s^{-1}$)	$[E_0]/$ 10^{-10} (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (H_2O_2) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_m (AH_2) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_1 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_3 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
Guayacol	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$15,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	5,61	$2,1 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	0,33	0,08
ABTS	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$4,9 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	6,05	$3,3 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	1,3	4,8
A.Ferúlico	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	8,91	$5,4 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^8$	1,82	6,96
o-dianisidina	$7,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	2,97	$4,0 \cdot 10^2$	$5,7 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^6$	0,25	1,91
o-fenilendiamina	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$7,8 \cdot 10^{-7}$	10,2	$7,6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5$	0,23	0,26
Catecol	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	35,0	$8,0 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^4$	0,40	0,02

Los valores de las constantes microscópicas que caracterizan la eficiencia de la oxidación enzimática de los diferentes sustratos estudiados con peroxidasa de palma real (RPTP) se muestran en la Tabla XXIX. La reactividad de la enzima con el peróxido de hidrógeno viene determinada por el valor de la constante k_1 . Sin embargo, con el sustrato reductor la determina la constante k_3 . Los sustratos menos reactivos son el guayacol y el catecol, compuestos fenólicos con uno y dos grupos hidróxilo en sus estructuras químicas, respectivamente. Les siguen las aminas aromáticas, o-fenilendiamina y o-dianisidina, que son oxidadas por la enzima a mayor velocidad. Los mejores sustratos para la peroxidasa de palma real, entre los utilizados en

el estudio, son el ABTS y el ácido ferúlico. El alto valor alcanzado por el ABTS no tiene significado biológico, puesto que es un sustrato sintético, pero su alta reactividad nos sirve para explicar por qué es uno de los sustratos más utilizados en kits inmunoenzimáticos (ELISA), cuando se utiliza peroxidasa para la determinación de un gran número de metabolitos (glucosa, ácido úrico, ácidos grasos, etc), puesto que, además, la reacción es intensamente coloreada. En el caso del ácido ferúlico, sustrato natural, es un compuesto que forma parte del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, siendo de ellos el más abundante en la pared celular vegetal. Este se encuentra enlazado covalentemente a polisacáridos, incluyendo glucoarabinosilanos (GAXs) y pectinas, a través de enlaces ésteres. Una proporción considerable del ferulato forma dímeros a través de su anillo aromático o del grupo alifático, resultando en una unión polisacárido-polisacárido y polisacárido-lignina. Esta dimerización es catalizada por peroxidases. La función del ácido ferúlico y diferúlico en las plantas es otorgar rigidez en la estructura y resistencia a la degradación por parte de microorganismos. La alta reactividad con este sustrato puede darnos información sobre la localización subcelular de la enzima. Como el ácido ferúlico participa en la lignificación *in vivo*, existen cantidades de peroxidasa de palma real apreciables en la pared celular. Ello no descarta la presencia de enzima en otras zonas, debido a su punto isoeléctrico ($pI < 7,0$) y a su alta actividad. La enzima se encuentra en cantidades apreciables en el citoplasma celular, participando en un gran número de procesos metabólicos de la planta.

El cálculo de las constantes microscópicas, también, permite afirmar que el mecanismo que sigue la peroxidasa de palma real en su proceso de oxidación con peróxido de hidrógeno es un mecanismo *ping-pong*, en el que los compuestos Col y Coll son los verdaderos intermediarios del ciclo catalítico. Esta observación se debe a que al representar A vs B (Ec. 94 y 95), se generan líneas rectas que pasan por el origen de coordenadas con coeficientes de regresión superiores a 0,99, para variaciones de las concentraciones de ambos sustratos.

Además de conocer los parámetros enzimáticos típicos como son la V_{max} y las constantes de Michaelis para ambos sustratos, también se puede conocer la k_{cat} o número de recambio, el cual indica el número de moles de sustrato transformados por mol de enzima y por unidad de tiempo. Se observa que el sustrato que presenta una mayor constante catalítica es el ácido ferúlico, es decir es el sustrato más reactivo con la peroxidasa de palma real. También se han calculado las constantes de especificidad para ambos sustratos (k_{cat}/K_m). Este parámetro se puede conocer a partir de los valores de la constante catalítica y de las constantes de Michaelis-Menten o partiendo de los datos de las constantes microscópicas (k_1 y k_3). Los datos obtenidos por ambos caminos tienen un coeficiente de variación de $\sim 30\%$. Hay que tener en cuenta que es más fiable calcular este parámetro partiendo de las constantes microscópicas, ya que sus valores son

prácticamente idénticos, con los tres ajustes lineales con los que se ha trabajado. En cambio, si se calcula partiendo del dato de $k_{cat} = V_{max} / [RPTP]_0$, se introduce un mayor error experimental, ya que la V_{max} es un parámetro que varía en gran medida de unos ajustes a otros.

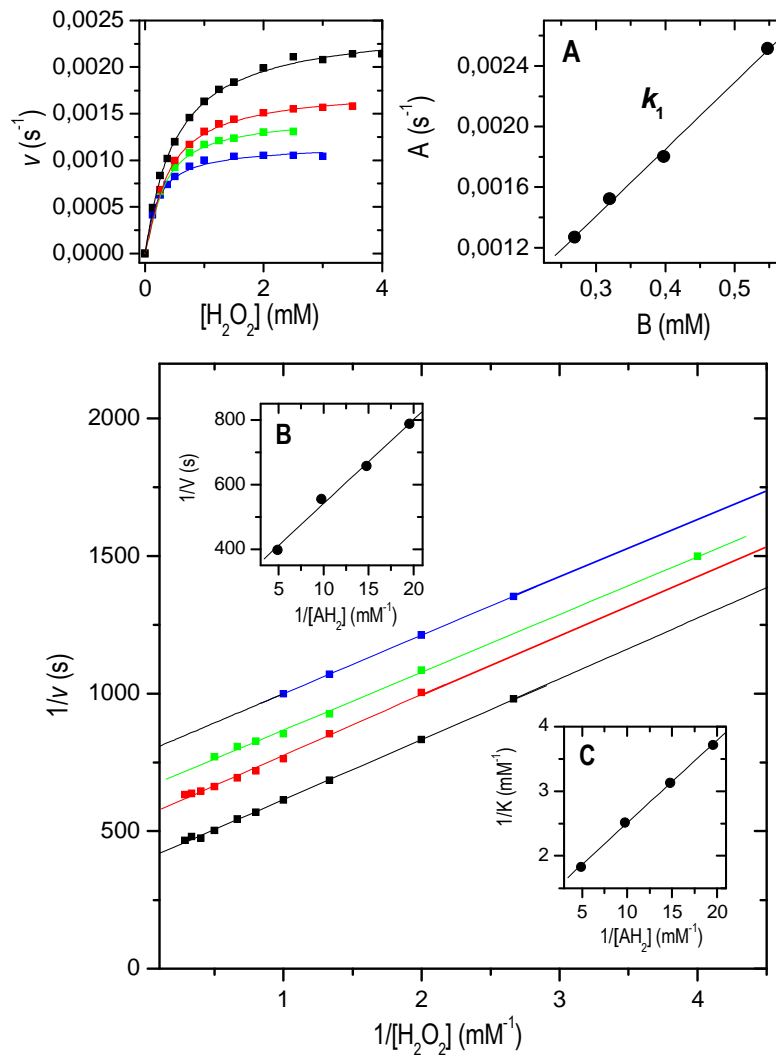


Figura 40. Parámetros cinéticos usando o-dianisidina como sustrato constante. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de sustrato reductor: 0,205, 0,102, 0,068 y 0,051 mM, en tampón citrato 30,0 mM, pH 6,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $2,97 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 7,81E-5 \pm 6,52E-5 + (0,00443 \pm 1,64E-4) x$ ($R = 0,99863$)

(B) $y = 281,27338 \pm 21,12496 + (25,97257 \pm 1,57346) x$ ($R = 0,99635$)

(C) $y = 1,22677 \pm 0,04137 + (0,12805 \pm 0,00308) x$ ($R = 0,99942$)

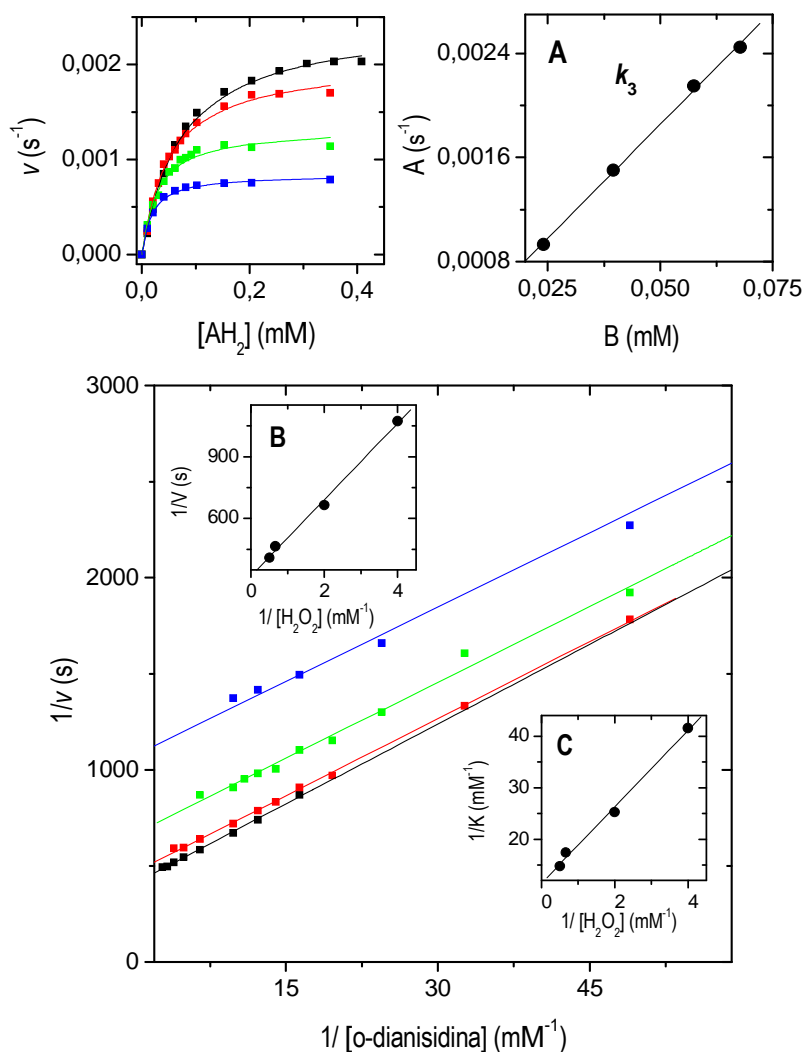


Figura 41. Parámetros cinéticos usando o-dianisidina como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de H_2O_2 : 2,0, 1,0, 0,5 y 0,25 mM, en tampón citrato 30,0 mM, pH 6,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $2,97 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 1,05\text{E-}4 \pm 5,1\text{E-}5 + (0,035 \pm 0,00102) x$ ($R = 0,99915$)

(B) $y = 320,63158 \pm 20,36681 + (185,50988 \pm 8,95438) x$ ($R = 0,99768$)

(C) $y = 11,42855 \pm 0,89585 + (7,4356 \pm 0,39387) x$ ($R = 0,99721$)

En las Fig. 40 y 41 se muestran los tratamientos de los datos experimentales seguidos para determinar el valor de las constantes k_1 y k_3 , para el sustrato o-dianisidina. El tratamiento gráfico para el resto de los sustratos se muestra en el Apéndice II: o-fenilendiamina (Fig. 42, 43), ácido ferúlico (Fig. 44, 45), guayacol (Fig. 46, 47), ABTS (Fig. 48, 49) y catecol (Fig. 50, 51).

5.5.3. ESTUDIO DE INHIBICIÓN COMPETITIVA POR EL SUSTRATO

Una de las principales características de una reacción que sigue un mecanismo *ping-pong* es la existencia de un proceso de inhibición competitiva por sustrato, para ambos sustratos. Este fenómeno se observa en la reacción de oxidación del sustrato ácido ferúlico con peroxidasa de palma real (RPTP) y peróxido de hidrógeno, observándose tanto para el sustrato reductor como para el peróxido. Este fenómeno es muy frecuente en las reacciones de oxidación con peroxidasas, entre otras la reacción de desmetilación catalizada por cloroperoxidasa (Kedderis *et al.*, 1983). En un proceso de inhibición competitiva el I y el S compiten por el mismo centro activo de la enzima, el inhibidor suele ser un isómero del sustrato, excluyendo a éste del centro activo enzimático. Por ello, la enzima se puede unir al inhibidor o al sustrato, de modo que, sólo el complejo ES puede evolucionar a la formación de productos. En una inhibición de tipo competitivo pura, la V_{max} es la misma y lo que se modifica es el valor de la constante de Michaelis, generándose una K_{map} para cada concentración de inhibidor (Ec. 127). La constante de inhibición (K_i) suele ser del mismo orden de magnitud que las constantes de Michaelis y se define como la constante de disociación del complejo EI.

$$K_{map} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (127)$$

Para diferentes concentraciones de inhibidor, se han verificado las hipérbolas de saturación de Michaelis-Menten y, al hacer las representaciones de los dobles inversos, se han obtenido un conjunto de líneas rectas que tienen la misma ordenada en el origen y pendientes crecientes a menor concentración de inhibidor (Fig. 52). Siguiendo el tratamiento matemático de la inhibición competitiva por sustrato para un sistema que sigue un mecanismo *ping-pong* (Ec. 86-90), se puede calcular la constante de inhibición para ambos sustratos al representar K/V vs I (Fig. 52-Gráficos Interiores). Estos valores son:

$$K_i (\text{H}_2\text{O}_2) = (1,24 \pm 0,4) \cdot 10^{-3} \text{ M} \text{ y } K_i (\text{Ácido ferúlico}) = (2,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ M}.$$

La inhibición competitiva por el sustrato reductor se debe al enlace del sustrato con una forma enzimática incorrecta, generando un compuesto binario ES que aborta la reacción. Cuando el inhibidor es el hidroperóxido, lo que ocurre es que el Col reacciona de nuevo con el hidroperóxido a altas concentraciones del mismo, generando O_2 en el medio de reacción, en vez de reaccionar con el sustrato reductor.

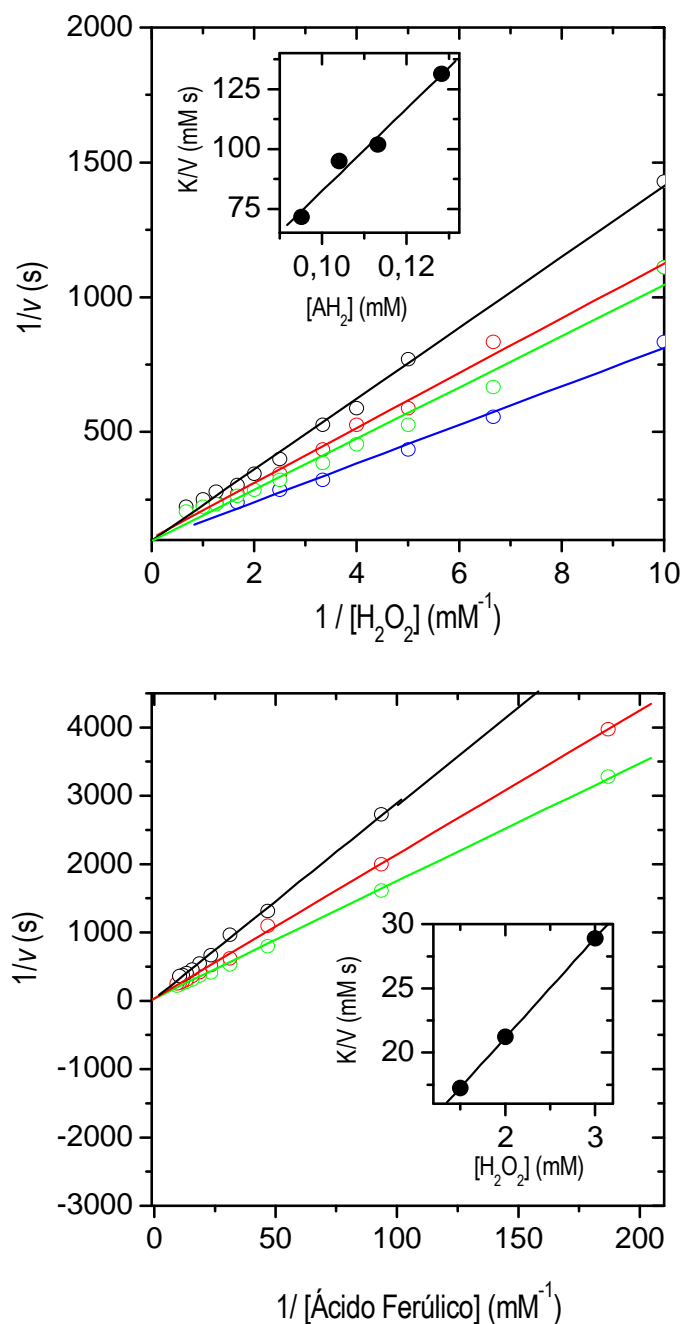


Figura 52. Estudio cinético de la inhibición competitiva por sustrato usando ácido ferúlico. En el gráfico superior, se trabaja a cuatro concentraciones inhibitorias de sustrato reductor: 0,095, 0,104, 0,113 y 0,128 mM. En el inferior, a tres concentraciones inhibitorias de peróxido de hidrógeno: 1,5, 2,0 y 3,0 mM. Se trabaja en tampón citrato 10,0 mM, pH 4,0 y 25 °C, con una concentración de RPTP $8,91 \cdot 10^{-10}$ M. Los gráficos interiores dan lugar a rectas de regresión con coeficientes $R > 0,98$.

5.5.4. INACTIVACIÓN POR SUSTRATO SUICIDA

5.5.4.1. Sensibilidad enzimática al sustrato suicida

La incubación de la enzima con diferentes relaciones $[H_2O_2]/[RPTP]$ durante 24 h, seguida de la determinación de su actividad residual, permite conocer el valor de la sensibilidad de la enzima al inhibidor, sensibilidad relacionada directamente con el número de recambio r (Ec. 101).

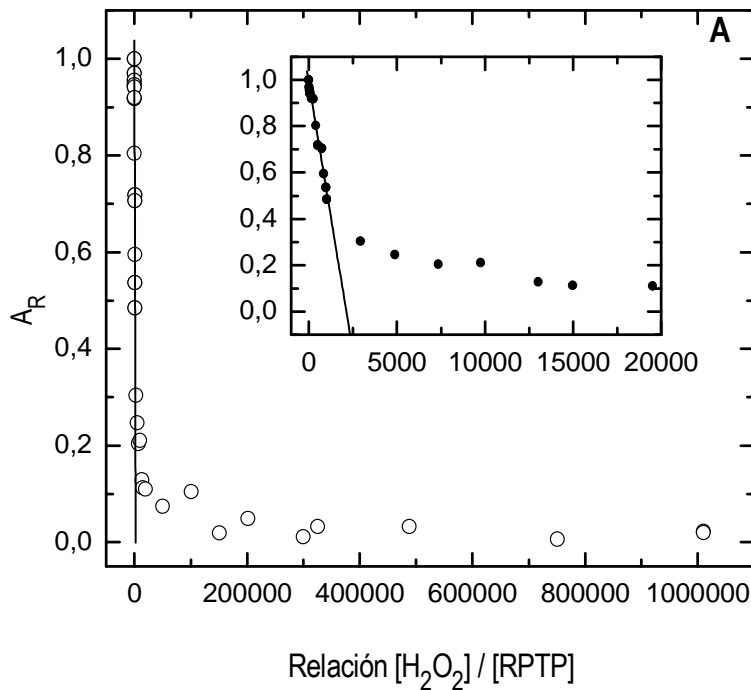


Figura 53. Sensibilidad a la inactivación de la peroxidasa de palma real (RPTP) con diferentes relaciones $[H_2O_2]/[RPTP]$. La actividad residual se midió pasadas 24 h de incubación, en 2 ml de mezcla de reacción, en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5 con una concentración fija de enzima (136,0 nM).

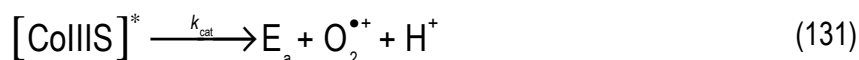
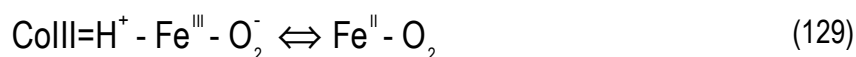
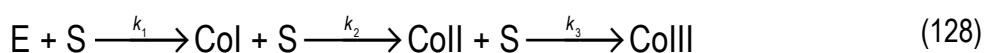
Se comprueba que, al representar el valor de la actividad residual a 24 h frente a la relación $[H_2O_2]/[RPTP]$, la tendencia no es siempre lineal. Con valores de relaciones $[H_2O_2]/[RPTP] < 1000$, la tendencia es lineal pero, cuando la relación aumenta, se pierde esta linealidad. La linealidad se pierde cuando la actividad residual llega al 45-50% (Fig. 53). Este dato difiere notablemente de los de estudios realizados con otras peroxididasas vegetales, posiblemente debido a que la peroxidasa de palma en disolución es una enzima dimérica. Así, en el caso concreto de la peroxidasa de rábano (Hiner *et al.*, 1995), la enzima nativa y la desglicosilada pierden la linealidad cuando la actividad residual alcanza el 5 y el 20%, respectivamente, lo cual implicaría un cambio en el mecanismo de inactivación o la presencia de una forma inactiva de bajo ΔG que se encuentra en equilibrio lento con la forma activa Col (Sanders *et al.*, 1994).

El ajuste de regresión en la zona lineal arroja la siguiente ecuación:

$$y = 0,99017 \pm 0,01136 - (4,63972 \cdot 10^{-4} \pm 2,10938 \cdot 10^{-5}) x \quad (R = -0,99002)$$

de donde se puede obtener el valor de r , que es 2154 ± 97 .

El mecanismo de inactivación de la peroxidasa de palma real (RPTP) con peróxido de hidrógeno transcurre del siguiente modo: estudios espectroscópicos previos han revelado que la peroxidasa de palma cuando se expone a excesos de peróxido superiores a 500 forma rápidamente (en menos de 1 min) el denominado ColIII, un híbrido de resonancia donde el Fe hémico tiene un estado de oxidación III, y está unido a una molécula de oxígeno. Será este compuesto de formación rápida el que podrá avanzar a través de dos caminos, la inhibición o el camino catalítico que genere una serie de compuestos capaces de proteger parte de la integridad de la peroxidasa y retener su actividad catalítica. Así, el mecanismo más sencillo propuesto se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 7. Mecanismo propuesto para la inactivación de la peroxidasa de palma real (RPTP) con peróxido de hidrógeno.

donde E es la enzima nativa, S es el peróxido de hidrógeno, Col, Coll y ColIII son formas enzimáticas modificadas debido a la existencia en el medio de grandes concentraciones de peróxido de hidrógeno. A nivel cinético la Ec. 129 no se tendrá en cuenta, puesto que dicha etapa es mucho más rápida que los procesos de inactivación o catálisis. Cuando se forma el ColIII, éste reaccionará de nuevo con una molécula de peróxido de hidrógeno, formándose un estado de transición de este nuevo compuesto (Ec. 130), encontrándose la enzima en este estado hasta que toda ella se haya inactivado. El estado de transición puede dar lugar a una inactivación enzimática (E_i) (Ec. 132), o a un proceso de protección que genere una mezcla de productos, entre los que se encuentra la enzima activa (E_a) (Ec. 131).

5.5.4.2. Cinética de inactivación

Una disolución de RPTP, de concentración 136 nM en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5 a 25 °C, se inactiva con peróxido de hidrógeno entre 0 y 400 mM, midiéndose la actividad peroxidasa en alícuotas sustraídas de la mezcla de reacción a distintos tiempos, usando guayacol como sustrato reductor. Se observa que todas las cinéticas de inactivación de la RPTP (Fig. 54) se ajustan bien a una ecuación suma de exponenciales decrecientes de cuatro parámetros (Ec. 133).

$$y = ae^{-bx} + ce^{-dx} \quad (133)$$

Si se representan, a continuación, los valores de los parámetros b y d con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno, se obtiene una curva hipérbolica, lo que indica que el proceso de inactivación sigue una cinética de saturación en ambos casos. Del correspondiente ajuste de los datos a la Ec. 134, se calcula la k_i^{ap} y la K_i^{ap} , siendo ésta la constante de disociación del compuesto enzima-inhibidor. Se observa que los valores de los parámetros d son tres órdenes de magnitud inferiores a los de los parámetros b. Ambos parámetros dependen de la concentración de peróxido de hidrógeno, a diferencia de lo que ocurre con la peroxidasa de rábano, para la que el valor del parámetro d es independiente de dicha concentración (Hiner *et al.*, 1995).

$$k_{observada} = \frac{k_i^{ap} [H_2O_2]}{K_i^{ap} + [H_2O_2]} \quad (134)$$

Tabla XXX. Parámetros de ajuste de las cinéticas de inactivación de la RPTP con peróxido de hidrógeno a la función $y = ae^{-bx} + ce^{-dx}$. Todos los datos van acompañados del error estándar y del coeficiente de correlación del ajuste. Han sido obtenidos con el programa SigmaPlot 10,0.

[H ₂ O ₂] (mM)	[H ₂ O ₂] /[RPTP]	a ± Error estándar	b ± Error estándar	c ± Error estándar	d ± Error estándar	R
1,4	9,93 · 10 ³	46,8393 ± 3,5152	-0,001 ± 2,5 · 10 ⁻⁴	51,5365 ± 4,5362	-0,0009 ± 1,1 · 10 ⁻⁴	0,9927
14,0	9,93 · 10 ⁴	11,8602 ± 1,2664	-1,4664 ± 0,4457	88,1316 ± 0,4624	-0,0010 ± 3,6673 · 10 ⁻⁵	0,9953
30,0	2,02 · 10 ⁵	24,1476 ± 2,3175	-2,6556 ± 1,1413	75,8524 ± 0,7825	-0,0021 ± 9,82873 · 10 ⁻⁵	0,9924
39,4	3,00 · 10 ⁵	40,9165 ± 2,6080	-3,5225 ± 0,9711	59,8036 ± 1,1259	-0,0033 ± 0,0003	0,9916
134,6	1,01 · 10 ⁶	34,6687 ± 3,4095	-4,5213 ± 2,9557	65,3313 ± 1,7055	-0,0061 ± 0,0005	0,9920
393,6	2,99 · 10 ⁶	37,0707 ± 3,2965	-4,6001 ± 1,6486	62,9293 ± 1,7101	-0,0068 ± 0,0005	0,9946

A partir de los datos obtenidos de las hipérbolas de saturación, se puede conocer: la constante de velocidad catalítica aparente (k_{cat}^{ap}) (Ec. 135), la afinidad de la enzima por el inhibidor ($1/K_i^{ap}$) y las eficiencias de los procesos catalítico e inhibitorio, (k_{cat}^{ap}/K_i^{ap}) y (k_i^{ap}/K_i^{ap}), respectivamente (Tabla XXXI).

$$r = \frac{k_{\text{cat}}^{\text{ap}}}{k_i^{\text{ap}}} \quad (135)$$

Tabla XXXI. Constantes cinéticas aparentes para la inactivación de la peroxidasa de palma real con peróxido de hidrógeno. Se muestran los valores de estas constantes para las cinéticas rápida y lenta del proceso de inactivación.

Cinética	k_i^{ap} (s ⁻¹)	K_i^{ap} (mM)	r	$k_{\text{cat}}^{\text{ap}}$ (s ⁻¹)	$1/K_i^{\text{ap}}$ (mM ⁻¹)	$k_{\text{cat}}^{\text{ap}}/K_i^{\text{ap}}$ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	$k_i^{\text{ap}}/K_i^{\text{ap}}$ (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Rápida	0,086 ± 0,005	25,63 ± 5,33	2154 ± 97	185,2	0,039	7,23	3,36 · 10 ⁻³
Lenta	0,0083 ± 0,0006	66,03 ± 13,57	2154 ± 97	17,9	0,015	0,27	1,26 · 10 ⁻⁴

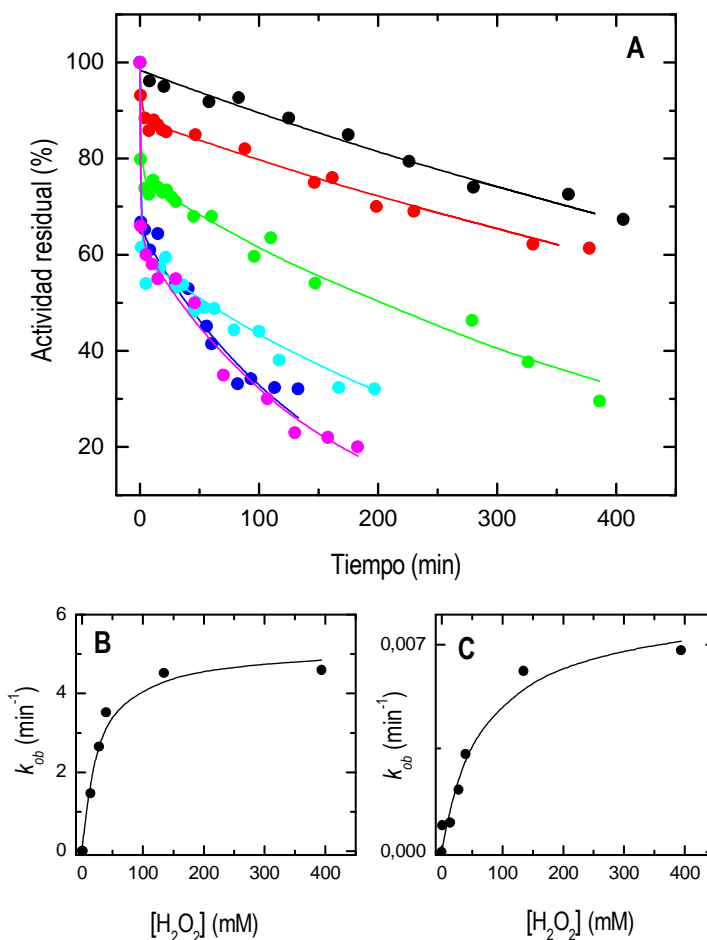


Figura 54. (A) Cinéticas de inactivación de la peroxidasa de palma real (136 nM) con peróxido de hidrógeno: 1,4 (negro), 14,0 (rojo), 28,0 (verde), 39,4 (azul claro), 134,6 (azul oscuro) y 393,6 mM (rosa), en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5 y 25 °C. Se muestran los puntos experimentales y la línea de ajuste a la Ec. 133. Los datos de estos ajustes se muestran en la Tabla XXX. (B) Curva de saturación obtenida al representar el valor de b frente a la concentración de peróxido de hidrógeno. De esta hipérbola, se puede obtener los valores de la k_{inact} y de la constante de disociación K_i aparentes para la zona cinética rápida. (C) Curva de saturación obtenida al representar el valor de d contra la concentración de peróxido de hidrógeno. De esta hipérbola, se puede obtener los valores de la k_{inact} y de la constante de disociación K_i aparentes para la zona cinética lenta.

Las peroxidasas de clase I, II y III, estudiadas hasta la fecha, sufren inactivación suicida por H₂O₂ en ausencia de sustratos reductores. Las cinéticas de inactivación tienen perfiles que difieren de unas a otras enzimas. La inactivación de la RPTP por el peróxido de hidrógeno, presenta una zona de inactivación rápida, bastante corta en el tiempo (10-15 min), seguida de una inactivación lenta pero mucho más duradera. Este mismo comportamiento se observa en la inactivación por el mismo sustrato de la peroxidasa de melón (Rodríguez-López *et al.*, 2000). El resto de peroxidasas estudiadas hasta el momento presentan comportamientos diferentes (Hiner *et al.*, 1995).

5.6. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LA RPTP

5.6.1. EFECTO DEL pH EN EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN PROTEICO

Un parámetro indicativo de la pureza de una muestra proteica es su espectro de absorción electrónica. Las peroxidasas son unas enzimas que, cuando poseen un grado de pureza superior al 98%, presentan un espectro de absorción característico. La banda Soret (403 nm), característica del grupo hemo, suele tener una absorbancia tres veces superior a la de la banda proteica característica de los aminoácidos aromáticos (280 nm). En la Fig. 55A, la línea de color negro, corresponde al espectro de la RPTP obtenida directamente de la última etapa del proceso de purificación, siendo el valor del factor $R_z = A_{403}/A_{280} \sim 3,0$, lo que indica que la proteína tiene un grado de pureza superior al 98%.

En la Fig. 55 podemos ver los espectros de la peroxidasa de palma real (RPTP) en función del pH: el Gráfico A muestra la evolución del espectro en la zona ácida y el B en la zona básica. La RPTP en estado nativo presenta el espectro característico de las peroxidasas de clase III: una banda Soret a 403 nm y dos bandas de absorción denominadas α y β , que aparecen a 485-490 y 630-635 nm, respectivamente.

La modificación ácida del pH hace que la banda Soret se desplace hacia mayores longitudes de onda y aumente en intensidad entre pH 6,0 y 1,5. A partir de este valor, debido a la desnaturalización proteica y a la pérdida del grupo hemo, la absorbancia empieza a descender. A pH < 1,0, la absorbancia a 403 nm se reduce notablemente convirtiéndose esta banda en dos máximos ligeros a 370 y 430-435 nm (Fig. 56A). Las bandas α y β también evolucionan con la modificación del pH, entre pH 6,0 y 1,3, manteniéndose los hombros en el mismo lugar pero reduciéndose ligeramente su intensidad. Es a pH < 1,3 cuando se desplazan y aparecen dos máximos a 565 y 665 nm que crecen en intensidad (Fig. 56B).

La modificación básica del pH hace que la banda Soret permanezca inalterada entre pH 6,0 y 9,0, siendo entre pH 9,0 y 12,0 cuando esta banda se desplaza a mayores longitudes de onda y aumenta su

intensidad. A partir de pH 12,0, esta banda reduce su intensidad hasta que a pH cercano a 13,5 desaparece por la pérdida del grupo hemo, convirtiéndose en dos máximos ligeros a 354 y 395 nm (Fig. 56C). Las bandas α y β también cambian con la modificación del pH hacia zonas básicas: entre pH 6,0 y 9,0 no sufren ninguna alteración, siendo a partir de pH 9,0 cuando la banda β de 630-635 nm reduce su intensidad, llegando a desaparecer. Lo mismo le ocurre a la banda α , a pH > 9,0 se desplaza a mayores longitudes de onda y genera dos nuevos máximos claramente diferenciados a 539 y 576 nm, aumentando su intensidad y contorno a medida que aumenta el pH. Esto ocurre hasta pH 13,0, donde este nuevo hombro desaparece y se genera un máximo muy ligero a 609 nm. Como ocurriera en la zona fuertemente ácida, ésto se debe a la desnaturalización proteica (Fig. 56D). A pH 10,0, aparece un ligero hombro a 350-355 nm que se va intensificando con el aumento de pH (Fig. 56B).

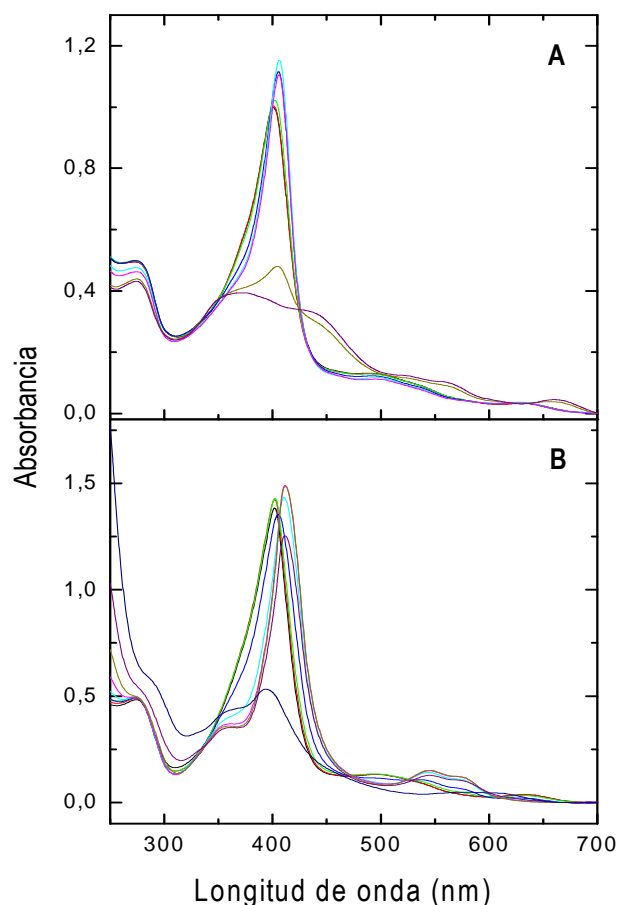


Figura 55. Variación del espectro de absorción electrónica de la peroxidasa de palma real (RPTP) con el pH. (A) efecto del pH ácido: 6,0 (negra), 4,5 (roja), 3,5 (verde), 2,5 (azul), 1,9 (azul cielo), 1,3 (magenta), 1,0 (amarillo oscuro) y 0,6 (violeta). (B) efecto del pH básico: 5,3 (negra), 7,2 (roja), 8,1 (verde), 9,1 (azul), 10,1 (azul cielo), 11,0 (amarillo oscuro), 12,0 (magenta), 13,0 (violeta) y 13,5 (granate).

Tabla XXXII. Características espectrales de las formas nativa, ácida y básica de la peroxidasa de palma real (RPTP) a TA.

Estado proteico	Picos	Hombros
Nativa (pH = 6,0)	403 (banda Soret)	485-490
		535
		635-640
Ácida (pH = 2,0)	406 (banda Soret)	485-505
		625-630
Básica (pH = 12,0)	412 (banda Soret)	539
		576
		355-360

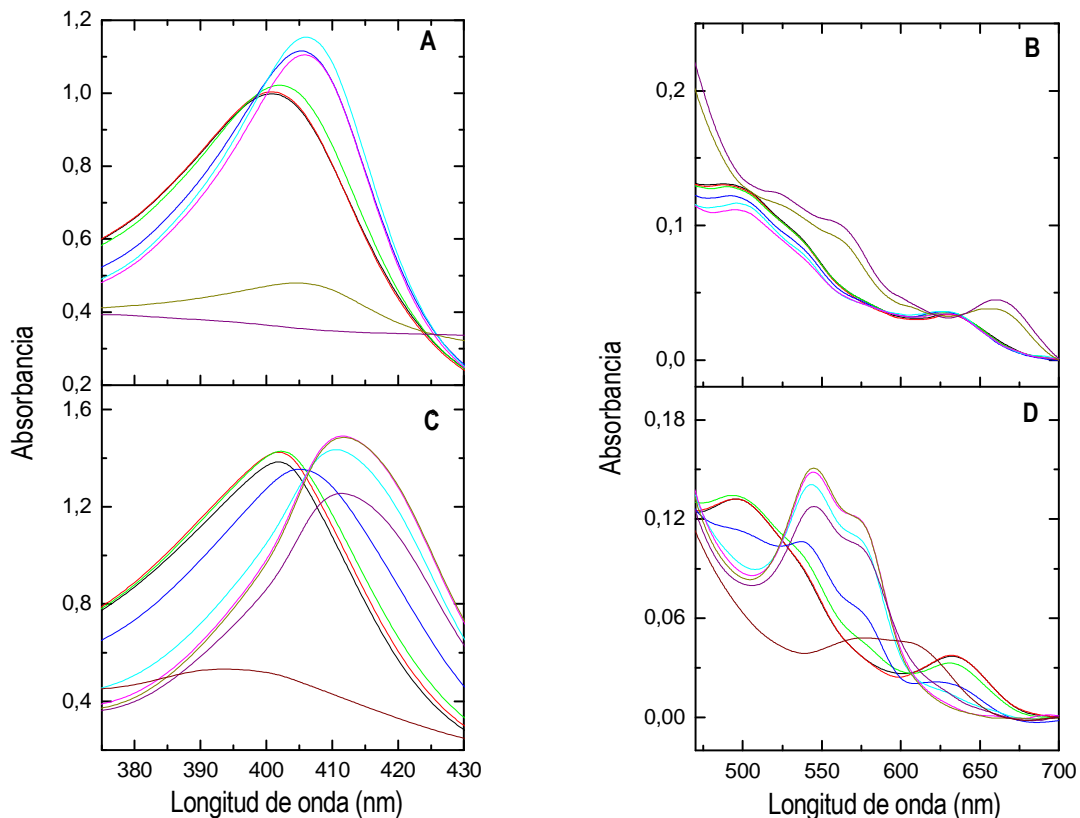


Figura 56. Variación de distintas zonas de los espectros de absorción electrónica de la peroxidasa de palma real (RPTP) con el pH. (A) Banda Soret y (B) zona de hombros, se muestra la variación con el pH ácido. (C) Banda Soret y (D) zona de hombros, se muestra la variación con el pH básico. Cada pH viene representado por un color, la equivalencia se puede ver en la leyenda de la Fig. 55.

Los valores del pK_a de la transición espectral son aproximadamente 3,0 y 9,2 (Fig. 57). Han sido obtenidos ajustando los datos experimentales a una curva sigmoïdal. El valor del pK_a obtenido mediante la variación de la absorbancia a 415 nm con el pH es bastante fiable (zona básica), en cambio la determinación precisa del valor del pK_a en la zona ácida (variación de la absorbancia a 403 nm con el pH) no es posible, debido a la inestabilidad y consecutiva pérdida del grupo hemo a bajos valores de pH. El valor de los pK_a 's nos da información de los aminoácidos que forman parte del centro activo de la enzima.

Después de realizar un análisis detallado de los espectros de absorción, se puede concluir que en la transición alcalina el grupo hemo de la enzima pasa a ser hexacoordinado de bajo spín, debido a que un sexto ligando (OH^-) se enlaza mediante enlace de hidrógeno a una arginina distal o mediante una molécula de agua a una histidina distal. La transición alcalina de la peroxidasa de palma, al igual que la de otras peroxidases de plantas, consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno de una molécula de agua de la cavidad distal con la consiguiente unión del grupo OH^- al hierro hémico, en lugar de que ocurra una desprotonación de la cadena lateral de un aminoácido. Este hecho también se observa en la transición alcalina de la peroxidasa de soja (Nissum *et al.*, 2001). La titulación alcalina genera un perfil espectral que coincide con el de una peroxidasa reducida con CO, llamada complejo CO de la enzima ferrosa.

La transición ácida indica que el grupo hemo pasa a ser hexacoordinado de alto spin con una molécula de agua como sexto ligando. La localización de la banda Soret a pH ácido para esta peroxidasa coincide con la de la SBP (Nissum *et al.*, 2001), la metmioglobina y la cHRP (Smulevich *et al.*, 1997).

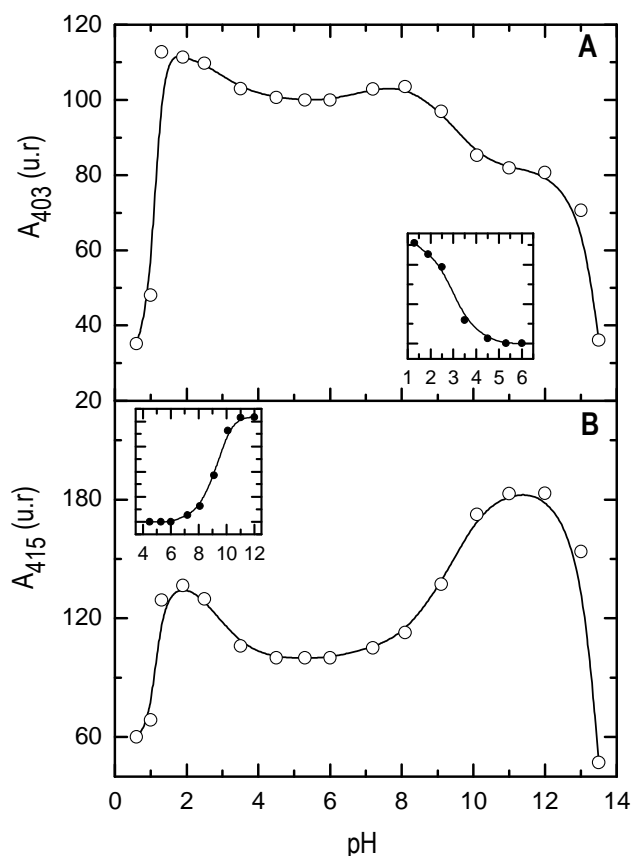


Figura 57. Variaciones de las absorbancias a 403 nm (A) y 415 nm (B) de la peroxidasa de palma real (RPTP) con el pH. Los gráficos interiores muestran ampliaciones de la zona ácida (A) y básica (B). Los valores de pK_a , son 3,0 y 9,2.

5.6.2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS COMPUESTOS I, II Y III DE LA RPTP

El espectro de absorción en el UV-Visible de la peroxidasa de palma real (RPTP) en estado nativo a pH 6,5 presenta las bandas características de cualquier peroxidasa de clase III: banda Soret a 403 nm, en la zona visible aparece un hombro entre 495-540 y una banda a 630 nm. Estas bandas aparecen en la peroxidasa de soja (Nissum *et al.*, 2001), la peroxidasa aniónica de tabaco (Gazaryan *et al.*, 1996), diferentes isoenzimas de peroxidasa de tomate (Evans, 1970), la ascorbato peroxidasa citosólica de guisante (Marquez *et al.*, 1996), la peroxidasa de hojas de té (Kvaratskhelia *et al.*, 1997), entre otras peroxidases de clase III. Entre ellas, puede haber alguna diferencia en el máximo de la banda Soret, que puede oscilar entre 402-408 nm, pero las bandas en la zona visible, indicativas del estado de oxidación y coordinación del hierro hémico en el centro activo, no varían, es decir el metal tiene un estado de oxidación III y está pentacoordinado.

5.6.2.1. Características espectroscópicas del ColIII

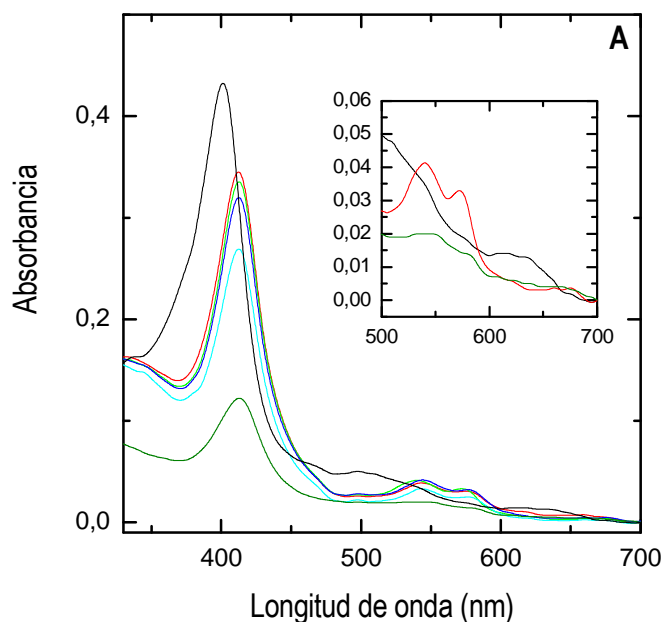
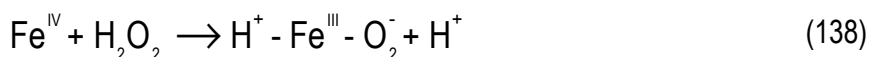
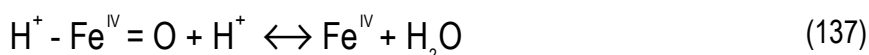
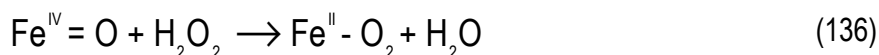


Figura 58. Evolución del ColIII de la RPTP con el tiempo. La línea negra corresponde al espectro de la proteína en estado nativo. El resto indica la evolución del ColIII durante 24 h: línea roja (1 min), verde (8 min), azul oscuro (15 min), azul claro (45 min) y verde oliva (24 h). El gráfico interno es una ampliación de una zona visible del espectro (500-700 nm) donde se observan dos de las bandas características del ColIII: 541 y 576 nm.

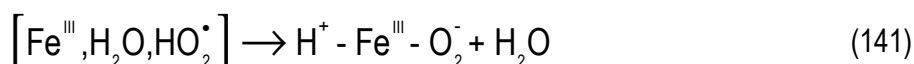
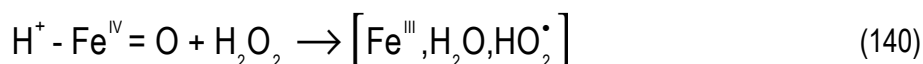
El ColIII de una peroxidasa se consigue sometiendo a la enzima a grandes excesos de peróxido de hidrógeno (~ 500). En menos de 1 min, aparecen las bandas características de este compuesto. La banda

Soret se desplaza a 413 nm y aparecen dos máximos en la zona visible a 541 y 576 nm. La intensidad de la nueva banda Soret se reduce un 25% con respecto a la de la enzima nativa en 1 min y sigue disminuyendo con el tiempo. El Coll es bastante estable con el tiempo, se mantiene íntegro durante 120 min, reteniendo el 36% de la actividad enzimática inicial. Pasadas 24 h, la intensidad de la banda Soret se ha reducido casi un 75% y las bandas características de este compuesto en la zona visible prácticamente no se aprecian.

El Coll se forma por exceso de peróxido de hidrógeno, su formación puede ocurrir a través de dos mecanismos los cuales operan simultáneamente. En el Coll, el hierro hémico se encuentra unido a un átomo de oxígeno, sin embargo en el Coll se encuentra unido a una molécula de oxígeno (Ec. 136). El primer mecanismo consiste en hacer un intercambio disociativo del oxígeno del grupo ferrilo por agua y, posteriormente, el hierro hémico vuelve a reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar el Coll. Se forma un híbrido de resonancia, donde predomina la forma Fe(III)-superóxido (Ec. 137-139).



En el otro mecanismo, se forma un complejo enzimático intermedio que contiene agua y el superóxido formado, el cual se reestructura eliminando la molécula de agua y generando el Coll (Ec. 140, 141).



5.6.2.2. Características espectroscópicas del Coll

El Coll de la peroxidasa de palma real se consigue adicionando sobre la disolución proteica peróxido de hidrógeno en exceso de ~ 4. Durante el primer min de reacción, se observa la aparición de las bandas características del Coll: hombro a 370 nm, banda Soret a 413 nm, y hombros en la zona visible a 525-565 y 650-660 nm. A medida que pasa el tiempo, la banda Soret se sigue desplazando hasta 415 nm y aumenta su intensidad, marcándose también más el hombro a 370 nm, mientras que el hombro entre 520-550 nm se va diferenciando claramente en dos máximos a 525 y 553 nm y el hombro de 650-660 nm termina por desaparecer. Todo ello ocurre en aproximadamente 8 min, tiempo en el que se tiene perfectamente definido

el Coll. A medida que transcurre el tiempo, el proceso se invierte, es decir el Coll evoluciona de nuevo a la forma nativa, ocurriendo esto en aproximadamente 80 min.

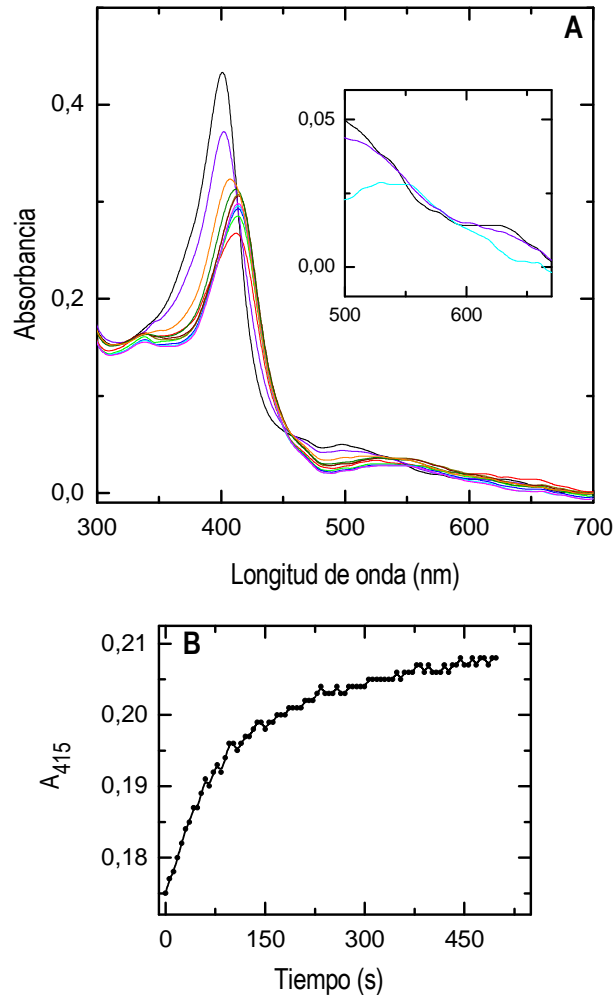


Figura 59. (A) Evolución del Coll de la RPTP con el tiempo. La línea negra corresponde al espectro de la proteína en estado nativo. El resto indica la evolución del Coll: línea roja (1 min), verde (2,7 min), azul oscuro (5 min), azul claro (7,5 min), magenta (10 min), amarillo oscuro (15 min), color vino (20 min), verde oliva (30 min), naranja (40 min) y violeta (80 min). El gráfico interno es una ampliación de una zona visible del espectro (500-700 nm) donde se observan dos de las bandas características del Coll: 525 y 553 nm, y la recuperación de la forma nativa en esta zona del espectro. **(B) Variación de la absorbancia de la RPTP a 415 nm con el tiempo.**

La velocidad de formación del compuesto II se puede determinar mediante la evolución de la banda Soret (415 nm) de este compuesto con el tiempo. Se observa que la tendencia de la absorbancia a 415 nm con el tiempo se ajusta muy bien a una exponencial decreciente de primer orden (Ec. 140) (Fig. 59B).

$$y = y_0 + A_1 \exp^{-[(x - x_0) / t_1]} \quad (140)$$

El ajuste arroja el siguiente resultado:

$$y_0 = 0,20722 \pm 0,0002, x_0 = 0 \pm 0, A_1 = -0,0309 \pm 0,00036 \text{ y } t_1 = 113,47066 \pm 3,19449$$

de donde se calcula el valor de la constante de formación del Col ($k = 1/t_1$). La constante tiene un valor de $(8,81 \pm 0,26) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Si se la compara con el valor de la constante de formación del mismo compuesto para otras peroxididasas de plantas superiores, se observa que es casi 50 veces superior a la constante de formación del Col de la peroxidasa de soja ($2,02 \pm 0,05 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (Nissum *et al.*, 2001).

5.6.2.3. Características espectroscópicas del Col

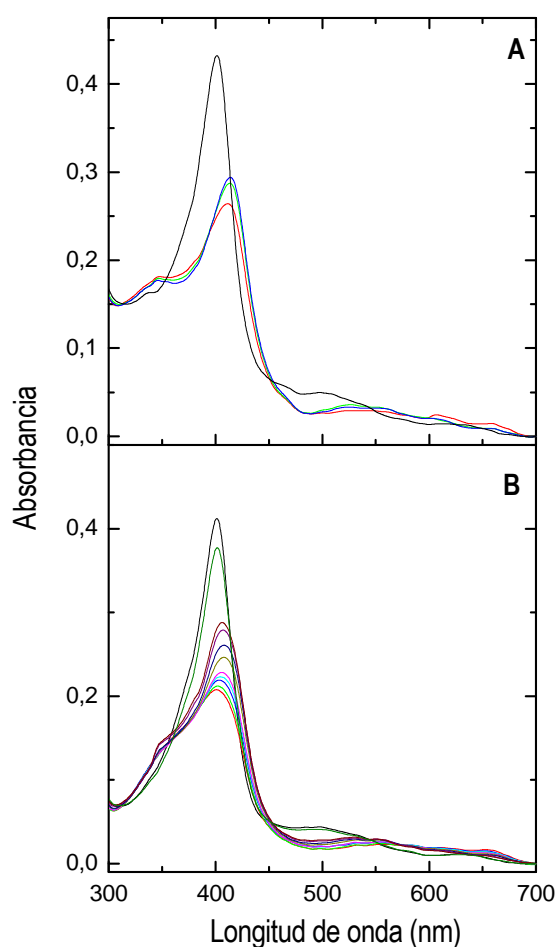


Figura 60. (A) Evolución del Col de la RPTP con el tiempo utilizando una relación $\text{H}_2\text{O}_2/\text{RPTP}$ de 0,9. La línea negra corresponde al espectro de la proteína en estado nativo. El resto indica la evolución del Col: línea roja (1 min), verde (2 min), azul oscuro (4 min). **(B) Evolución del Col de la RPTP con el tiempo utilizando una relación $\text{H}_2\text{O}_2/\text{RPTP}$ de 0,5.** La línea negra corresponde al espectro de la proteína en estado nativo. El resto indica la evolución del Col: línea roja (1 min), verde (2 min), azul oscuro (5 min), azul claro (8,5 min), magenta (13 min), amarillo oscuro (30 min), azul muy oscuro (50 min), morado (90 min), color vino (110 min) y verde oliva (24 h). Se observa que pasadas 24 h la enzima ha recuperado casi al 100% su estructura nativa.

Para la obtención del Col se debe de trabajar con unas concentraciones de peróxido inferiores a las de enzima. Se han realizado dos pruebas, con relaciones $H_2O_2/RPTP$ de 0,9 y 0,5. En el primer caso, se registran espectros durante los primeros minutos de la reacción (1, 2 y 4 min), siendo la formación del Col muy rápida y, pasado un min, se obtienen una serie de bandas más características del Coll que del Col: hombro a 370-380 nm, banda Soret desplazada a 412 nm y de menor intensidad, junto con la aparición de bandas en la zona visible (500-650 nm) típicas del Coll. Cuando la relación es de 0,5, se registran espectros entre 1-120 min. Pasado un min, se obtiene un perfil espectral característico del Col: hombro a 350 nm, banda a 400 nm, hombro a 550-600 nm y máximo a 650 nm. Con el tiempo, el máximo, que inicialmente aparece a 400 nm, se desplaza a 408 nm y crece en intensidad en 50 min, la banda a 650 nm desaparece y el hombro de 550-600 nm se va resolviendo en dos bandas a 530 y 550 nm. El Col evoluciona, como anteriormente, a Coll pero esta vez más despacio debido al menor contenido de peróxido utilizado. En realidad, hay una diferencia entre las dos relaciones utilizadas, en la primera el Col evoluciona a Coll, ya que se obtiene una banda Soret a 414 nm, típica de dicho compuesto, sin embargo en el caso de la relación menor, en la que sí se aprecia el Col, éste evoluciona a Coll pero sin llegar a formar la banda a 414 nm, desplazándose tan sólo a 408 nm en 5 min y retornando a la banda Soret de la forma nativa (403 nm). El Col de la RPTP es muy inestable y rápidamente, en menos de 1 min, se convierte en Coll cuando se trabaja con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, con una relación $H_2O_2/RPTP$ de 0,9. Cuando la relación se reduce a 0,5, se puede apreciar la estructura del Col durante los primeros minutos de reacción.

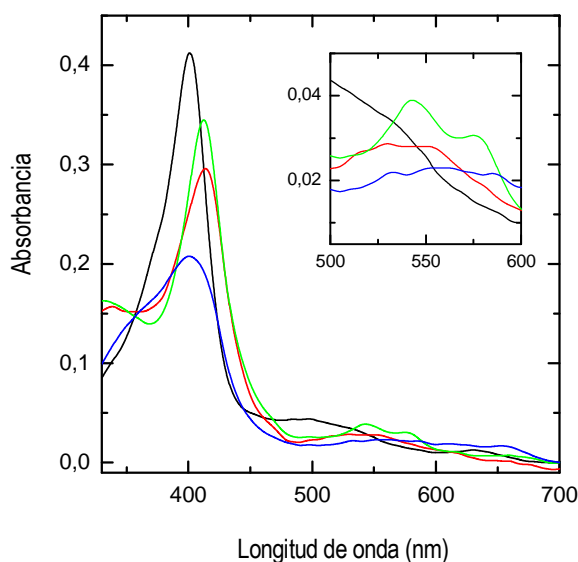


Figura 61. Espectros de absorción electrónica de la RPTP: nativa (negra), Col (azul), Coll (roja) y CollI (verde) en tampón universal 30,0 mM, pH 6,5, en presencia de distintos excesos de peróxido de hidrógeno: Col (0,5), Coll (4) y CollI (500). El gráfico interior amplifica la zona visible 500-600 nm.

Las peroxidasas de clase III poseen en su centro activo un grupo hemo con un átomo de hierro pentacoordinado con estado de oxidación III. Cuando la peroxidasa interviene en una reacción de oxidación, entre otras características moleculares, se forman especies enzimáticas intermedias en las que cambia el estado de oxidación y coordinación del hierro hémico. Los compuestos I y II, debido al hombro que aparece entre 360-380 nm, indican la presencia de un radical π -catiónico con un grupo ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). La reducción en la intensidad de la banda Soret, durante la formación del Col, y la existencia de un punto isobéptico a 424 nm, sugieren claramente la existencia de un radical π -catiónico con un grupo ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) en la estructura. El Col posee un alto poder de oxidación. Hay estudios realizados a bajas temperaturas que detectan antes de la aparición del Col, la existencia de un Co^0 . En este compuesto, el $\text{Fe}(\text{III})$ se une a un hidroperóxido (Picot *et al.*, 1994). El Coll es más estable que el Col y también es un potente oxidante. Ambos compuestos tienen potenciales redox estimados de +1 V.

Tabla XXXIII. Características espectrales y puntos isobépticos en el UV-Visible de las diferentes formas enzimáticas de la peroxidasa de palma real (RPTP).

Especie Enzimática	Máximo de absorción (nm)	Puntos isobépticos (nm)	
		RPTP nativa	Col
RPTP nativa	403, 497, 539, 577, 635		
Col	350-370 (hombro), 400, 532, 585, 653 550-564 (hombro) 605-614 (hombro)	356, 424, 444, 454	
Coll	370-380 (hombro), 415, 525, 553	358, 412, 462, 546, 614	360, 386, 570
Coll	413, 543, 576	357, 410, 469, 532, 616, 654	

5.7. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR

El dicroísmo circular es una de las técnicas físicas más sensibles para determinar estructuras secundarias y registrar cambios estructurales en biomacromoléculas. Analizando el espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano (190-240 nm), se pueden llegar a conocer, con sólo visualizar las bandas del mismo, las estructuras secundarias mayoritarias de una proteína. Con programas informáticos adecuados, se puede determinar con bastante exactitud el contenido que en una proteína hay de cada estructura secundaria en (%). Los programas utilizados son los llamados SELCON3, CDSSTR y CONTINLL, los cuales usan los modelos de referencia SP43, para proteínas intactas, y SDP48, para proteínas desnaturalizadas. La menor desviación media entre los datos experimentales y las curvas teóricas se obtuvo con el programa CDSSTR, por lo que los resultados obtenidos con los programas SELCON3 y CONTINLL han sido omitidos (Tabla XXXIV).

Tabla XXXIV. Contenido en estructuras secundarias en (%), determinado por el análisis de los espectros de dicroísmo circular de la peroxidasa de palma real (RPTP). (R) regular, (D) distorsionado y (T) total.

RPTP	α-hélice			Hoja β			Giroβ	Desordenada
	R	D	T	R	D	T		
Nativa, pH 7,0	28	26	54	3	4	7	24	15
Nativa, pH 3,0	22	19	41	7	5	12	20	27
Desnaturalizada, pH 3,0	3	5	8	13	7	20	16	56

Los espectros de DC de la peroxidasa de palma real nativa a pH 3,0 y 7,0 en tampón HEPES 20,0 mM y 25 °C, presentan una clara y marcada banda positiva con un máximo a 194 nm y dos bandas negativas con mínimos a 208 y 222 nm (Fig. 62). Estas bandas indican un alto contenido de α-hélices en la estructura secundaria (Tabla XXXIV). El 54 % y el 41% de las estructuras secundarias de la proteína nativa son α-hélices a pH 7,0 y 3,0, respectivamente. Los valores obtenidos para la peroxidasa de palma real son típicos para peroxidases hémicas (Banci, 1997). Hay que tener en cuenta que, a la hora de estimar el contenido de las diferentes estructuras secundarias, la estimación de las hojas y giros β es normalmente peor que la de las hélices α, debido a que la intensidad de sus señales es mucho menor.

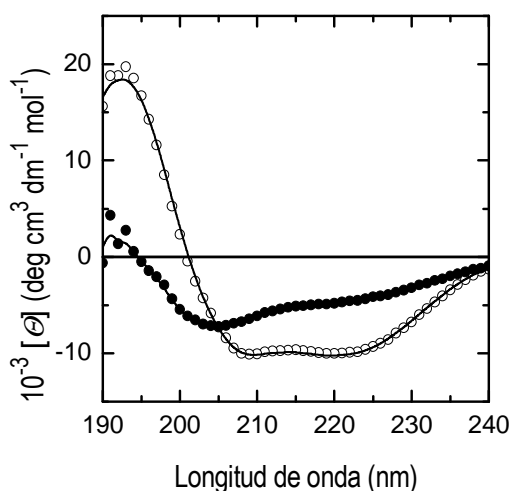


Figura 62. Espectros de DC en el UV-lejano de la RPTP a pH 3,0 y 25 °C nativa (círculos blancos) y térmicamente desnaturalizada a 80 °C (círculos negros). Las líneas continuas a través de los puntos experimentales son los mejores ajustes de esos datos con el programa CDSSTR, utilizando como conjuntos de referencia los modelos SP43 y SDP48 para las proteínas nativas y desnaturalizadas, respectivamente.

5.8. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA RPTP

5.8.1. ANÁLISIS DEL EXTREMO N-TERMINAL

Se obtiene la secuencia del extremo N-terminal de la RPTP mediante la degradación de Edman de la proteína. Para ello, se utiliza el instrumento Procise (*Procise C Protein Sequencing Systems*) de Applied Biosystems, según el protocolo descrito. Con este método, se determinan los 52 primeros aminoácidos de la secuencia proteica. La parte subrayada, además, se determinó mediante secuenciación *de novo* de un péptido tríptico.

DLQIGFYXTSCPTAEALVQQAVAAAFAXNSGIAPGLIRMHFHDCFVRGCDAS

Son muchas las peroxidasas que tienen bloqueado el extremo N-terminal con piroglutamato y, por ello, no se puede analizar la secuencia de esta zona (Morita *et al.*, 1993). Por fortuna, no es así en el caso de la RPTP.

Si se compara el extremo N-terminal de la peroxidasa de palma real con el de otras peroxidasas de plantas superiores, tales como maíz y arroz, con las que ya surgió cierta homología entre algunos de sus péptidos trípticos, se observa que las secuencias son similares (Tabla XXXV).

Tabla XXXV. Estudio comparativo de las secuencias del extremo N-terminal de la RPTP y de las peroxidasas de maíz y arroz. La homología con la de maíz se muestra en negrita y con la de arroz mediante subrayado.

Peroxidasa (Código)	Extremo N-terminal	Homología (%)
RPTP	D <u>L</u> <u>Q</u> I G F Y X T <u>S</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>A</u>	-
Maíz (Q9FEQ7)	C L D V G F Y D R T C P T A	57
Arroz (Q8LHH6)	A <u>L</u> <u>Q</u> V <u>G</u> <u>F</u> <u>Y</u> Q S <u>S</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>A</u>	64

5.8.2. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS POR DIGESTIÓN TRÍPTICA DE LA RPTP MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Se realiza la digestión de la RPTP con la proteasa tripsina. La mezcla de péptidos trípticos se analiza mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, observándose que la digestión ha generado un conjunto de péptidos con unas relaciones m/z comprendidas entre 900 y 5000 Th. Los péptidos que surgen de una digestión tríptica suelen estar doble y triplemente cargados. El péptido mayoritario tiene una relación m/z de 2308,37 Th (3H⁺) (Fig. 63A). Cuando se refina la estructura de este primer espectro, se observan otros péptidos con unos valores m/z de 2013,6833 (2H⁺), 1647,30 (2H⁺), 1582,25 (2H⁺), 1394,25 (2H⁺) y

1248,3042 ($2H^+$), entre otros (Fig. 63B). Las masas de estos péptidos se determinan utilizando como patrón de masas moleculares una mezcla peptídica de la lectina de semillas de *Cratylia floribunda*, digerida con tripsina, que tiene un rango de masas moleculares desde 450 hasta 3300 Da.

Los péptidos mayoritarios serán aislados y caracterizados usando diferentes metodologías.

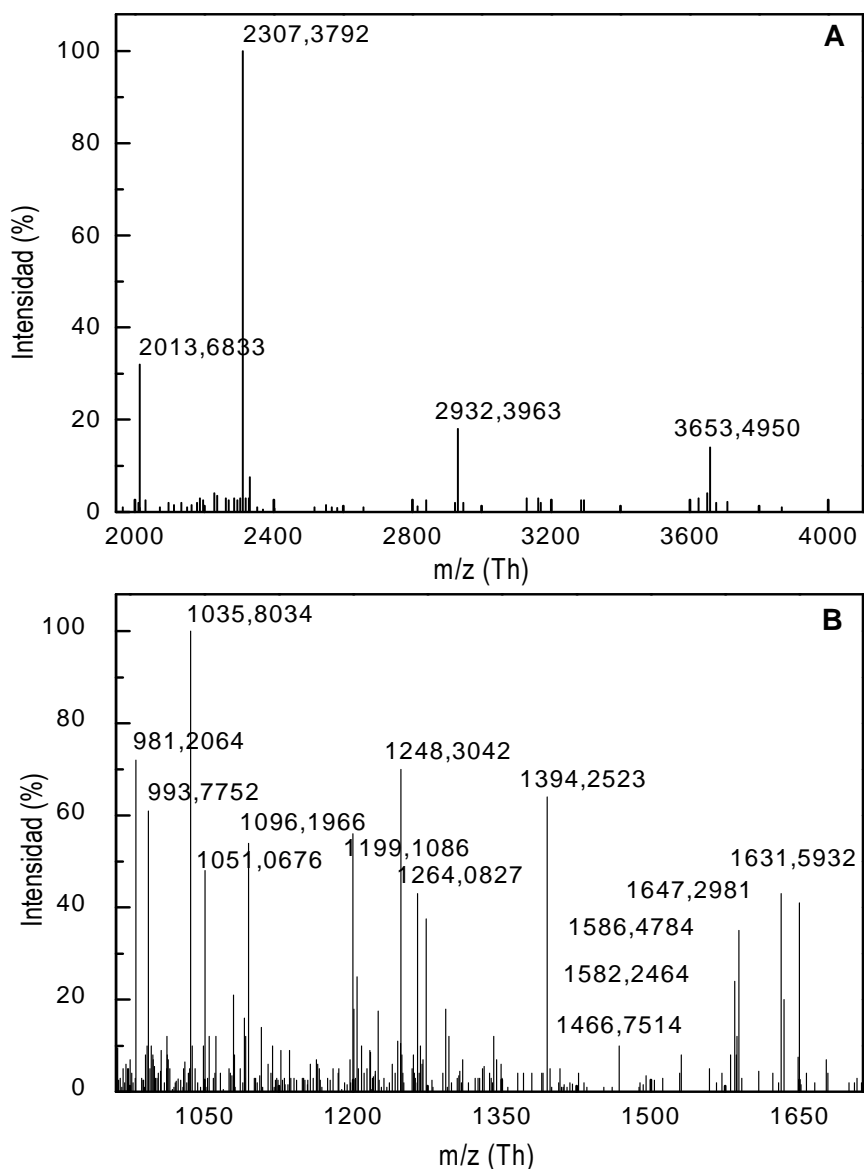


Figura 63. Espectros de masas MALDI-TOF de la mezcla de digestión trípica de la proteína RPTP. Para poder visualizar mejor las señales, ambos espectros surgen como consecuencia del refinamiento de uno previo, La única diferencia es el rango del eje de abscisas. (A) 1939,0-4130,0 Th; (B) 961,0-1714,0 Th.

5.8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS TRÍPTICOS

El análisis de las mezclas de digestión triptica permite conocer la masa molecular de los péptidos proteicos, caracterizar su estructura e identificar la secuencia proteica en bases de datos que pueden producir estos péptidos, siempre y cuando la secuencia proteica se encuentre en esa base de datos. Cuando la secuencia no se encuentra en la base de datos, hay que interpretar los espectros de masas de los productos iónicos manualmente para poder deducir la secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos. Cuando se obtiene la mezcla triptica de una proteína, se comparan las masas de los péptidos obtenidos contra las de las bases de datos, estas últimas habiendo crecido notablemente en la última década. Si la masa del péptido que se busca, se encuentra en la base de datos y tiene asociada una secuencia de aminoácidos, la consulta indica a qué proteína pertenece ese péptido y la bondad de esa búsqueda, que dependerá de la exactitud de la masa del péptido introducido. En otras ocasiones, los espectros de los productos iónicos se pueden introducir en bases de datos y obtener información de la secuencia a la que corresponden. En las bases de datos, se puede encontrar información de espectros de productos iónicos de una gran cantidad de proteínas digeridas con distintas enzimas de digestión. De este modo, se posee cierta información previa, aunque, posteriormente, se realice una interpretación manual de los espectros de los productos iónicos.

Existe una gran variedad de base de datos de secuencias proteicas, la más exacta es la base de datos *Swiss-Prot*. Fue creada en 1986, su mantenimiento lo realiza el Instituto de Bioinformática suizo situado en Génova, en colaboración con el Instituto de Bioinformática Europeo del EMBL (*European Molecular Biotechnology Laboratory*). Posee una baja redundancia, un error muy limitado y un alto grado de información. Se actualiza diariamente, con revisiones específicas cada seis meses (www.ebi.ac.uk/swissprot/).

El caso que presenta una mayor dificultad es tener que determinar la secuencia de una proteína que tenga una homología muy escasa con las proteínas que existen en las bases de datos. En este caso, las búsquedas proporcionarán una nula o limitada información y la única forma de solucionar el problema es recurrir a la secuenciación *de novo*, que consiste en analizar manualmente los espectros de los productos iónicos y, con esta información, recurrir a técnicas de Biología Molecular (clonación), degradación de Edman, análisis del extremo N-terminal, etc. La determinación de la secuencia de la peroxidasa de palma real se ha determinado siguiendo este proceso, no habiendo sido demasiado útiles las bases de datos existentes.

Los péptidos tripticos de la digestión de la RPTP se separan mediante cromatografía de fase reversa, usando una columna C₁₈. Se detectan los picos a 215 nm, se recogen las fracciones correspondientes y se

secan. Finalmente, se analizan mediante secuenciación del extremo N-terminal y espectrometría de masas en tándem, con disociación inducida por colisión (CID-MS/MS). Los espectros de masas de los productos iónicos de los péptidos mayoritarios se comparan con los existentes en las bases de datos y se analizan manualmente, dando lugar a una serie de fragmentos proteicos (Tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Péptidos tripticos resueltos mediante secuenciación de novo. ⁽¹⁾ Son fragmentos del péptido 770,1 (3H⁺); ⁽²⁾ son fragmentos del péptido 1007,2 (2H⁺).

m (Da)	z (H ⁺)	Secuencia	Posición
625,2	2	-MHFHDCFVR-	39-47
1007,2	2	-DAIPNNPSLRGFEVITAAK-	66-84
770,1	3	-SAVEAACQTVSCADILAFAR-	85-106
694,5	2	-IDPTLSPTYAALLR-	192-205
816,2	2	-MGQIEVLTGTQGEIR-	282-296
554,7	2	-CADILAFAR-	97-106 ⁽¹⁾
698,2	2	-TVSCADIIAFAR-	94-106 ⁽¹⁾
549,2	2	-DAIPNNPSLR-	66-75 ⁽²⁾
491,7	2	-ALPNNPSLR-	67-75 ⁽²⁾
857,3	2	-PNNPSLRGFDVIDAAK-	69-84 ⁽²⁾
501,2	2	-PNNPSLRGF-	69-77 ⁽²⁾

Las bases de datos arrojaron los siguientes resultados: a) el espectro del producto iónico del fragmento 816,2 (2H⁺) coincide exactamente con un fragmento de secuencia -MGQIEVLTGTQGEIR- encontrado en la peroxidasa de maíz (*Zea mays*), código Q9FEQ7, que se encuentra en la posición 314-328, b) el fragmento 698,2 (2H⁺), cuya secuencia es -TVSCADIIAFAR-, se encuentra en la peroxidasa de arroz (*Oryza sativa*), código Q8LHH6, en la posición 116-128, c) el fragmento 625,2 (2H⁺), cuya secuencia es -MHFHDCFVR-, se ha encontrado en las peroxidases de maíz (*Zea mays*), código Q9FEQ7, de espinaca (*Spinacia oleracea*), código Q9M4Z5, y de soja (*Glycine max*), código Q9ZNZ6.

Tabla XXXVII. Péptidos tripticos resueltos mediante secuenciación del extremo N-terminal. El aminoácido asparagina (N), señalado en negrita corresponde a posibles sitios de glicosilación.

Nombre	m (Da)	Secuencia	Posición
T27	-	-DSANLAGNITYQVPSGR-	107-123
T40	4111,8	-RDGTVSLASEANAQIPSPFNATQLINSFANK-	124-155
T37	3654,8	-LYNFNSTSGIDPTLSPTYAALLR-	183-205
T9	2195,3	-TNCSVVNSGS-	296-306
T24	1096,4	-DAIPNNPSLR-	66-75

5.8.4. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA RPTP MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El análisis de los péptidos trípticos permite determinar algún fragmento de la secuencia proteica, pero no elucidarla totalmente. Para ello, se usarán técnicas de Biología Molecular.

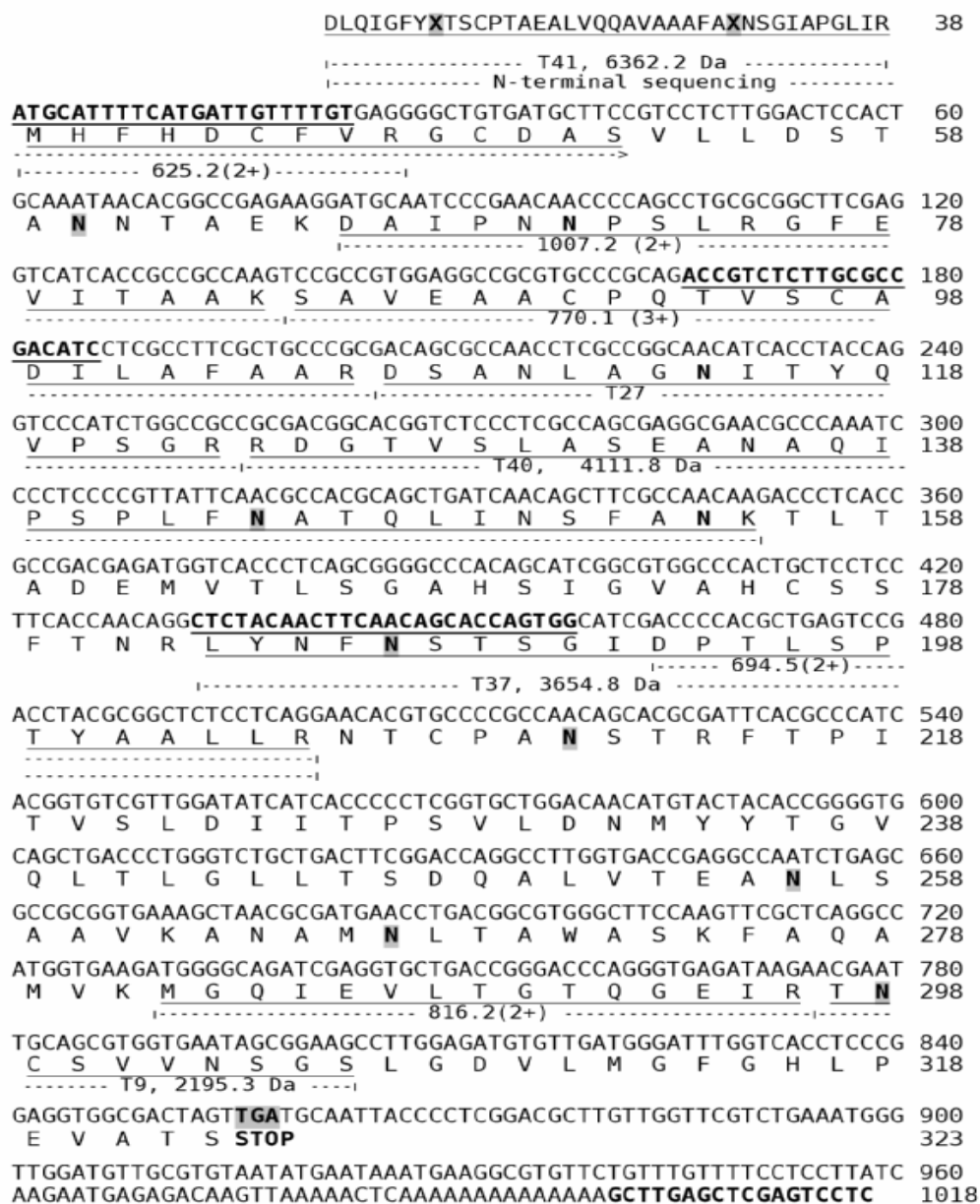


Figura 64. Secuencia primaria de aminoácidos y de nucleótidos de la RPTP (numerada en el lado derecho). Las secuencias subrayadas de nucleótidos se corresponden con los *primers* usados para clonar, las secuencias de los productos codificados están superpuestas y se corresponden con los residuos 39-323. La secuencia de aminoácidos 1-52 fue determinada por degradación de Edman de la proteína aislada. Las secuencias peptídicas internas, recogidas por secuenciación del extremo N-terminal (llamadas T) o por CID-MS/MS, están subrayadas. Las relaciones (m/z) y la carga de los pares iónicos se indican debajo de la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos asparagina que se encuentran en secuencias consenso de N-glicosilación (NXS/T) se marcan en negrita y los que probablemente sean sitios de N-glicosilación se somborean en gris.

En primer lugar, se extrae ARN de las hojas de palmera real y mediante retrotranscripción se obtiene cADN. Sobre esta molécula y con *primers* específicos obtenidos de algunos péptidos trípticos (Tabla XIV), se harán RT-PCR y se amplificarán determinados fragmentos de la secuencia proteica (Tablas XII, XIII). Estos fragmentos se clonan en el vector pGEM®-T, se expresan en la progenie de células de *E.coli* DH5 α , para obtener grandes cantidades, y se secuencian, obteniéndose dos fragmentos de gran tamaño.

Con la reacción de PCR 1 (Tabla XII), se obtiene un fragmento de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 166-1018. Con la PCR 2 (Tabla XIII), se obtiene un fragmento de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1-458 (Fig. 64). De este modo, queda determinada la secuencia primaria de la peroxidasa de palma real (RPTP).

5.8.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS GLICANOS

Una vez conocida la secuencia de aminoácidos de la RPTP, se puede determinar la contribución de la misma a la masa molecular proteica (33768 Da). Como la masa molecular de la proteína nativa intacta es de 44596 ± 8 Da (MALDI-TOF), la diferencia de masa (10828 Da) daría el porcentaje de glicosilación proteico (24%). Ello indica que la proteína está fuertemente glicosilada. Este hecho queda confirmado, si se observa que a lo largo de la secuencia proteica existen 12 posibles sitios de N-glicosilación (N8, N28, N60, N71, N114, N144, N154, N187, N211, N256, N267 y N298), siendo asparaginas (N) que forman parte de la secuencia consenso NX(S/T) necesaria para que exista N-glicosilación, X puede ser cualquier aminoácido.

Tabla XXXVIII. Secuencias de aminoácidos y estructuras de N-glicosilación propuestas para diferentes glicopéptidos, aislados por cromatografía HPLC en fase reversa de una disolución digerida de la RPTP. X son los residuos Asn glicosilados. ▲ (Man-[Xyl]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc) (m/z 1171,0); ■ (GlcNAc-Man-[Man]Man-GlcNAc[Fuc]GlcNAc) (m/z 1240,4); ♦Man[Man]Man-GlcNAc-GlcNAc (m/z 892,3).

Péptido tríptico	M+H ⁺	Secuencia de aminoácidos	Posición	Modelo de glicosilación
T41	6362,2	DLQIGFYXTSCPTAEALVQQAVAAAFAXNSGIAPGLIR	1-38	3950,8+ ▲ ■
T40	4267,9	-RDGTVSLASEANAQIPSPLFXATQLINQFANK-	123-155	3376,1 + ♦
T38	4111,8	-DGTVSLASEANAQIPSPLFXATQLINQFANK-	124-155	3220,1 + ♦
T37	3654,8	-LYNFXSTSGIDPTLSPTYAALLR-	183-205	2483,3 + ▲
T9	2195,3	-TXCSVNSGS-	297-306	1024,4 + ▲

Algunos glicopéptidos trípticos, además de caracterizados por secuenciación del extremo N-terminal y MALDI-TOF-MS (Tabla XXXVIII), se aislaron por cromatografía de fase reversa. Se observa claramente que las asparaginas que se encuentran en las posiciones 8, 28, 144, 187 y 298 están glicosiladas con azúcares cuyas masas moleculares oscilan entre 862 y 1240 Da.

Las estructuras de los glicanos, que se muestran en la Tabla XXXVIII, se corresponden con oligosacáridos típicos de plantas, que además, coinciden con las masas moleculares esperadas. Hay que tener en cuenta que los residuos de asparagina, que ocupan las posiciones 71, 114 y 154, forman parte de secuencias consenso de N-glicosilación, pero, también, han sido caracterizados como residuos no glicosilados en algunos péptidos trípticos: N71 (1007,2-2H⁺), N114 (T27) y N154 (T38 y T40). Los datos experimentales generan una masa molecular de 39413 Da (33768 + 1171 + 1240,1 + 892,1 + 1171 + 1171). Entre esta masa y la masa molecular promedio de la RPTP hay una diferencia de 5183 Da, que corresponderá a glicanos N-ligados a los residuos asparagina (N60, N211, N256 y N267), localizados todos ellos en secuencias consenso (Fig. 64). El esquema del modelo de glicosilación propuesto para estos cuatro residuos, utilizando glicanos típicos de plantas, se obtendría haciendo combinaciones, cuyo conjunto resultante tuviera una masa molecular de 5183 Da. Uno de los posibles modelos sería el establecido en la Fig. 65, donde las masas de los oligosacáridos de los residuos N60, N211, N256 y N267 serían 1240, 1240, 1257 y 1445 Da, respectivamente. El sumatorio de estas masas moleculares sería 5182 Da.

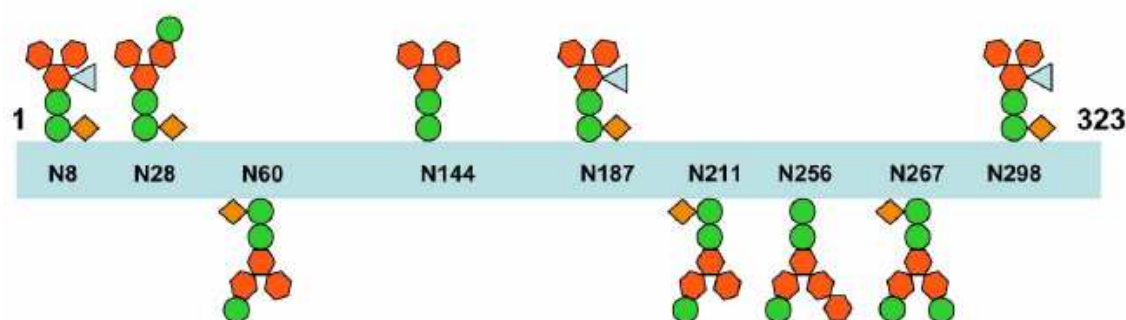


Figura 65. Modelo de glicosilación propuesto para la RPTP. Los sitios de N-glicosilación se han determinado experimentalmente. La estructura de estos glicanos se infiere de cálculos de su masa. El código de colores corresponde a: manosa-Man (hexágonos naranjas), xilosa-Xyl (triángulos azules), fucosa-Fuc (rombos amarillos) y N-acetilglucosamina-NAcGlc (círculos verdes).

5.9. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PROTEICA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS-X

5.9.1. CRISTALES DE LA RPTP

El proceso de cristalización proteica generó, con éxito, cristales de RPTP mediante el método de difusión de vapor de la gota colgante. Existía suficiente cantidad de RPTP y ésta tenía un elevado grado de pureza. Son muchas las peroxidases de plantas caracterizadas bioquímica y químico-físicamente, pero son escasas aquéllas de las que conocemos su estructura tridimensional. Su alto porcentaje de glicosilación y su elevada estabilidad, hace que no sea posible cristalizar la proteína, ni encontrar por digestión proteolítica un

mapa peptídico detallado. Además, muchas peroxidasa tienen el extremo N-terminal bloqueado por piroglutamato y la pobre homología que comparten con el resto de proteínas hace que sea difícil resolver su secuencia primaria y conocer su estructura tridimensional (Morita *et al.*, 1993). Poder cristalizar la peroxidasa de palma real, que posee un porcentaje de glicosilación superior al 20%, ha sido todo un éxito.

Las condiciones óptimas de la disolución de cristalización son: tampón MES 0,1 M, pH 6,5 y 291 K con sulfato amónico 2,6 M. Los cristales tardan en aparecer entre 3 y 4 días. Tienen unas dimensiones de 0,3 x 0,4 x 0,3 mm (Fig. 66). Poseen buenas características físicas, tales como claridad óptica, caras lisas y aristas marcadas y desvían fuertemente el plano de luz polarizada (Watanabe *et al.*, 2007).

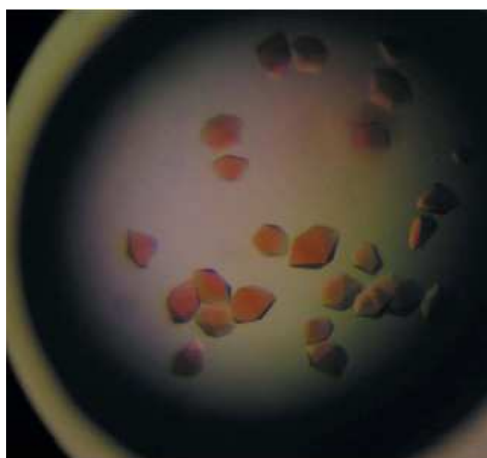


Figura 66. Cristales de la peroxidasa de las hojas de palma real (*Roystonea regia*). Obtenidos en tampón MES 0,1 M, pH 6,5 y 291 K, con sulfato amónico 2,6 M y una concentración de proteína de 4,8 mg ml⁻¹. Sus dimensiones son de 0,3 x 0,4 x 0,3 mm.

5.9.2. DATOS CRISTALOGRAFICOS

Los cristales de RPTP se recubrieron, durante unos segundos, con una disolución crioprotectora (aceite mineral 100%). Se colocaron en la cabeza goniométrica del difractómetro, utilizando como fuente de Rayos X un generador de ánodo rotatorio y se obtuvo un patrón de difracción bastante correcto (Fig. 67). Tras procesar los datos de cada rotación del cristal sobre el eje del difractómetro, se obtuvieron, con los programas MOSFLM (Leslie, 1992) y SCALA (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994), los parámetros más relevantes de la celda unitaria de RPTP. De los experimentos de difracción de Rayos X, se pueden obtener datos directos (Tabla XXXIX) y otros datos, como la densidad electrónica ($\rho(xyz)$), relacionados con la resolución de la estructura proteica y que requieren estudios más avanzados.

El análisis de los datos de difracción clasifica los cristales de la RPTP dentro del grupo espacial trigonal P3₁21, con unas dimensiones de la celda que son $a = b = 116,83 \text{ \AA}$ y $c = 92,24 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$,

que contienen una molécula de proteína por unidad asimétrica. El análisis del contenido de disolvente, usando el coeficiente de Matthews (Matthews, 1968), indica que una unidad asimétrica contiene una molécula con un 69,8 % de disolvente y un volumen $V_M = 4,07 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ o dos moléculas con un contenido de disolvente del 39,6 % y un volumen $V_M = 2,04 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ (Watanabe *et al.*, 2007). Considerando que la RPTP tiene una masa molecular de $44600 \pm 8 \text{ Da}$ y que el número de operaciones de simetría de ese grupo espacial es de 6 ($Z = 6$), el volumen ocupado por la celda unidad es de $1,09 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$.

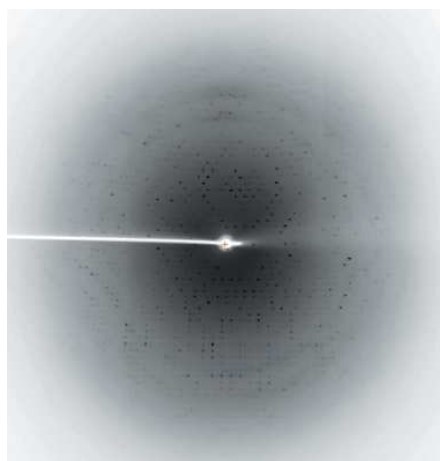


Figura 67. Mapa de difracción de Rayos X de los cristales de RPTP. Recogido con un generador de Rayos X de ánodo rotatorio. La resolución máxima de los datos es de 2,8 Å.

Tabla XXXIX. Parámetros estadísticos del análisis de difracción preliminar de los cristales de RPTP. Los resultados entre paréntesis corresponden al nivel de más alta resolución (Watanabe *et al.*, 2007).

Datos de difracción de Rayos X	RPTP
Longitud de onda (Å)	1,5418
Rango de resolución (Å)	68,1-2,8 (2,9-2,8)
Grupo espacial	P3 ₁ 21
Parámetros de la celda unidad (Å)	a = b = 116,83, c = 92,24
Integridad (%)	99,8 (99,9)
Multiplicidad	6,5 (6,1)
R _{merge} (%)	10,7 (67,4)
Promedio I/σ(I)	13,7 (2,3)
Reflexiones totales	119107
Reflexiones únicas	18423

Una vez elucidada la secuencia de aminoácidos de la RPTP se repiten los estudios de cristalización y difracción de Rayos X para resolver la estructura tridimensional de la RPTP. La cristalización se hace en las condiciones antes descritas. La colección de datos de difracción de Rayos X se obtiene utilizando como fuente de Rayos X un generador de ánodo rotatorio LNLS W01B-MX2 que opera con una energía de 9,8 keV y un detector tipo *Image Plate* Marmosaic225 (Tabla XL). Los datos de difracción son un conjunto de 150 imágenes, cada una de ellas correspondiente a un giro del cristal de 1° y un tiempo de exposición de

20 min. Se obtuvieron los parámetros directos de estos datos experimentales al analizarlos con los programas *MOSFLM* 6.2.6 (Leslie, 1992) y *SCALA* 3.2.19 (Evans, 1993). La RPTP pertenece al grupo espacial trigonal $P3_121$, con unas dimensiones de la celda unidad de $a = b = 117,82 \text{ \AA}$ y $c = 93,45 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$ que contienen una molécula de proteína por unidad asimétrica. El análisis del contenido de disolvente usando el coeficiente de Matthews (Matthews, 1968) indica que una unidad asimétrica contiene una molécula con un 70,72 % de disolvente y un volumen de $V_M = 4,20 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$. Considerando que la RPTP tiene un peso molecular de $44600 \pm 8 \text{ Da}$ y que el número de operaciones de simetría de ese grupo espacial es de 6 ($Z = 6$), el volumen ocupado por la celda unidad es de $1,12 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$. Se observa que los datos obtenidos por los dos experimentos proporcionan unos resultados muy próximos entre sí (Tabla XLI).

Tabla XL. Parámetros estadísticos del análisis de difracción final de los cristales de RPTP. Los resultados entre paréntesis corresponden al nivel de más alta resolución (1,95-1,85 Å). El valor de R_{merge} se ha calculado con el programa *SCALA*.

Datos de difracción de Rayos X	RPTP
Longitud de onda (Å)	1,427
Rango de resolución (Å)	44,78-1,85 (1,95-1,85)
Grupo espacial	$P3_121$
Parámetros de la celda unidad (Å)	$a = b = 117,97, c = 93,32$
Integridad (%)	99,9 (100)
Multiplicidad	8,9 (8,6)
R_{merge} (%)	9,7 (96,7)
R_{sym}	3,2 (34,9)
Promedio $I/\sigma(I)$	17,5 (1,8)
Reflexiones totales	570014
Reflexiones únicas	64039

Tabla XLI. Comparativa de los parámetros obtenidos de modo directo mediante los dos estudios de difracción de Rayos X de la RPTP. Se observan variaciones en el volumen de la celda unidad del 3% y en el resto de parámetros aproximadamente del 1%.

Datos de difracción de Rayos X	RPTP	RPTP
Parámetros de la celda unidad (Å)	$a = b = 116,83, c = 92,24$	$a = b = 117,97, c = 93,32$
Contenido de disolvente/unidad	69,80	70,72
$V_M (\text{Å}^3 \text{ Da}^{-1})$	4,07	4,20
Volumen de la celda (Å^3)	$1,09 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^6$

5.9.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y REFINADO

La estructura de la RPTP ha sido resuelta con el uso de la técnica de reemplazo molecular, utilizando para ello el programa *MOLREP* (Vagin, 1997) y empleando como modelo de búsqueda la estructura de la peroxidasa de rábano (código 1h57 del PDB), que posee un 36% de homología con la RPTP. En primer lugar, se hace un búsqueda del parámetro de rotación, siendo mejorado el modelo de búsqueda con el programa *CHAINSAR* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). La búsqueda de la rotación se llevó a cabo dentro de un rango de resolución comprendido entre 102,04 y 2,15 Å, búsqueda que genera 210

un primer resultado cuyo valor es de $12,89\sigma$ (muy diferente al segundo de $2,92\sigma$). La mejor solución, tras la función de translación y obtenida dentro del mismo rango de resolución, tiene un valor del marcador de 0,677 y un valor para el factor R de 49,7%.

El resultado obtenido mediante la técnica de reemplazo molecular se sometió a un conjunto de ciclos iterativos que refinan la posición y los factores B del modelo construido, alternando con un modelo de verificación, utilizando los programas *COOT* (Emsley, 2004) y *PHENIX* (Adams, 2002), los cuales trabajan con conjuntos de datos que incluyen todas las posibilidades en ese rango de resolución (entre 102,06 y 1,85 Å). Las moléculas de agua y las cadenas de azúcares se adicionan posteriormente con una herramienta de *Coot*. Durante la inspección de los diferentes mapas de Fourier refinados, se observa la presencia de zonas de densidad electrónica no proteicas muy potentes que han sido identificadas con la molécula de MES y posteriormente se refinaron.

El refinamiento y la reconstrucción del modelo redujeron los valores de los parámetros R y R_{libre} a 18,73 y 20,47%, respectivamente.

Tabla XLII. Estadística del proceso de refinamiento del conjunto de datos obtenidos por difracción de Rayos X sobre cristales de la RPTP. (a): desviación cuadrática media de los valores ideales, (b): datos referidos al diagrama de Ramachandran.

Estadística del refinamiento	RPTP
Factor R (%)	17,65
Factor R_{libre} (%)	18,70
RMSC ^a longitudes de enlace (Å)	0,004
RMSC ^a longitudes de enlace (°)	0,946
B medio (Å ²)	39,6
Nº de aminoácidos	304
Nº de moléculas de agua	586
Nº de moléculas de MES	1
Nº de moléculas de peróxido de hidrógeno	1
Nº de glicanos N-unidos heterogéneos	9
Nº de iones calcio	2
Nº de iones sulfato	8
Nº de moléculas de etilenglicol	16
Región más favorecida ^b (%)	90,1
Región permitida adicional ^b (%)	9,9
Región normalmente permitida ^b (%)	0
Región no permitida ^b (%)	0
Factor G	0,3

La estructura cristalográfica de la RPTP ha sido resuelta con una resolución de 1,85 Å y valores finales para los factores R y R_{libre} de 17,65 y 18,70%, respectivamente. La estereoquímica del modelo atómico se ajusta bien al modelo ideal y presenta unos coeficientes de desviación cuadráticos medios para las distancias y ángulos de enlace bastante correctos (Tabla XLII). El modelo final indica que la RPTP es una

glicoproteína monomérica, compuesta por una cadena polipeptídica. Posee una masa molecular de 44,6 kDa y tiene 304 residuos, además de un grupo hemo, dos iones calcio (Ca^{2+}), ocho iones sulfato (SO_4^{2-}), una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), 16 moléculas de etilenglicol y 586 moléculas de agua. La unidad asimétrica también contiene nueve N-glicanos que están formados por 15 moléculas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), 5 de α -L-fucosas (Fuc), ocho moléculas de manosa (Man) y una xilosa (Xyl) (Fig. 68).

5.9.4. DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA RPTP

5.9.4.1. Estructura global

La estructura tridimensional de la RPTP es muy similar a la de otras peroxidasas de clase III: PNP (Schuller et al., 1996), cHRP (Gajhede et al., 1997) y SBP (Henriksen et al., 2001). Todas ellas son proteínas con un alto contenido de hélices α , con un grupo hemo que se encuentra entre los dominios distal (superior) y proximal (inferior), y dos iones calcio, cada uno de ellos localizado en un dominio. La RPTP tiene 13 α -hélices: 17-28 (A), 30-45 (B), 77-90 (C), 102-112 (D), 131-137 (D'), 145-155 (E), 159-170 (F), 176-183 (F'), 198-204 (F''), 237-240 (G), 246-252 (H), 259-266 (I) y 268-284 (J) (Fig.68). Además, posee dos hélices adicionales muy cortas entre las hélices B y C: 52-54 (B') y 64-66 (B'').

Como otras peroxidasas de clase III, en su estructura aparecen dos pequeñas láminas β antiparalelas, β_1 (173-175) y β_2 (219-221), flanqueadas por las hélices F y G, que contienen las hélices F' y F''. Uno de los puentes disulfuro (Cys176-Cys208) une las hélices F' y F'' y estabiliza la hoja β .

En la estructura de la RPTP, como en otras peroxidasas de clase III, aparecen cuatro puentes disulfuro entre parejas de cisteínas altamente conservadas (11-91, 44-49, 97-299 y 176-208) que mantienen la rigidez estructural. El extremo N-terminal se encuentra unido a la parte posterior de la hélice A por el puente disulfuro 11-91. El extremo C-terminal está unido al inicio de la hélice D por el puente disulfuro 97-299 (Fig. 68). El puente disulfuro Cys44-Cys49 une el final de la hélice B con el giro BC en la RPTP y en otras peroxidasas de clase III. Sin embargo, ninguna de las peroxidasas pertenecientes a las clase I y II poseen una unión disulfuro equivalente.

La peroxidasa de palma es una proteína obtenida de las hojas de la palmera *Roystonea regia* y por ello está altamente glicosilada, lo que es común en las peroxidasas de plantas en estado nativo. Su estructura tridimensional presenta nueve sitios de N-glicosilación que se encuentran hacia en exterior proteico en giros o zonas de unión (Fig. 68). Otras peroxidasas de clase III también están glicosiladas, la cHRP posee siete glicanos, la SBP cinco y la PNP tres. Las peroxidasas de clase II están glicosiladas, pero en menor medida,

y las de clase I no presentan glicosilación. Este factor aumenta la solubilidad proteica y protege a la RPTP de la proteólisis.

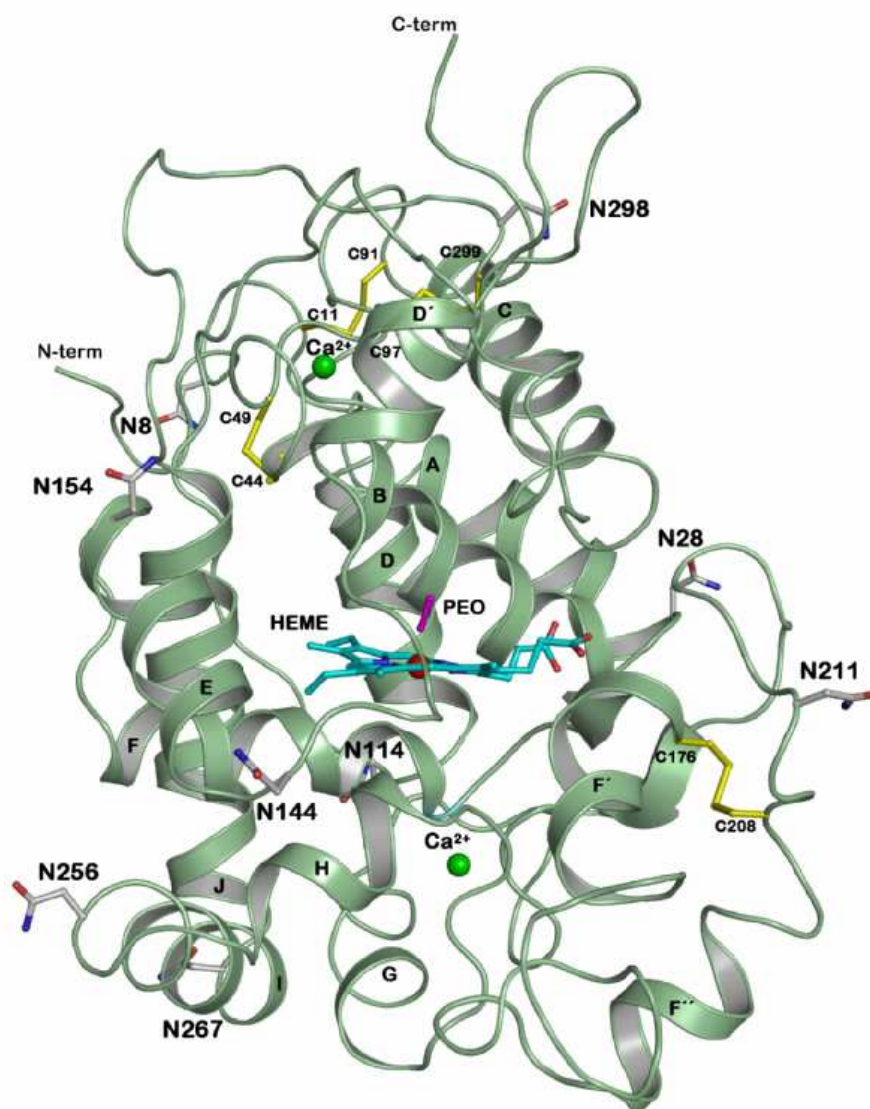


Figura 68. Estructura tridimensional de la RPTP determinada por cristalografía de Rayos X. La representación en cinta enseña las hélices conservadas (A-J) y los nueve residuos N que contienen glicanos. El grupo hemo, de color azul ocupa la posición central entre los dominios distal y proximal de la proteína; hay una molécula de peróxido de hidrógeno (PEO), de color rosa, situada sobre el plano hémico. Los dos iones calcio se representan como esferas de color verde y los cuatro puentes disulfuro se muestran en amarillo. La figura ha sido realizada con el programa PYMOL (DeLano, 2002).

La RPTP tiene una homología del 36% en su secuencia de aminoácidos con la cHRP (código 1atj-PDB). Cuando se superponen sus estructuras tridimensionales, se pueden observar las zonas homólogas y las zonas con claras diferencias topológicas (Fig. 69). La comparación de 259 átomos de carbono (Ca) da lugar a un coeficiente de desviación cuadrático medio de 1,07 Å. Las regiones de mayor

variabilidad se encuentran en segmentos peptídicos entre las hélices F y H. Hay una clara diferencia entre estas dos peroxidasas, la RPTP es aniónica y la cHRP es catiónica, y, por tanto, serán sus cadenas laterales las que generarán esa diferencia topológica que influirá en su distinta estabilidad y actividad enzimática.

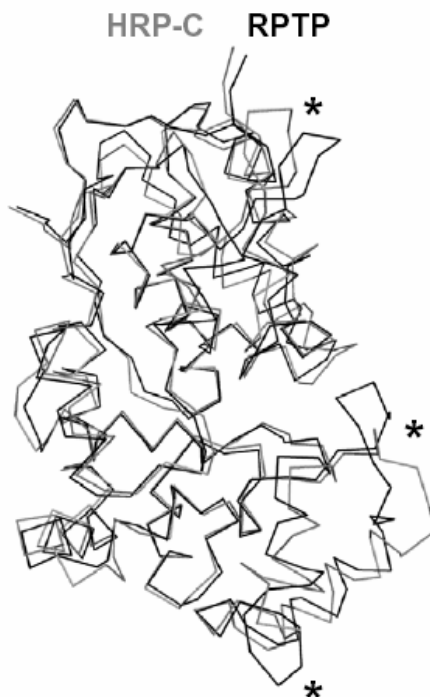


Figura 69. Superposición de las cadenas de carbonos α de la RPTP (línea negra) y de la cHRP (línea gris). Las regiones que presentan variabilidad se marcan con asteriscos.

5.9.4.2. El centro activo

En el centro activo de las peroxidasas de clase III hay residuos altamente conservados que se encuentran en los dominios distal y proximal y en la cavidad del grupo hemo. El centro activo de la RPTP es similar al de las peroxidasas cHRP y SBP. Todos ellos contienen el átomo de hierro centrado en el plano hémico (Fig. 70).

En la cavidad distal de la RPTP existe una molécula de peróxido de hidrógeno que, mediante uno de sus átomos de oxígeno (O1), se enlaza covalentemente al hierro hémico (2,08 Å). En el mapa de densidad electrónica de la RPTP, la longitud del enlace O-O de la molécula de peróxido de hidrógeno (1,44 Å) indica que los átomos están unidos mediante un enlace sencillo, lo que contribuye a pensar que la estructura cristalina de la RPTP no se corresponde a la proteína nativa (estado de reposo). En este estado nativo, la enzima contiene Fe^{III} débilmente enlazado con una molécula de agua, la cual es sustituida por una molécula de peróxido de hidrógeno cuando se forma el estado del complejo hidroperóxido, estado de transición

intermedio que se forma antes de la formación del compuesto I (Col), de acuerdo con el mecanismo de Poulos y Kraut (1980). Con su segundo átomo de oxígeno (O2), forma enlaces de hidrógeno con el átomo Nε2 del residuo His42 (2,31 Å), con el átomo Nε del residuo Arg38 (2,73 Å) y con una molécula de agua (Wat1) (2,47 Å), que a su vez está unida mediante un enlace de hidrógeno a otra molécula de agua (Wat2) (2,83 Å) y al grupo -NH₂ del residuo Arg38 (2,82 Å). Estas dos moléculas de agua, altamente conservadas en la cavidad distal del grupo hemo de las peroxidasas de clase III, son muy importantes en los procesos de catálisis ácido-base.

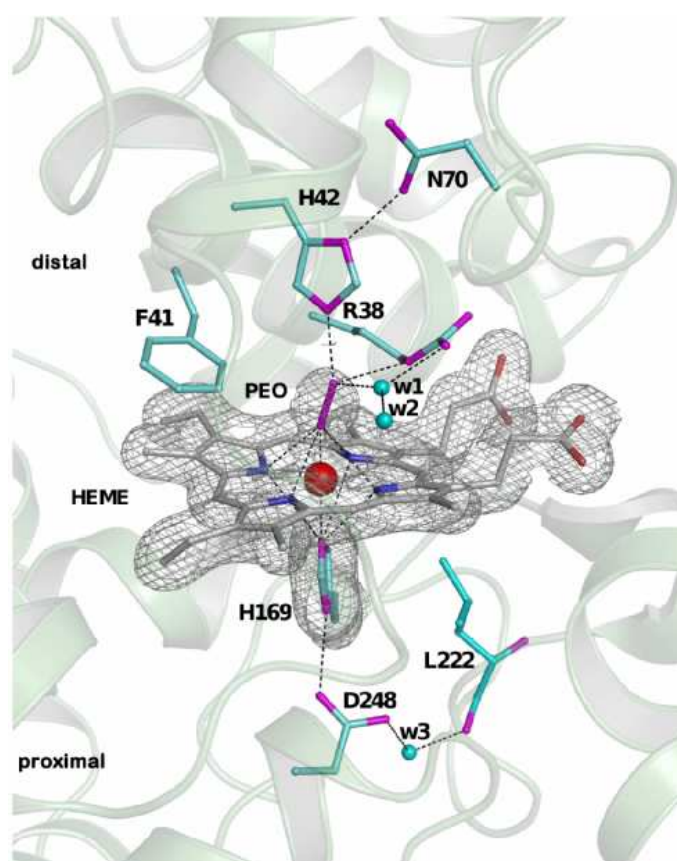


Figura 70. Estructura del centro activo de la peroxidasa de palma real (RPTP). Se observa el mapa de densidad electrónica $1,5\sigma$ $2F_o - F_c$ en la cavidad del centro activo de la RPTP. El grupo hemo (gris) tiene un átomo de hierro (rojo). La molécula de peróxido de hidrógeno (rosa) está unida covalentemente al átomo de hierro que también está conectado a la His169 proximal. Sobre el plano hémico hay cuatro residuos invariantes, Arg38, Phe41, His42 y Asn70, y dos moléculas de agua (W1 y W2) que participan en la catálisis de peróxidos. En el plano proximal, existe otra molécula de agua (W3) conservada. Los enlaces de hidrógeno se representan con trazo discontinuo. Las distancias entre los residuos se conocen.

Los aminoácidos más importantes en el lado distal del plano hémico son Arg38, Phe41, His42 y Asn70, todos ellos conservados, tanto en peroxidasas aniónicas (RPTP y SBP) como en catiónicas (cHRP y PNP) (Welinder, 1992). La voluminosa cadena lateral del residuo fenilalanina dificulta el acceso de átomos al hierro

hémico y, por ello, el grupo hemo tiene una arquitectura muy compacta, otra de las características de las peroxidasas de clase III.

Los residuos Arg38 e His42 son muy importantes en los procesos de catálisis ácido-base ya que son los que intervienen en la ruptura del enlace O-O de la molécula de peróxido de hidrógeno. De acuerdo con el mecanismo catalítico propuesto por Poulos y Kraut (1980), el átomo Nε2 del residuo His42 actúa como un aceptor de protones, provocando el enlace de la molécula de peróxido a la sexta posición de coordinación del hierro hémico. El grupo -NH₂ de la Arg38 estabiliza la carga con ayuda de una molécula de agua cercana, durante la formación del complejo entre la enzima y el peróxido de hidrógeno.

En la estructura tridimensional de la RPTP, la His42 distal se encuentra a 5,68 Å del átomo de hierro hémico e interacciona con el peróxido de hidrógeno y con el residuo Asn70. Sin embargo, los residuos Arg38, Asn70 y una molécula de agua (Wat3) están en la hendidura del grupo hemo, como ocurre en muchas peroxidasas. El residuo His tiene carácter básico, marcado por la formación de un enlace de hidrógeno entre el átomo Nδ1 de su cadena lateral y el átomo Oδ1 de la cadena lateral de la Asn70 (2,57 Å). Este enlace de hidrógeno es un tipo de interacción conservada en las peroxidasas de plantas y de hongos. Cuando se reemplaza el residuo Asn70 por Val o Asp en cHRP se produce una reducción en la velocidad de formación del Col.

En el lado proximal (inferior) del plano hémico, los residuos His169 y Asp248 están altamente conservados y son muy importantes en la estabilización de los diferentes estados de oxidación del hierro hémico. En la estructura de la RPTP, el residuo His169 está unido covalentemente al átomo de hierro hémico (2,17 Å) a través del átomo Nε2 de su cadena lateral y está también unido, mediante un enlace de hidrógeno, al grupo carboxilato del Asp248 a través de su átomo Nδ1 (2,90 Å). El enlace de hidrógeno His-Asp, de carácter fuerte, es un rasgo característico de las peroxidasas de plantas y es el responsable del carácter imidazólico del ligando de histidina proximal. Ya que en el modo de interacción con el residuo Asp248, la orientación paralela del plano imidazólico en el eje del grupo hemo N-Fe-N aumenta la densidad electrónica alrededor del átomo de Fe, esto fortalece la interacción entre la His169 y el hierro hémico.

El residuo His proximal de la RPTP está indirectamente acoplado al sitio que ocupa el calcio proximal, a través de la cadena lateral del residuo adyacente Ser170, que es un ligando del calcio. Hay otra molécula de agua (Wat3) conservada que está unida mediante enlaces de hidrógeno al átomo de Oδ2 de la cadena lateral del Asp248 (2,86 Å) y al átomo de oxígeno del esqueleto del residuo Leu222 (2,72 Å). Este residuo, Leu222, es paralelo a la His169. Las peroxidasas aniónicas de plantas RPTP y SBP tienen un residuo de

Leu. Sin embargo, en su lugar, en las peroxidasas catiónicas de clase III (PNP y cHRP) y clase II (LIP y MnP), hay un residuo aromático (Schuller et al., 1996). La Phe221 de la cHRP y la Phe190 de la MnP son estructuralmente equivalentes a la Leu222 de la RPTP, interaccionando ésta hidrofólicamente con la His proximal. La mutágenesis dirigida de la Phe221 por Met en cHRP causa la pérdida de las interacciones hidrofólicas con el residuo de His proximal, lo cual influye en la red de enlaces de hidrógeno del grupo hemo (Howes et al., 2001b).

5.9.4.3. El canal de acceso del sustrato

Las peroxidasas de plantas utilizan el peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Gajhede, 2001). No obstante, la especificidad al sustrato puede estar condicionada por los residuos presentes en la canal de acceso, que conecta la cavidad distal con la superficie del peróxido. La molécula de peróxido de hidrógeno difunde desde la superficie proteica al hueco hémico distal y, posteriormente, el sustrato se enlaza a las cadenas laterales de aminoácidos hidrofólicos que recubren el canal de acceso. A pesar de que hay residuos altamente conservados en las peroxidasas de clase III en las cavidades distal y proximal, los residuos de naturaleza hidrofólica Phe68, Gly69, Pro139, Ala140, Pro141, Phe142 y Phe179 (numeración de la cHRP) varían su posición a lo largo de la secuencia y se sitúan normalmente en los extremos del grupo hemo (Fig. 71). En el caso del complejo formado entre la cHRP y el ácido benzohidroxámico (cHRP-ABH), los residuos Phe68 y Phe179 se encuentran situados de manera que mantienen la molécula de sustrato bloqueada dentro del centro activo y cerca del grupo hemo. Si el sustrato ABH se sustituye por ácido ferúlico (AF), el residuo Phe68 gira hacia el exterior proteico y, sin embargo, la Phe179 mantiene la misma orientación (Henriksen et al., 1998; 1999). Se observa que el residuo Phe68 de la cHRP se corresponde con residuos alifáticos como la Ile68 en la RPTP y la Leu68 en la SBP. También, el residuo Phe179 de la cHRP se corresponde con los residuos Ser178 en la RPTP y Thr178 en la SBP. La estructura cristalina de la cHRP indica que el residuo Phe179 dificulta la formación del complejo estable 1:1 entre la enzima y los sustratos aromáticos, ya que está posicionado cerca del extremo hémico y estéricamente obstaculiza el paso del sustrato por el canal de acceso. En la mayoría de las peroxidasas de clase III, como RPTP y SBP, el residuo Phe179 (cHRP) está desplazado una posición en la secuencia para que su cadena lateral se encuentre fuera del canal de acceso del sustrato al centro activo.

En el sitio de enlace a la molécula de peróxido en la cavidad distal de la RPTP, el átomo de hierro se encuentra a una distancia de 4,95 Å de la molécula de agua (Wat1), distancia muy superior a la que aparece en otras peroxidasas de clase III: cHRP (3,2 Å), PNP (3,1 Å) y SBP (4,0 Å). Ello puede influir en la presencia

de una molécula de peróxido de hidrógeno en el hueco distal y, también, en la existencia de una molécula cargada positivamente de MES en el sitio exterior de enlace del sustrato. La molécula de agua (Wat1) está desplazada en la cavidad distal de SBP, PNP y cHRP y ocupa la posición del átomo de oxígeno de la molécula de peróxido de hidrógeno encontrada en la estructura tridimensional de RPTP.

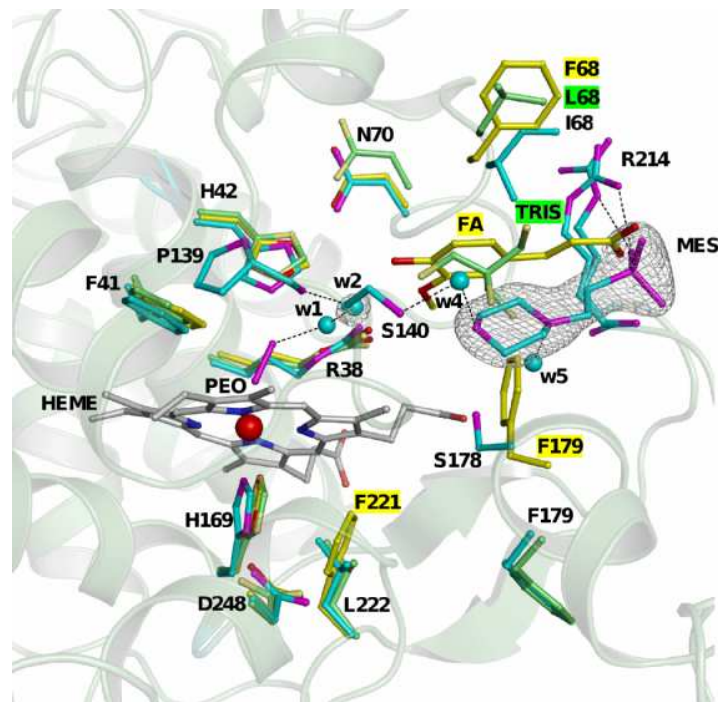


Figura 71. Superposición de los centros activos de la RPTP (azul), del complejo cHRP:AF (amarillo) y del SBP:TRIS (verde). El grupo hemo (gris) y la molécula de peróxido de hidrógeno PEO (rosa) pertenecen a la estructura de la RPTP. También, la numeración de los residuos de los dominios distal y proximal corresponde a la RPTP. La molécula de MES está contorneada por el mapa de densidad electrónica $1,5\sigma$ $2F_o-F_c$ y está situada cerca de un sitio secundario de unión a sustratos que, también, ha sido descrito para los complejos cHRP:AF y SBP:TRIS. Los residuos conservados en las tres estructuras se marcan en negrita, los que no están conservados para la cHRP y SBP están sombreados de color amarillo y verde, respectivamente.

En la RPTP, la molécula de agua (Wat1) está unida mediante enlace de hidrógeno a otra molécula de agua (Wat2) (2,83 Å). Esta molécula de agua, a su vez, está unida mediante enlace de hidrógeno al átomo de oxígeno del residuo Pro139 (2,83 Å). El residuo Pro139 y las dos moléculas de agua están altamente conservados, perteneciendo el residuo al motivo estructural P-X-P que ocupa en la secuencia de la cHRP la posición 139-141. Este motivo se relaciona con el sitio de enlace del sustrato en las peroxidasas de plantas. Aunque la Pro139 está altamente conservada y es importante en la oxidación de los sustratos, no ocurre lo mismo con la Pro141. El residuo "X" en las peroxidasas cHRP y SBP es una Ala140 (no polar), componente importante del sitio de enlace. En la RPTP, se sustituye por una Ser140 (polar). El átomo de oxígeno de la cadena lateral de la Ser140 se une mediante enlace de hidrógeno a la molécula de agua (Wat4) (2,56 Å),

la cual, a su vez, mediante la misma interacción, se une a un átomo de oxígeno de la molécula de MES (2,92 Å). El átomo N4 de la molécula de MES se une a otra molécula de agua Wat5 (3,08 Å). Además, la molécula de MES se encuentra atrapada mediante interacciones de largo alcance que aparecen entre su átomo de oxígeno sulfúrico y los átomos de nitrógeno de la Arg214: un N de su esqueleto (2,92 Å) y un nitrógeno del grupo $-NH_2$ de su cadena lateral (3,36 Å).

Al igual que la estructura de RPTP muestra una molécula de MES, la SBP presenta en su estructura una molécula de TRIS (código 1fhf, PDB) (Henriksen et al., 2001). Las moléculas de tampón se encuentran normalmente en sitios secundarios de unión de sustratos y sugieren que estas sustancias son potenciales inhibidores de la actividad enzimática de estas enzimas (Henriksen et al., 2001).

5.9.4.4. El entorno del grupo hemo

El grupo hemo es limitante en la catálisis de las peroxidasas, influyendo su correcta orientación con respecto a los residuos catalíticos vecinos sobre la reactividad con el peróxido de hidrógeno y la formación del Col. La correcta orientación del grupo hemo se debe a las interacciones entre los grupos hémicos propionatos y los residuos vecinos y, también, a los enlaces de coordinación entre el átomo de hierro y el residuo His169 proximal.

En la estructura de la RPTP, los residuos distales Arg75, Val173, His175 y Ser178 están unidos mediante enlaces de hidrógeno a los átomos de oxígeno de las cadenas laterales de los propionatos hémicos. El residuo mejor orientado con respecto al propionato hémico es la Arg75, el cual interacciona a través de sus átomos de nitrógeno $N\epsilon$ y $-NH_2$ con los grupos carboxilato. Por otro lado, existen interacciones de largo alcance entre el residuo catalítico distal Arg38 y el átomo de oxígeno O δ 1 de la cadena lateral del propionilo a través de una molécula de agua (Wat6) (Fig. 72).

En todas las peroxidasas de plantas estructuralmente caracterizadas, sólo aparece una interacción propionilo hémico-proteína distinta. En la cHRP, un residuo Q176 se une mediante enlace de hidrógeno a un propionilo hémico, que, a su vez, está enlazado con la cadena lateral de la Ser73 y está situado cerca de la entrada del canal de acceso al sustrato. En la estructura de la RPTP, el mismo propionato no se une a una glutamina sino que se une mediante enlaces de hidrógeno a dos residuos, His175 y Ser178 (estructuralmente equivalente a la Phe179, este último), y a una séptima molécula de agua (Wat7), que está conservada en ambas peroxidasas (RPTP y cHRP). Es interesante indicar que los propionatos hémicos en RPTP y SBP se encuentran girados, en cambio en las peroxidasas cHRP y PNP están orientados de manera

paralela entre sí. Estas diferentes interacciones hacen que en las peroxidasa de clase III puedan influir en la estabilidad y propiedades catalíticas de estas enzimas.

Dos α -hélices antiparalelas (B y F) de dos dominios (distal y proximal) forman una cavidad hidrofóbica en la que se encuentra el grupo hemo. Este grupo aromático está formado por los residuos Phe41, Phe45, Phe143 y Phe152 (distales) y Phe275 (proximal). El acceso al hierro hémico está impedido estéricamente por la existencia del residuo aromático Phe41 que interacciona mediante un solapamiento π con el grupo porfirina (3,5 / 4,0 Å), limitando la actividad peroxigenasa de la enzima (Colas *et al.*, 2004). Mutaciones del residuo Phe41 en la cHRP indican que la hidrofobicidad del centro activo es un factor muy importante para la catálisis enzimática. Además, en la actividad catalítica influye la correcta orientación del grupo hemo con respecto de los residuos distales His42 y Arg38, dependiendo su localización de las interacciones entre los propionatos hémicos y las cadenas laterales de los residuos vecinos cargados positivamente. Por ello, los propionatos hémicos están directamente implicados en la estabilidad del centro activo y, por lo tanto, en la formación de los intermediarios catalíticos.

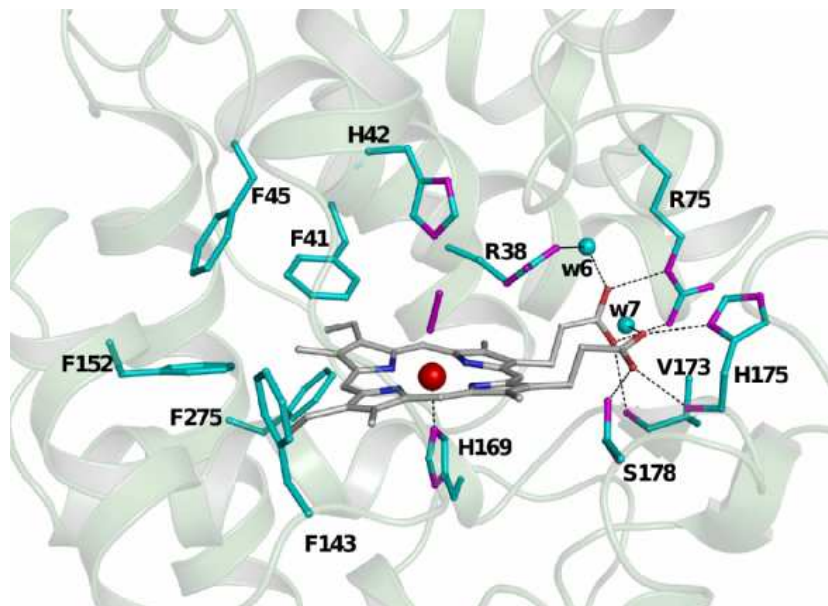


Figura 72. Entorno del grupo hemo de la RPTP. En él, aparecen algunos residuos aromáticos altamente conservados que forman el bloque hidrofóbico. Las interacciones entre los grupos propionilos hémicos y el esqueleto proteico están marcadas con líneas de trazo discontinuo. El átomo de hierro y las moléculas de agua están representados por esferas de color rojo y azul, respectivamente

5.9.4.5. El entorno de los átomos de calcio

La RPRP, al igual que otras peroxidasas de clase III (cHRP, PNP, SBP y BP1) y clase II, también, posee dos átomos de calcio, cada uno de ellos a un lado del hierro hémico, uno en la cavidad distal y otro en la proximal. La estructura tridimensional de la RPTP indica que la distancia entre el átomo de calcio distal y el átomo de hierro es de 15,6 Å, mientras que el átomo de calcio proximal se encuentra a 13,4 Å. La distancia entre los dos átomos de calcio es de 26,7 Å (Fig. 73). Los dos átomos de calcio están heptacoordinados, con una distancia de coordinación media de 2,4 Å, a diferentes átomos de oxígeno que pertenecen a grupos carbonilo y cadenas laterales de los residuos Asp, Gly, Ser, Val y Thr y, también, a moléculas de agua estructural (Wat8).

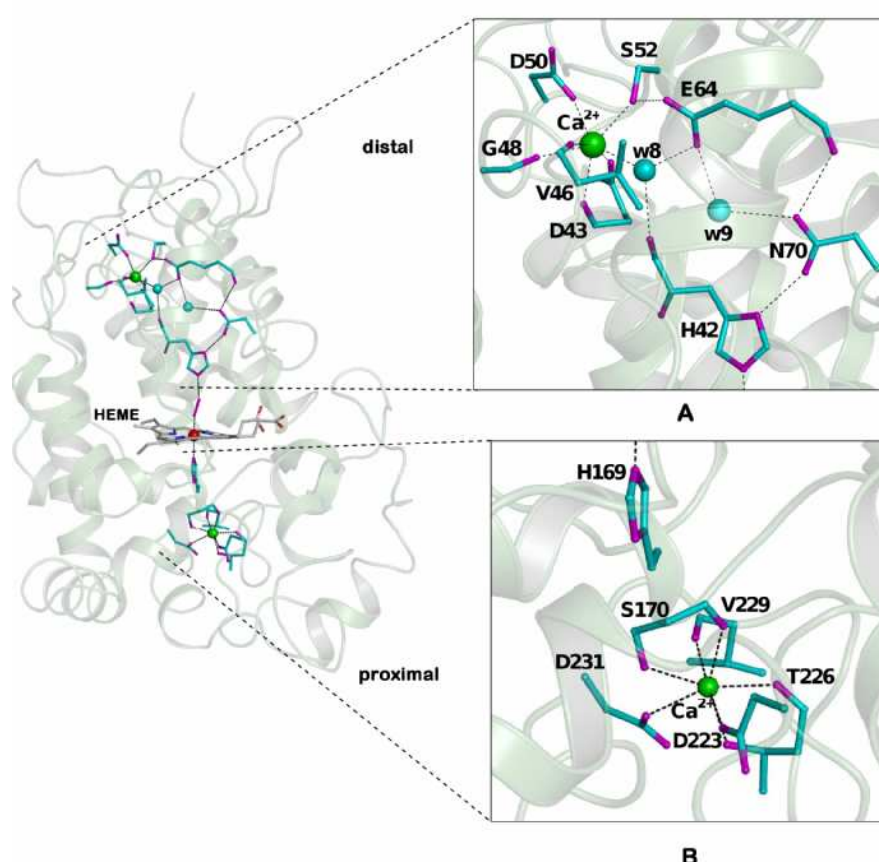


Figura 73. Conexión de los iones calcio a través de una red de enlaces de hidrógeno en la RPTP. Sitio de unión del calcio distal (A) y proximal (B). Los ligandos se muestran mediante representaciones de líneas. Los átomos de calcio son esferas verdes y las moléculas de agua esferas azules. Hay una red de enlaces de hidrógeno que une los iones calcio distal y proximal de la RPTP, éstos se muestran con líneas de trazo discontinuo.

Todos los residuos que rodean al calcio distal están conservados en las peroxidasas de plantas de clase III (His42, Asp43, Cys44, Val46, Gly48, Cys49, Asp50, Ser52 y Glu64), estando, también, una molécula de agua (Wat8) que hace de mediador entre el ión calcio y el residuo catalítico His42. El ión calcio interactúa con el átomo de oxígeno del esqueleto de los residuos Asp43, Val46 y Gly48 y con átomos de

oxígeno de las cadenas laterales de los residuos Asp43, Asp50 y Ser52. Adicionalmente, existe una conexión entre el calcio distal y el centro activo de la RPTP mediante el residuo Glu64. El átomo de oxígeno del esqueleto del Glu64 forma un enlace de hidrógeno con el N δ 2 de la cadena lateral de la Asn70 (2,96 Å) que interacciona con la His42. Además, el átomo de oxígeno O ϵ 1 del Glu64 interacciona con el ión calcio a través de dos moléculas de agua estructural, Wat8 (2,52 Å) y Wat9 (2,82 Å), esta última unida mediante enlace de hidrógeno al residuo Asn70. Por ello, la presencia del calcio distal estabiliza la red de enlaces de hidrógeno y reduce la movilidad del residuo catalítico His42.

Alrededor del átomo de calcio proximal, también aparecen residuos conservados en las peroxidasas de plantas de clase III, Ser170, Asp213, Asp223, Thr226 y Val229, residuos que poseen los sitios de enlace del ión metálico. Hay una conexión conservada entre el ión calcio y el residuo His169, a través de la cadena lateral del residuo adyacente Ser170. El átomo de oxígeno del esqueleto de la Ser170 es, también, un ligando del calcio. Además, los átomos de oxígeno (cadena lateral y cadena principal) del residuo Thr226 están conectados al calcio proximal. Los átomos de oxígeno de las cadenas laterales de los residuos Asp223 y Asp231 y el átomo de oxígeno del esqueleto de la Val229 contribuyen a la formación de la cavidad en la que se encuentra el ión metálico.

Los iones calcio (distal y proximal) están situados al final de las α hélices B y F, respectivamente. Además, los residuos que siguen a la His42 (distal) y la His169 (proximal) son ligandos del calcio.

La estructura tridimensional de la RPTP, al igual que la de otras peroxidasas de clases II y III, tiene una extensa red de enlaces de hidrógeno altamente conservada, que une los residuos de ambas cavidades (distal y proximal) del plano hémico y cuya extensión alcanza, también, a los iones calcio. Esta red actúa como un conducto del flujo de electrones entre ambas regiones. También, se ha observado, mediante datos cristalográficos, por métodos espectroscópicos y de mutagénesis dirigida para la cHRP y otras enzimas (Dunford, 2001; Veitch, 2004).

Aunque la función de los iones calcio en las peroxidasas no ha sido determinada todavía, se sabe que influyen en la actividad proteica y en la configuración estructural del grupo de las peroxidasas de clases II y III (Ogawa et al., 1979). Además, la eliminación de los átomos de calcio causa una reorientación de los residuos del hueco hémico, desplazando el residuo His, importante en el proceso de catálisis, por lo que se reduce su funcionalidad. La pérdida de la actividad enzimática no sólo ocurre con la eliminación del grupo hemo, sino también lo hace al eliminar de la estructura proteica los iones calcio o los glicanos (van Hyustee et al., 2004).

5.9.4.6. La estructura de los carbohidratos

Los análisis MALDI-TOF-MS revelan que la RPTP tiene un contenido de carbohidratos en su estructura nativa del 24,3%. Este dato se obtiene de la diferencia de masas (10,8 kDa) entre los valores de la masa molecular de la RPTP experimental (44596 kDa) y la calculada (33768 kDa). Como la mayoría de las peroxidasas de clase III, la RPTP nativa tiene un elevado porcentaje de glicosilación en su estructura tridimensional. Todos los sitios de N-glicosilación se encuentran en la superficie de giros o zonas de unión de hélices, con los glicanos orientados hacia el exterior proteico en contacto con el disolvente. La secuencia de aminoácidos revela la existencia de 12 Asn que pueden estar glicosiladas, pero no todas están igualmente pobladas, como indican los análisis de MALDI-TOF-MS y confirman los estudios tridimensionales de la RPTP (Fig. 74).

El mapa de densidad electrónica revela claramente nueve sitios de unión a glicanos, que se encuentran en los residuos Asn8, Asn28, Asn114, Asn144, Asn154, Asn211, Asn256, Asn267 y Asn298 (Fig. 74A). Los análisis MALDI-TOF-MS (Tabla XXXVIII) indican que los residuos Asn de las posiciones 8, 28, 144, 187 y 298 están glicosilados y los de las posiciones 71, 114 y 154 se caracterizaron como residuos no glicosilados en algunos péptidos tripticos (Tabla XXXVI). La diferencia existente entre los perfiles de glicosilación obtenidos de los mapas de densidad electrónica y de los análisis experimentales MALDI-TOF-MS indicaría que la RPTP tiene diferentes glicofomas. Las glicoproteínas existen como mezclas complejas de sus diferentes variantes glicosiladas, debido a los diferentes pasos de glicosilación que ocurren en el interior celular (Bohne-Lang *et al.*, 2002).

Las cadenas de glicanos unidas a la RPTP contienen diferentes azúcares: N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), manosa (Man), fucosa (Fuc) y xilosa (Xyl). Existen tres secuencias de glicanos, previamente determinadas mediante análisis CID-MS/MS (Tabla XXXVIII), que son: Man-[Xyl]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc, GlcNAc-Man-[Man]Man-GlcNAc[Fuc]GlcNAc y [Man]Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc. Debido a la flexibilidad inherente de los oligosacáridos, los mapas de densidad electrónica impiden una asignación completa del orden espacial de las cadenas de carbohidratos. El glicano que mejor fue caracterizado mediante la estructura de Rayos X fue Man-[Xyl]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc, estando unido a la Asn8. La densidad electrónica 1σ $2F_o - F_c$ confirma puntos de ramificación 1-3 y 1-4 en la primera molécula de GlcNAc y claramente muestra que la primera molécula de manosa se encuentra unida a una segunda molécula de GlcNAc, dos moléculas de Man y una de Xyl (Fig. 74B).

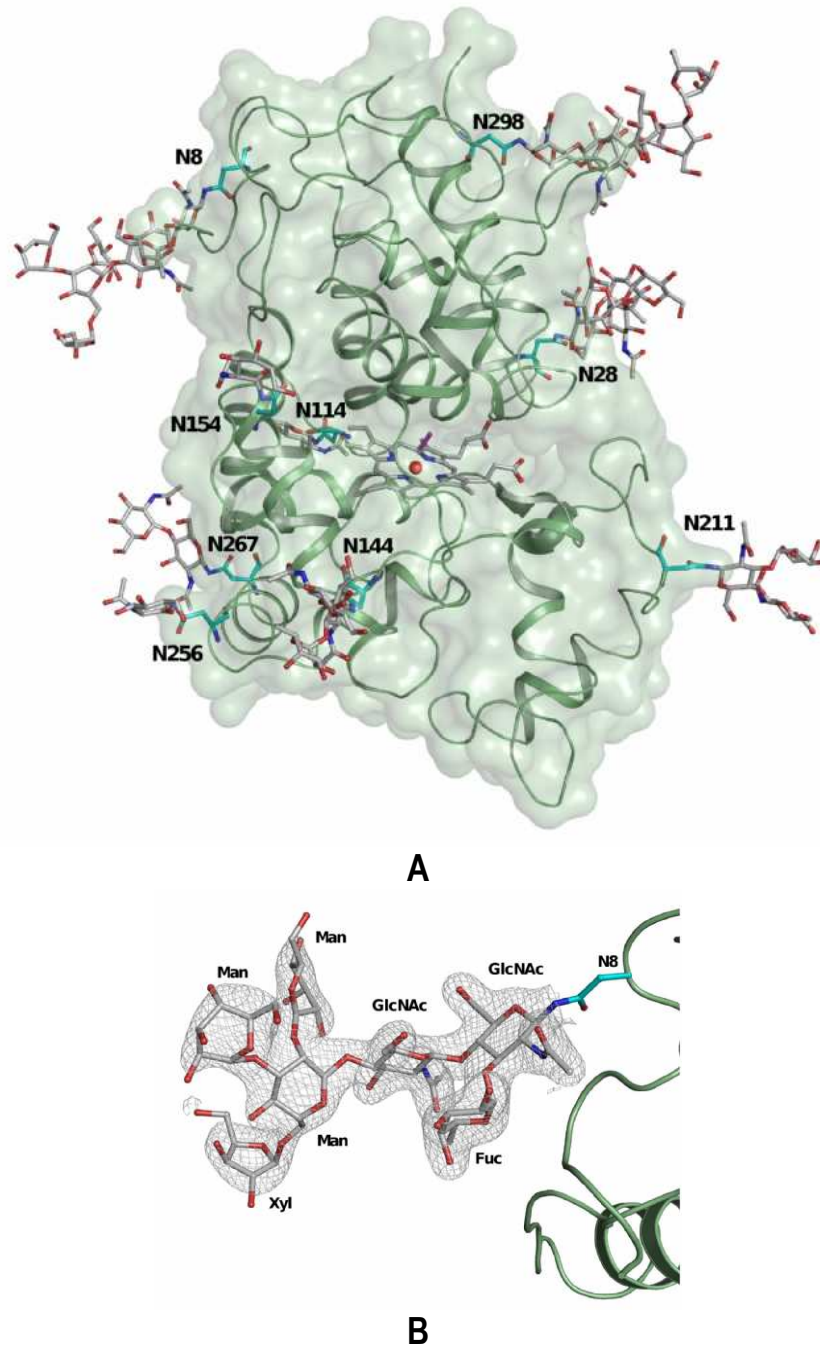


Figura 74. Representación esquemática de las nueve cadenas de glicanos N-unidas de la RPTP. (A) Estructura cristalina de la RPTP que muestra las cadenas de carbohidratos unidas a los residuos de Asn. Están distribuidos uniformemente y hacia el exterior de la superficie proteica. (B) Representación detallada de la superficie proteica alrededor del residuo Asn8. El mapa de densidad electrónica $1,0\sigma$ ($2F_o - F_c$) muestra el oligosacárido unido a la Asn8: Man-[Xyl]Man-Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc.

Los análisis de la estructura cristalina de la RPTP indican que los residuos Asn28 y Asn298 contienen los oligosacáridos [Man]Man-GlcNAc-[Fuc]GlcNAc y GlcNAc-Man-[Man]Man-GlcNAc[Fuc]GlcNAc, respectivamente. Se esperaba que los residuos Asn8, Asn28 y Asn298 contuvieran glicanos de gran tamaño de acuerdo al tamaño de los glicopéptidos trípticos T41 y T9 (Tabla XXXVIII). Sin embargo, los residuos

Asn28 y Asn298 tienen glicanos pequeños que contienen, al menos, cinco carbohidratos. El mapa de densidad electrónica revela que en los residuos Asn144 y Asn211 se encuentra covalentemente unido el trisacárido GlcNAc-[Fuc]GlcNAc, mientras que en los residuos Asn114, Asn154 y Asn267 sólo hay unido un monosacárido, GlcNAc. Los seis residuos Asn que se encuentran dentro de la secuencia consenso NXS/T son sitios potenciales de N-glicosilación.

Son muy pocas las estructuras de Rayos X que muestran sus glicanos en los mapas de densidad electrónica de la glicoproteína. La flexibilidad inherente y la heterogeneidad de las cadenas de oligosacáridos dificultan el crecimiento cristalino e impiden el conocimiento de su completa ordenación espacial. Es más frecuente cristalizar y resolver estructuras de Rayos X de enzimas recombinantes, cuya falta de glicosilación influye en la estabilidad y conformación proteica. La glicosilación es una modificación post-translacional relacionada con el reconocimiento celular y que está implicada directamente en la estabilidad y plegamiento proteico. Los glicanos hidrofílicos alteran las propiedades estructurales de las proteínas, aumentan su solubilidad en solventes acuosos y las protegen de la proteólisis. A veces, las diferentes configuraciones de los glicanos N-unidos proporcionan funciones específicas: mantenimiento de la producción proteica en el retículo endoplasmático (RE), transporte intracelular y transporte de la proteína madura al espacio extracelular.

5.10. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO ESTADÍSTICO

Aunque la superfamilia de peroxidasas de plantas, en función de su origen biológico y su secuencia primaria, está dividida en tres clases (I, II y III), todas ellas tienen elementos estructurales y plegamientos similares, tales como el grupo hemo y algunos residuos importantes del centro catalítico (His proximal y Arg e His distales).

Para analizar las características descriptivas de cada una de las clases de la superfamilia de peroxidasas de plantas, se aplicará un análisis de acoplamiento estadístico (SCA) al amplio grupo de peroxidasas no animales. Usando las secuencias de 393 proteínas, en primer lugar se evaluará la energía de conservación de cada sitio (ΔG^{estad}), midiendo la discrepancia que presenta cada aminoácido entre la frecuencia de encontrarlo en cada posición de la secuencia y la de encontrarlo en la naturaleza.

Dieciséis residuos tienen valores de ΔG^{estad} elevados (Tabla XLIII) y corresponden al núcleo conservado de las tres clases de peroxidasas de plantas. Este núcleo se muestra en la estructura cristalina de la RPTP (Fig. 75), en la que los colores utilizados vienen definidos por la métrica SCA para ΔG^{estad} . Los

residuos más conservados, His169 e His42, presentan valores de ΔG^{estad} muy altos, confirmando que son residuos muy importantes dentro del centro catalítico de la enzima (Newmyer *et al.*, 1996; Erman *et al.*, 1993).

Tabla XLIII. Parámetros estadísticos, ΔG^{estad} , para los 16 aminoácidos más conservados en la superfamilia de peroxidases de plantas.

Ranking	AA	Posición	ΔG^{estad}	$\Delta G^{\text{estad}}_{\text{normalizada}}$	Descripción funcional en la RPTP
1	His	169	1470,94	100	Residuo catalítico proximal
2	His	42	1420,25	96,55	Residuo catalítico distal
3	Phe	152	1162,04	78,99	Hidrofobicidad del plano hémico
4	Lys	84	1155,45	78,55	Puente salino con Glu88
5	Arg	123	1091,28	74,19	Puente salino con Asp99
6	Arg	38	1079,96	73,42	Residuo catalítico distal
7	Ser	96	1050,74	71,43	Interacción con Arg123
8	His	175	1014,35	68,96	Interacción con un propionato hémico
9	Asp	99	1010,43	68,69	Puente salino con Arg123
10	Asp	125	1010,41	68,69	Interacción con Cys97
11	Asp	248	1002,66	68,16	Residuo catalítico proximal
12	Gly	172	926,39	62,98	Curvatura de su propio polipéptido
13	Gly	122	926,38	62,97	Curvatura de su propio polipéptido
14	Leu	165	921,95	62,68	Hidrofobicidad del plano hémico
15	Ser	170	845,98	57,51	Coordinación y enlace con el calcio
16	Gly	167	819,91	55,74	Curvatura correcta del polipéptido

El tercer residuo más conservado es la Phe152, que se encuentra cerca del anillo porfirina e intensifica la hidrofobicidad alrededor de la porción hémica. El carácter hidrofóbico del centro activo es muy importante para el enlace del sustrato y el progreso del proceso catalítico, como lo demuestran estudios espectroscópicos con cHRP con un grupo prostético hémico modificado (Feng, *et al.*, 2008). Además, el residuo Arg38, altamente conservado, contribuye a mantener el ambiente hidrofóbico alrededor del hueco hémico para prevenir la entrada de moléculas de agua, como se observa en la simulación de dinámica molecular de la cHRP (Tatoli *et al.*, 2009). El residuo Arg38, también, está envuelto en la ruptura heterolítica del enlace O-O y en el mantenimiento de la distancia y orientación adecuada entre el residuo catalítico His42 y el grupo hemo-H₂O₂ en cHRP (Tatoli *et al.*, 2009).

Otros residuos que tienen altos valores de la energía de conservación son Lys84 y Arg123, los cuales forman puentes salinos con los residuos Glu88 y Asp99, respectivamente. Aunque el Glu88 sólo se conserva en el 40,3% en las peroxidases de plantas, forma un puente salino con un residuo altamente conservado como es la Lys84 (98,2%) cerca del extremo de la hélice C en RPTP. Por otro lado, el puente salino Arg123/Asp99 (Veitch *et al.*, 2004) está oculto en todas las peroxidases de plantas, fijando el bucle CD a lo largo del bucle DE en el lado distal del plano hémico. Además, el oxígeno del esqueleto de la Arg123 interacciona con el grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo Ser96, adyacente a la Cys97 en RPTP.

Otro residuo altamente conservado es el Asp125, que forma un enlace de hidrógeno con el átomo de nitrógeno de la Cys97 (a través de su átomo O δ 1) y de la Arg296 (a través de su átomo O δ 2) en RPTP. Hay que anotar que el átomo NH1 de la Arg296 se une mediante un enlace de hidrógeno al oxígeno del esqueleto del residuo Cys299, que a su vez forma un enlace disulfuro con la Cys97 y conecta el bucle CD con el C-terminal de la proteína RPTP.

Algunos residuos son importantes para el mantenimiento de las características estructurales de la cadena polipeptídica alrededor del grupo prostético, como es el caso de la His175 que se une mediante enlace de hidrógeno al propionato hémico y al Asp248, que interviene en la catálisis enzimática mediante la formación de un enlace de hidrógeno fuerte con un residuo conservado al 100% (His169). Éste, a su vez, está conectado con el sitio del calcio proximal mediante el residuo Ser170, que es un ligando del calcio en la RPTP. Hay que añadir que algunas glicinas (122, 167 y 172) están bastante conservadas en las peroxidasas de plantas, debido a que intervienen en el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica. Por otro lado, el residuo hidrofóbico conservado Leu165 está cerca de otro residuo altamente conservado, Phe152, contribuyendo ambos a fortalecer la hidrofobicidad del plano hémico, que es necesaria para una catálisis enzimática eficiente.

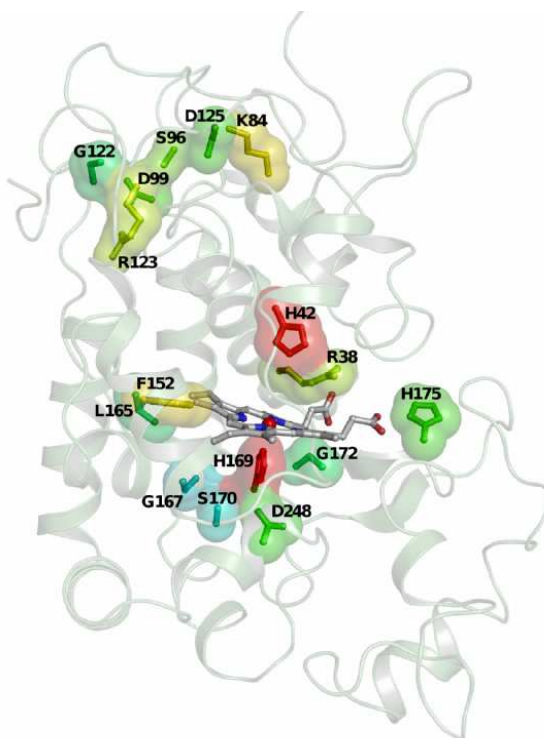


Figura 75. Representación en cinta de la peroxidasa de palma real, en la que se muestran los 16 residuos más conservados, de acuerdo al parámetro ΔG^{estad} (energía de conservación de sitio). Los que poseen un alto valor de esta energía, están altamente conservados (rojos), los que poseen una baja energía de conservación, están poco conservados (azules).

Se observa que los residuos altamente conservados, identificados mediante un análisis SCA de ΔG^{estad} , se encuentran todos ellos en los alrededores del grupo hemo a ambos lados, ello coincide con la importancia estructural y funcional que tienen dentro de las peroxididasas.

Para examinar la co-evolución de las parejas de residuos dentro de la superfamilia de peroxididasas de plantas, se calculará el parámetro $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ (energía de acoplamiento estadístico). Para ello, se introduce un cambio en la distribución de un residuo y se observa el impacto que genera esa perturbación en el resto de posiciones. Si la frecuencia de la distribución de un aminoácido en una posición cambia al introducir una perturbación, indica entonces, que esos dos aminoácidos están acoplados, presentando un alto valor de la energía de acoplamiento estadístico ($\Delta\Delta G^{\text{estad}}$).

El análisis de acoplamiento estadístico parte de una matriz inicial (244 filas x 263 columnas) de valores de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ para todos los pares de residuos posibles en la superfamilia de peroxididasas de plantas. La matriz inicial se somete a una serie de agrupaciones iterativas, donde las filas y columnas con valores de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ similares se agrupan. Como resultado final, se obtiene una matriz de 28 posiciones de MSA (filas) y 127 perturbaciones (columnas) que revela pares de residuos altamente acoplados (zonas rojas y naranjas) y otros grupos de residuos no acoplados (zonas azules) (Fig. 76). Además, es posible identificar siete pequeños *clusters*, con perfiles de acoplamiento similares, ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 500$). Para identificar la relevancia funcional de estos “*clusters*”, las parejas de aminoácidos correlacionadas estadísticamente se introdujeron en la estructura tridimensional de la enzima RPTP.

El “*cluster*” 1 indica que las posiciones 91 y 97 están acopladas a 17 perturbaciones, las cuales están irregularmente distribuidas dentro de la estructura terciaria de la RPTP. Estos residuos están distribuidos en las hélices B (Asp43, Cys44), B' (Ser52, Leu54), B'' (Glu64), D (Arg106) y D' (Pro139) y en bucles de conexión de algunas de ellas, BB' (Gly48, Cys49, Asp50), CD (Cys91, Val95, Cys97) y EF (Leu157), en el plano distal y en el plano proximal en la hélice F' (Cys176, Arg182) y en el bucle conector F''β2 (Cys208). Además, una fuerte correlación ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 550$) entre 12 de los 17 aminoácidos, surge del “*cluster*” 1 (Fig. 77A). Las posiciones 91 y 97 muestran un cambio en la distribución de sus aminoácidos en cualquiera de esas doce perturbaciones, lo que causa un aumento del porcentaje de los residuos cisteína del 46,4 al 97-100%. Introduciendo esos 12 residuos dentro de la estructura de la RPTP, se observa que seis se encuentran alrededor del sitio del calcio distal (Asp43, Cys44, Gly48, Cys49, Ser52 y Glu64) y están evolucionando como cuatro residuos cisteína que forman tres enlaces disulfuro en la RPTP (Cys91, Cys97, Cys176 y Cys208).

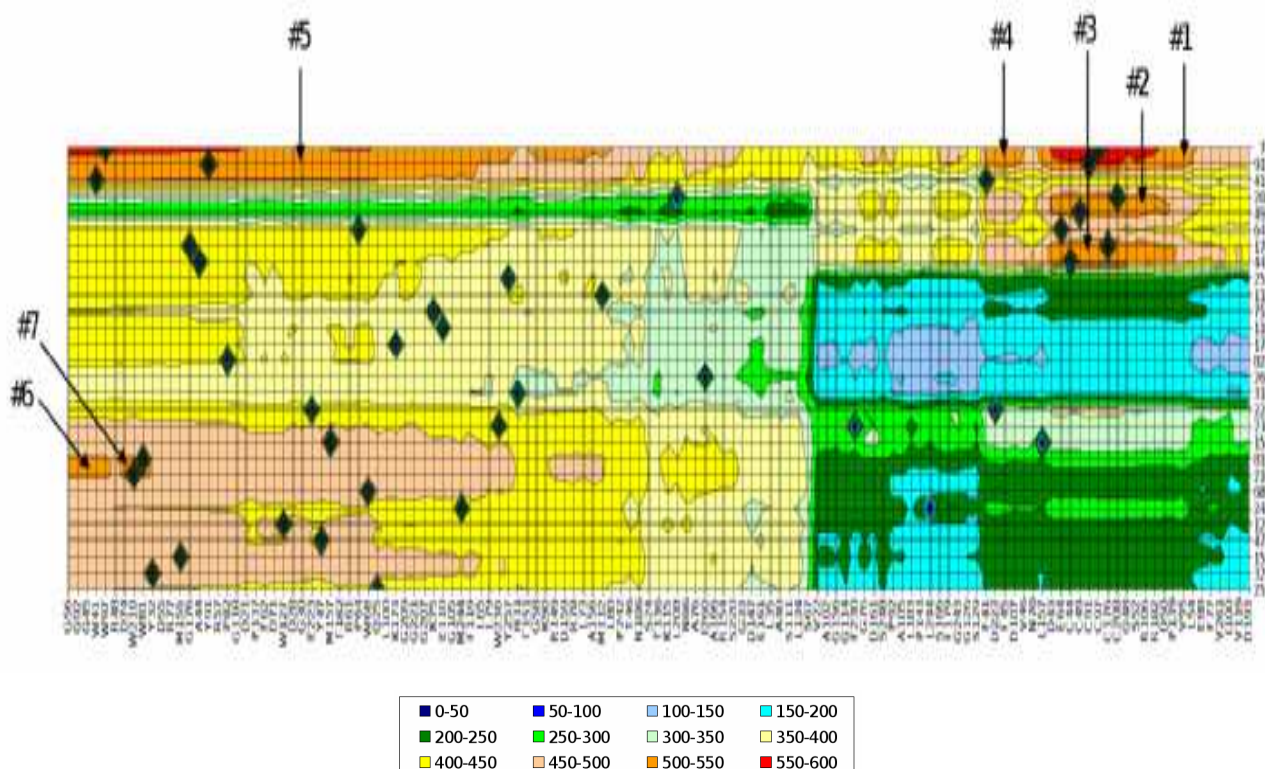


Figura 76. Matriz que representa los valores de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ para la superfamilia de peroxidasa de plantas después de un análisis iterativo de agrupación. Las filas representan la posición en el MSA y las columnas la perturbación. Las posiciones que muestran un modelo similar de acoplamiento y sitios perturbados se agrupan en pequeñas zonas indicadas por flechas. La escala de color varía linealmente acorde con la escala del arco iris (azul oscuro, valores de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ pequeños; rojo, valores de $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$ grandes).

Una comparación de los “clusters” 1, 2 y 3 indican que contienen un conjunto común de residuos acoplados (Fig. 76), sugiriendo que estos tres *clusters* forman una gran red de posiciones co-evolucionadas. Es interesante citar que cuatro ligandos del calcio (Asp43, Gly48, Asp50 y Ser52) están altamente correlacionados con las posiciones 44, 49, 91, 97, 176 y 208, cuya distribución de aminoácidos cambia en respuesta a las perturbaciones de Asp43, Gly48, Asp50 y Ser52. Como resultado, las seis posiciones en MSA (44, 49, 91, 97, 176 y 208) tienen un incremento en el porcentaje de residuos cisteína del 46,4% al 98-99%. El fuerte acoplamiento de los seis residuos cisteína con los cuatro residuos que forman el andamio en el que se encuentra el átomo de calcio distal, indican que hay una dependencia en la evolución de estas posiciones en la superfamilia de peroxidasa de plantas.

Hay que añadir, que las posiciones 91 y 97 están altamente correlacionadas ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 500$) con otros cinco residuos (Phe41, Phe45, Val46, Asp107 y Asp223), agrupados en el “cluster” 4 (Fig. 76). Estos siete residuos forman una red que incluye dos residuos del centro activo (Phe41 y Phe45) y los ligandos del átomo de calcio distal (Val46) y proximal (Asp223) en la estructura de la RPTP. El porcentaje de residuos cisteína

aumenta del 46,2 al 96,5-100% (para el residuo 91) y del 46,4 al 97,1-100% (para el residuo 97). Los residuos cisteína 91 y 97 están acoplados a los residuos aromáticos distales Phe41 y Phe45, que están implicados en la actividad catalítica de las peroxidasas y, también, a los residuos Val46 (distal) y Asp223 (proximal), ligandos de los átomos de calcio e importantes en el mantenimiento de la estructura del centro activo.

La matriz SCA presenta una fuerte correlación ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 500$) entre las posiciones 41, 91 y 97 con 56 perturbaciones que forman el “cluster” 5 (Fig. 76). En la estructura terciaria de la RPTP, estas parejas de residuos acoplados se encuentran en nueve hélices (A, B, B', C, D, D', E, F, y F') y en diez bucles de conexión a ambos lados del plano hémico. Un pequeño subconjunto de 19 residuos, con elevadas energías de acoplamiento ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 550$), surge del “cluster” 5. De esos 19 residuos, ocho están situados en regiones helicoidales (Tyr32, Trp41, Ala44, Arg77, Trp81, Pro82, Met155 y Gly176) y once se encuentran en bucles conectores (Gly45, Arg48, Asp55, Gly56, Arg57, Asp74, Tyr91, Gly92, Trp97, Gly118 y Trp210). La posición del aminoácido 97 cambia significativamente su distribución en estas 19 perturbaciones, aumentando el porcentaje de los residuos triptófano del 52,6% al 99-100%. Por ello, hay un acoplamiento energético entre el Trp97 y los residuos situados en el hueco hémico, Tyr32, Trp41, Asp74 y Met155, todos ellos implicados en el mecanismo catalítico de las peroxidasas.

Dos pequeños “clusters” (6 y 7) están altamente correlacionados ($\Delta\Delta G^{\text{estad}} > 500$) con las posiciones 91 y 210, en los que las distribuciones de aminoácidos cambian en respuesta a las perturbaciones Trp41, Gly45, Gly56, Gly92, Trp97 y Asp74. El porcentaje de los residuos Trp aumenta del 52 al 99% (para la posición 81) y del 52,3 al 99,5% (para la posición 210). Además, las posiciones 81 y 210 también generan un aumento del porcentaje de residuos triptófano (del 52 al 99%) en respuesta a las 19 perturbaciones agrupadas en el “cluster” 5. Podemos concluir que en la matriz SCA, los “clusters” 5, 6 y 7 están acoplados entre ellos, ya que muestran una dependencia de los residuos triptófano de las posiciones 41, 81, 97 y 210.

Es necesario citar, que las posiciones 91 y 97 tienen un acoplamiento estadístico elevado para diez perturbaciones que contienen aminoácidos complementarios identificados mediante el parámetro ΔG^{estad} . Estas perturbaciones se encuentran en distintos “clusters” y comprenden las posiciones 41, 44, 45, 48, 64, 91, 97, 157, 176 y 223 (Fig. 76). Un grupo de perturbaciones (Phe41, Cys44, Phe45, Gly48, Glu64, Cys91, Cys97, Leu157, Cys176 y Asp223) presentan un modelo similar de acoplamiento a las cisteínas 91 y 97 (en los “clusters” 1 y 4). El otro grupo de perturbaciones (Trp41, Ala44, Gly45, Arg48, Pro64, Tyr91, Trp97, Met157, Gly176 y Glu223) está acoplado a los residuos Tyr91 y Trp97 (en el “cluster” 5). Por ello, las

posiciones 91 y 97 contienen diferentes residuos (cisteína, tirosina o triptofano), dependiendo de la presencia de aminoácidos específicos en sitios relevantes perturbados.

Los cambios en la distribución de aminoácidos se analizaron para todas las posiciones de la MSA, respondiendo a las 127 perturbaciones encontradas en la matriz SCA. Se identificó un grupo de residuos con una alta energía de acoplamiento estadístico con seis residuos cisteína (Cys44, Cys49, Cys91, Cys97, Cys176 y Cys208) y otro grupo que no presentaba acoplamiento con estos residuos. El primero de ellos (Grupo A) tiene 47 sitios de perturbación (37% del total) y el segundo (Grupo B) contiene 80 perturbaciones (63% del total) (Tabla XLIV). Los dos grupos tienen 24 sitios de perturbación comunes, lo que indica, en general, que estas posiciones son relevantes para las características estructurales y funcionales de las peroxidasas (Fig. 77B). Por ejemplo, el residuo Phe41 se encuentra en las peroxidasas de clase II (MnP y LiP) y en las de clase III (RPTP y cHRP). Sin embargo, en esa misma posición en las peroxidasas de clase I (CcP y APX) nos encontramos con un residuo de triptófano. La presencia de una cadena lateral aromática en esta posición, cercana al grupo hemo, evita el acceso del sustrato al intermedio oxiferrilo, lo que influye en la actividad catalítica de las peroxidasas (Veitch *et al.*, 2004).

Una revisión detallada de la matriz de SCA revela que es posible separar los “clusters” 1 y 7 en dos grupos, basándonos en el criterio de presencia/ausencia de residuos de cisteína. Los sitios perturbados dentro de los “clusters” 1 y 4 tienen una fuerte correlación con seis residuos de cisteína (Cys44, Cys49, Cys91, Cys97, Cys176 y Cys208). Sin embargo, los “clusters” 5 y 7 contienen residuos que no están acoplados a ningún residuo de cisteína, pero tienen un fuerte acoplamiento con los residuos Tyr91 y Tyr97. Por ello, el criterio de acoplamiento/desacoplamiento de los residuos cisteína permite identificar los sitios perturbados complementarios que relacionan los diferentes “clusters” que aparecen en la matriz SCA.

La presencia de sitios perturbados complementarios en diferentes *clusters* formados por las mismas posiciones sugiere que la superfamilia de las peroxidasas de plantas se puede dividir en dos grupos de proteínas que han evolucionado juntas. En realidad, hasta ahora la superfamilia de peroxidasas de plantas se ha subdividido en tres grupos o clases, basándose en su secuencia de aminoácidos, sus características estructurales y su capacidad para enlazarse con iones metálicos: clase I (origen bacteriano), clase II (origen fúngico) y clase III (plantas superiores) (Welinder, 1992). A pesar de la baja identidad de las secuencias de aminoácidos de estas peroxidasas, todas ellas contienen un grupo hemo, tienen un plegamiento helicoidal mayoritario y contienen residuos altamente conservados en las inmediaciones del centro activo. Sin embargo, las peroxidasas de clase I difieren del resto, ya que no poseen iones calcio ni puentes disulfuro en su estructura. Estas diferencias estructurales están de acuerdo con la interpretación que se hace de la matriz

de SCA, la cual indica la presencia de dos grupos de pares de residuos acoplados estadísticamente, basándose en la presencia/ausencia de residuos de cisteína (Tabla XLIV). Como resultado, los “clusters” 1 y 4, contienen pares de residuos, que han evolucionado con cierta dependencia de los residuos de cisteína presentes en las secuencias de aminoácidos de peroxidasas de clases II y III. Por otro lado, los “clusters” 5 y 7 contienen residuos que no están acoplados a ninguna cisteína, indicando que estos *clusters* contienen residuos típicos de peroxidasas de clase I

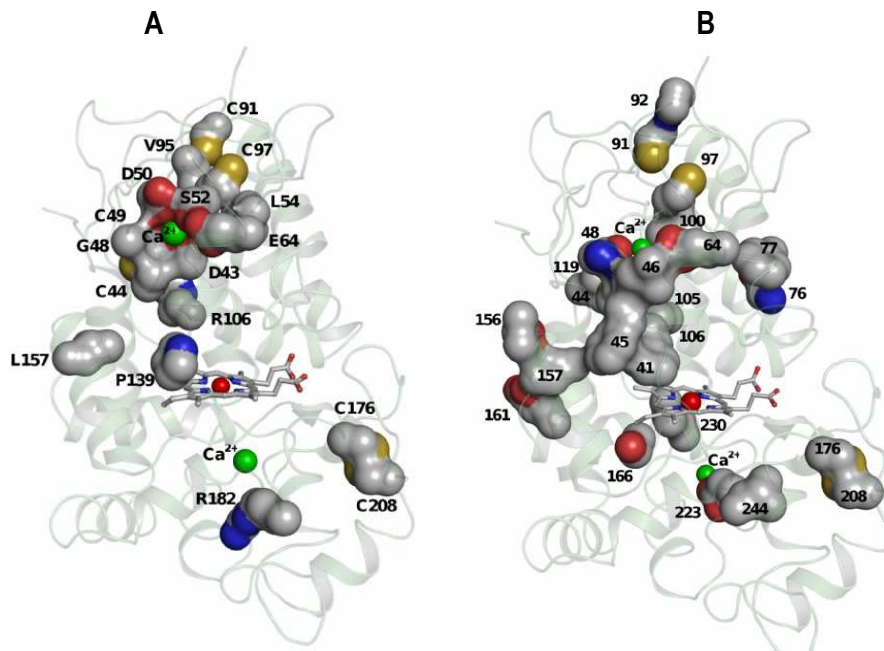


Figura 77. (A) Asignación de los 12 residuos fuertemente acoplados del cluster 1 dentro del cristal de la RPTP. La superficie de van der Waals se dibuja alrededor de los residuos y el grupo hemo se muestra mediante representación de palos. Los átomos de hierro y calcio están representados como esferas rojas y verdes, respectivamente. Los átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre se muestran de color azul, rojo y amarillo, respectivamente. **(B) Asignación de las 24 posiciones identificadas por SCA dentro de la estructura cristalina de la RPTP.** Los residuos se muestran dentro de sus esferas de van der Waals, el grupo hemo se muestra mediante una representación de palos y los átomos de hierro y calcio como esferas. Los colores son los mismos que se utilizan en la Fig. 77A.

Del análisis SCA, es posible generar dos secuencias de peroxidasas hipotéticas, por combinación de los resultados obtenidos de los cálculos de la energía de conservación de cada sitio, junto con las revelaciones de los “clusters” de la matriz SCA. Mientras que la secuencia A está formada por residuos que tienen un fuerte acoplamiento estadístico con residuos de cisteína, la secuencia B contiene el otro grupo de residuos que están reunidos en el grupo B (Tabla XLIV). La secuencia A se asocia a peroxidasas de las clases II y III y la secuencia B a peroxidasas de clase I. Como era de esperar, los residuos más conservados (Tabla XLIII) se encuentran en las dos secuencias, entre las que existe tan sólo un 14% de homología (Fig. 78).

Tabla XLIV. Residuos acoplados estadísticamente desde la matriz SCA, identificados mediante el parámetro $\Delta\Delta G^{\text{estad}}$, que viene dado en unidades arbitrarias. Las 24 posiciones subrayadas están compartidas por los dos grupos de perturbaciones. AA (aminoácido).

AA	Posición que ocupa el AA en la secuencia ^(a)	
	Grupo A	Grupo B
Alanina	102, <u>105</u>	40, <u>44</u> , <u>76</u> , <u>156</u> , <u>166</u>
Asparagina	70	66, <u>106</u>
Ácido aspártico	43, 50, 107, <u>161</u> , 193, <u>223</u>	21, <u>28</u> , 55, 71, 74, 147, 159
Arginina	<u>106</u> , 182	<u>48</u> , 57, 61, <u>77</u> , 78, 149, 154
Cisteína	<u>44</u> , 49, <u>91</u> , <u>97</u> , <u>176</u> , <u>208</u>	-
Ácido glutámico	<u>64</u> , 88	110, <u>161</u> , <u>223</u>
Glutamina	-	25
Glicina	<u>48</u> , <u>76</u> , 114, 126, <u>156</u> , 243	30, 33, <u>45</u> , 56, 58, <u>92</u> , <u>105</u> , 118, <u>176</u> , 207, 209, 221
Histidina	-	31
Isoleucina	<u>100</u>	260
Leucina	54, <u>157</u> , 183, <u>244</u>	35, 65, 73, 79, 80, <u>100</u> , 134, <u>208</u>
Lisina	-	75, 90, 115, 173
Metionina	-	112, 155, <u>157</u> , <u>244</u>
Fenilalanina	<u>41</u> , <u>45</u> , <u>77</u> , 179, <u>230</u>	62, <u>119</u>
Prolina	<u>92</u> , 139, 141	<u>64</u> , 82, 137, 242
Serina	52, 129, <u>166</u> , 247	24, 67, 111, 220
Treonina	-	<u>46</u> , 116, 151, 162
Triptófano	-	<u>41</u> , 68, 81, <u>97</u> , 127, 210, <u>230</u>
Tirosina	-	32, 47, <u>91</u> , 257
Valina	22, <u>46</u> , 95, 119, <u>261</u>	-

La comparación de las secuencias A y B muestra elementos estructurales comunes, tales como los residuos catalíticos (Arg38, His42 e His169) y algunas regiones no conservadas que pueden explicar las variaciones en la estabilidad y actividad que existen entre estos grupos de peroxidasas. Una de estas regiones variables incluye el fragmento de cadena polipeptídica comprendido entre los residuos 43 y 52 y los alrededores del átomo de calcio de la cavidad distal, que son características estructurales de las peroxidasas de las clases II y III. Aunque las peroxidasas de clase I no tienen en su estructura átomos de calcio, la conformación del esqueleto carbonado en la región distal es similar a la encontrada en las peroxidasas de clase II. Las peroxidasas de clases I y II tienen un bucle extendido formado por 17 residuos, y en cambio, las peroxidasas de clase III tienen un pequeño bucle comprendido por un único puente disulfuro Cys44/Cys49.

Además, ninguna de las peroxidasas de clases I y II, contienen ese puente disulfuro Cys44/Cys49, característico de las peroxidasas de clase III. En la cHRP sin calcio, este puente disulfuro está involucrado en la estabilización de la hélice B que mantendrá la correcta orientación del residuo catalítico His42 en la cavidad hémica distal (Howes *et al.*, 2001a; Laberge *et al.*, 2003). Aunque las peroxidasas de clase II y III tienen sitios de unión a los iones calcio, existen grandes diferencias en la labilidad del átomo de calcio distal que afecta severamente a la actividad catalítica de las peroxidasas de clase II como la MnP y la LiP

(Howes *et al.*, 2001a). También, la diferente localización de los puentes disulfuro en las peroxididasas de clase II y III genera diferencias en su actividad enzimática.

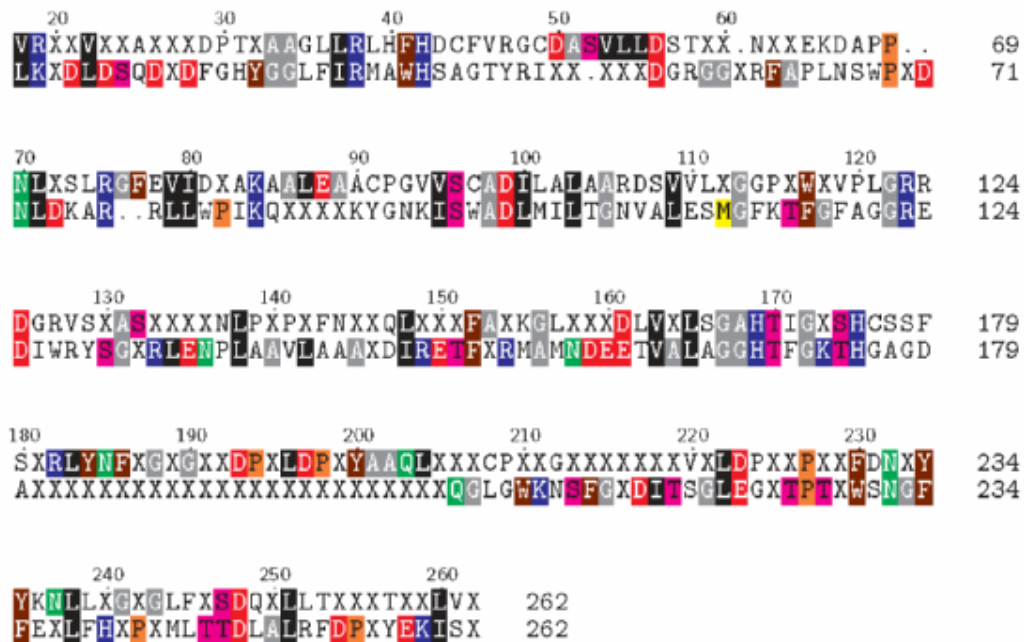


Figura 78. Alineación de la estructura primaria de dos hipotéticas secuencias que corresponden a la superfamilia de peroxididasas de plantas. La superior será la secuencia A y la inferior la B. Ambas se deducen de un análisis SCA basado en la presencia/ausencia de residuos cisteína. Los residuos presentan un color acorde a las propiedades químicas de su cadena lateral: ácidos (rojos), hidrófobos grandes (negros) y pequeños (gris), amidas (verdes), aromáticos (marrones), básicos (azules), hidroxílicos (rosas), iminos (naranjas) y sulfurados (amarillo). La secuencia se ha generado usando el programa TEXshade.

Las peroxididasas de clase I no poseen, entre sus elementos estructurales, puentes disulfuro ni átomos de calcio, pero, sin embargo, estas peroxididasas exhiben una velocidad de formación del Col más rápida (10^7 - 10^8 $M^{-1} s^{-1}$) que las peroxididasas de clase II (10^5 - 10^6 $M^{-1} s^{-1}$) y de clase III (10^6 - 10^7 $M^{-1} s^{-1}$) (Nonaka *et al.*, 2009). Estas diferencias se deben a la orientación en el plano imidazólico del residuo de His169 proximal con respecto al eje hémico N-Fe-N, lo que influye en el modo de interacción entre la cadena lateral del residuo Asp248 con el grupo -NH de la His169.

Por otro lado, las peroxididasas de clase III presentan una estabilidad térmica superior a las peroxididasas de clase I y II (Ryan *et al.*, 2008; Regalado *et al.*, 2004; Zamorano *et al.*, 2008; van Huystee *et al.*, 2004). Las diferencias de estabilidad pueden estar relacionadas con la presencia de glicanos, iones calcio, puentes disulfuro y residuos que se encuentran en el centro activo para formar redes de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Como todas las peroxididasas presentan un andamiaje común de hélices altamente conservadas (Süel *et al.*, 2003), parece coherente pensar que son los residuos que se encuentran en

regiones no helicoidales, es decir los que unen las hélices conservadas, los que generan las variaciones de estabilidad y actividad entre los diferentes tipos de peroxidasas. Del análisis SCA se observa que los bucles desestructurados son las regiones de mayor variabilidad (Fig. 78). Estas regiones están implicadas en el acceso del sustrato al centro activo, en los sitios de unión de calcio distal y proximal y en parte de los alrededores de los sitios de unión al sustrato que modularán el perfil catalítico frente a diferentes sustratos.

A pesar de algunas diferencias en las estructuras primarias, las peroxidasas de las tres clases tienen una topología helicoidal altamente conservada que está directamente asociada con la función biológica de toda la superfamilia de la peroxidasas de plantas. Las peroxidasas de plantas, hongos y bacterias están relacionadas evolutivamente (Welinder, 1992; Hiraga *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2007a, 2007b). Algunos estudios filogenéticos de la superfamilia de peroxidasas de plantas han sugerido que las peroxidasas de clase I son el origen del resto de peroxidasas. Por ello, las peroxidasas de clases II y III han evolucionado de una secuencia de clase I ancestral común, a la que le falta los puentes disulfuro y los iones calcio. Estos resultados son coincidentes con los resultados de SCA que nos han permitido identificar dos secuencias de aminoácidos basadas en los criterios de presencia/ausencia de residuos cisteína.

En resumen, la matriz SCA genera una red de pares de residuos correlacionados que son importantes para la función y la estructura de las peroxidasas. Un resultado importante es haber podido identificar dos secuencias de aminoácidos hipotéticas que describen las características de dos subfamilias de peroxidasas dentro de la superfamilia de peroxidasas de plantas, una similar al ancestro común (clase I) y otra a las peroxidasas que surgen de ella (clases II y III).

6. Discusión de los Resultados

Este trabajo ha consistido en la caracterización químico-física, cinética y estructural de la peroxidasa de palma real (RPTP). Se ha elegido esta especie vegetal porque, de un conjunto seleccionado inicial de estudio, era la que poseía una mayor actividad enzimática. El proceso de purificación ha sido optimizado en sus fases finales, lo cual ha mejorado notablemente el rendimiento del mismo.

Como parámetros básicos se han determinado su masa molecular, pI , coeficiente de extinción molar y estado de agregación. Se ha dilucidado el mecanismo catalítico que sigue la enzima durante su reacción de oxidación de diferentes sustratos, calculándose sus constantes cinéticas. Como toda enzima peroxidasa, exhibe inhibición por sustrato y se inactiva por sustrato suicida. Asimismo, se han caracterizado espectroscópicamente los intermedios enzimáticos, compuestos Col, Coll y Colll, que aparecen durante la reacción catalítica. Se han determinado, finalmente, su secuencia primaria y sus estructuras secundaria y terciaria.

➤ Parámetros fisicoquímicos de la RPTP

Se ha determinado la masa molecular de la RPTP con diferentes metodologías, aportando todas ellas resultados muy similares (Tabla XLV). Se observa que la RPTP presenta una forma dimérica en solución, apareciendo una forma tetramérica, debida a la agregación, cuando se trabaja a altas concentraciones ($> 2,0 \text{ mg ml}^{-1}$). A altas concentraciones y a $pH 3,0$ esta forma no se observa, debido a la reducción de muchas de las interacciones de tipo electrostático necesarias para dicha agregación. La masa molecular monomérica promedio es de $\sim 46 \text{ kDa}$.

Tabla XLV. Masa molecular de la RPTP obtenida por diferentes metodologías. Los datos de UCA corresponden a una concentración proteica de $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ y $pH 7,0$, siendo éstas las únicas condiciones en las que se observa aparición de la forma tetramérica.

Metodología	Estado de agregación	Masa molecular (kDa)
SDS-PAGE	Monómero	$48,2 \pm 3,0$
MALDI-TOF	Monómero	$44,596 \pm 0,008$
Cromatografía de exclusión molecular	Dímero	92 ± 2
	Tetramero	200 ± 7
UCA	Dímero	$90,140 \pm 4,100$
	Tetramero	$188,100 \pm 10,300$

La determinación del pI se ha realizado de modo experimental ($5,4 \pm 0,1$) y teórico, utilizando el programa ExPASy, una vez conocida la secuencia de aminoácidos ($5,3 \pm 0,1$). Es interesante citar que esta proteína había sido parcialmente caracterizada por otro grupo de investigación (Sakharov *et al.*, 2001), siendo $3,5$ el pI determinado por ellos, valor muy inferior al determinado en este trabajo. El nuevo valor calculado es el correcto y, para afirmar esto, nos basamos en que, a ese pH , la proteína presenta su mayor estabilidad.

Normalmente, las proteínas tienen su máximo de estabilidad a su pI (pH para el cual su carga neta es cero). Se desconoce la causa de la disparidad en estos resultados.

➤ **Estabilidad de la RPTP**

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de la estabilidad de la RPTP frente a la temperatura, el pH y diferentes agentes químicos. El rasgo principal de estas enzimas es su elevadísima estabilidad. Se aprecia que, como muchas peroxidasas de plantas, es estable en un intervalo de pH muy amplio, en este caso comprendido entre 2,0 y 13,0. En este intervalo, presenta una actividad enzimática, siempre superior al 70%, con dos cambios notables a valores de pH de 4,4 y 8,9. En el proceso de desnaturalización, se observa que los aminoácidos aromáticos (Trp) se encuentran en todo momento en un entorno apolar, siendo la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia 339 y 331 nm a pH 13,0 y 1,2, respectivamente, y reduciéndose a valores de pH's más extremos, debido a la agregación proteica. Por ello, el responsable de la desnaturalización proteica es la reorientación de los aminoácidos aromáticos con respecto del grupo hemo (alejamiento), por lo que se reduce el "quenching" y, por tanto, aumenta notablemente la intensidad de fluorescencia. Este efecto aumenta con la agregación proteica que aparece a valores de pH muy extremos.

La desnaturalización térmica de la RPTP se ha medido por diferentes metodologías, fluorescencia intrínseca, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, determinándose con ellas diferentes parámetros cinéticos (Tabla XLVI). La desnaturalización térmica registrada por medidas de emisión de fluorescencia indica que la proteína, al igual que el resto de peroxidasas de plantas estudiadas en nuestro grupo (cHRP, aPrx, OAPTP y CEP), se desnaturaliza siguiendo un modelo simple irreversible de dos estados. El espectro de emisión de la proteína térmicamente desnaturalizada indica que el motivo de la desnaturalización es una reorientación de los aminoácidos aromáticos con respecto del grupo hemo (reducción del "quenching"), pero permaneciendo todos ellos en un entorno apolar en todo momento, como ocurría con la desnaturalización por pH. La desnaturalización térmica registrada por medidas de DC se comporta de acuerdo con un modelo simple irreversible de dos estados, es decir, la proteína se desnaturaliza completamente llegando a un estado en el que ha perdido su estructura secundaria mayoritaria (α -hélices), en favor de la aparición de estructura desordenada.

La desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0, registrada por medidas de DSC, se ajusta muy bien a un modelo irreversible simple de dos estados, siendo un proceso dependiente de la velocidad de calentamiento y, por tanto, controlado cinéticamente. En este caso, la disociación del dímero en monómeros es un proceso despreciable frente a la desnaturalización de estos monómeros y, por ello, el modelo de 240

Lumry-Eyring para dímeros se puede aproximar a un modelo irreversible simple de dos estados. Por ello, aplicando la ecuación de Arrhenius se pueden calcular los mismos parámetros cinéticos que los calculados mediante fluorescencia y DC (Tabla XLVI). Estos parámetros se calculan para diferentes velocidades de calentamiento (30,1, 60,2 y 88,2 K h⁻¹), haciéndose un ajuste global de los datos y comprobándose en todos los casos, valores similares de dichos parámetros, con ligeras desviaciones. Todos los ajustes presentan coeficientes de regresión > 0,99 (Tabla XXV).

Tabla XLVI. Comparación de los parámetros cinéticos del proceso de desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0, obtenidos por diferentes metodologías (Zamorano *et al.*, 2008). Todos ellos se han obtenido con una velocidad de calentamiento de 60,1 K h⁻¹, trabajando con RPTP 18 μM, a pH 3,0.

Metodología	E_A (kcal mol ⁻¹)	T^* (K)
Fluorescencia	125,4 ± 3,3	341,7 ± 2,4
Dicroísmo circular	124,1 ± 3,1	343,5 ± 1,7
Calorimetría	128,8 ± 0,5	342,0 ± 0,1

Se ha trabajado con tres metodologías diferentes (Fluorescencia, DC y DSC) y, en todos los casos, los datos experimentales de la desnaturalización térmica de la RPTP a pH 3,0 se ajustan muy bien a un modelo irreversible simple de dos estados. Los parámetros cinéticos obtenidos, E_A y T^* , con las tres metodologías son muy similares.

A pH 3,0, la RPTP en estado nativo se encuentra en forma dimérica. Cuando pierde su estructura secundaria con GuHCl 6 M, la proteína se mantiene activa y un estudio de UCA concluye que la enzima en ese estado se encuentra en forma monómerica. Por todo ello, se puede concluir que, aunque la desnaturalización a pH 3,0 de la RPTP se ajusta a un modelo irreversible simple de dos estados, inicialmente existe un equilibrio entre el dímero en forma nativa y el monómero desplegado.

Tabla XLVII. Parámetros cinéticos relativos a la estabilidad térmica de diferentes peroxidasas de plantas a pH 3,0. En todos los casos, la velocidad de barrido ha sido de 60,2 K h⁻¹. Las referencias son: [1] Pina *et al.*, 2001; [2] Zamorano *et al.*, 2004; [3] Rodríguez *et al.*, 2002; [4] Zamorano *et al.*, 2008 y [5] Zamorano *et al.*, 2009.

Enzima	T^* (°C)	E_A (kcal mol ⁻¹)	Referencia
cHRP	70,1 ± 0,4	38,5 ± 0,4	[1]
aPrx	42,4 ± 0,4	67,9 ± 0,5	[2]
AOPTP	74,4 ± 0,2	98,8 ± 1,4	[3]
RPTP	68,8 ± 0,1	128,8 ± 0,5	[4]
CEP	71,9 ± 0,1	103,3 ± 1,3	[5]

Es interesante comparar los parámetros cinéticos relativos a la estabilidad térmica de la RPTP con los de otras peroxidasa de plantas a pH 3,0. Otros estudios detallados, realizados con la isoenzima c de la peroxidasa de rábano (cHRP), la peroxidasa aniónica (aPrx) de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), la peroxidasa de hojas de la palmera africana *Elaeis guineensis* (AOPTP) y la peroxidasa de hojas de la palmera *Chamaerops excelsa* (CEP), proporcionan los parámetros detallados en la Tabla XLVII.

Se observa que la termoestabilidad de la peroxidasa de palma real es mucho mayor que la de la aPrx y muy próxima a la de otras especies de palmeras (AOPTP y CEP) y a la cHRP. Sin embargo, la energía de activación es la mayor de todas las peroxidasa estudiadas hasta la fecha, no sólo de las que se muestran en la Tabla XLVII.

La desnaturalización térmica de la RPTP a pH 7,0 es un proceso reversible, recuperándose, tras un segundo calentamiento, un 80% del área del termograma. Sus curvas se ajustan muy bien a un modelo de desnaturalización de dos estados, acoplado con un proceso de disociación, en el que la proteína presenta dos subunidades ($n = 2$). En este proceso, no se observan efectos cinéticos, puesto que no hay influencia de la velocidad de calentamiento sobre los perfiles calorimétricos. En cambio, como en todo proceso de este tipo, desnaturalización asociada a disociación, los termogramas sí que dependen de la concentración proteica, de modo que a mayor concentración, mayor T_m . Cuando el proceso de desnaturalización es reversible y está asociado a un proceso de disociación, la relación de entalpías de van't Hoff y calorimétrica ($\Delta H_{VH}/\Delta H(T_m)$) es superior a la unidad, tomando un valor en el caso de proteínas diméricas de $\sim 1,333$ (Freire, 1989). En nuestro caso concreto, la relación de entalpías es de $1,30 \pm 0,05$, lo que confirma, una vez más, que la RPTP es una proteína dimérica en solución.

La RPTP presenta a 24 °C su máxima estabilidad a pH 7,0, siendo su $\Delta G(T_s) \sim 24,0$ kcal mol⁻¹. En cambio, a pH 3,0 tiene su máxima estabilidad a 13,6 °C, siendo su $\Delta G(T_s)$ 15,5 kcal mol⁻¹. La diferencia de $\Delta G(T_s)$ entre esos dos valores de pH ($\sim 8,5$ kcal mol⁻¹) corresponde a la contribución de los pares iónicos en la estabilidad de la RPTP. Como a pH 3,0 no se puede determinar directamente ningún parámetro termodinámico de la RPTP, ya que la desnaturalización está controlada cinéticamente, el único modo de obtener alguna información al respecto es extrapolando los datos cinéticos a velocidad infinita de calentamiento, generando las curvas de estabilidad. De este estudio, obtenemos que la estabilidad de la enzima a 25 °C y pH 7,0 es de $23,3 \pm 0,1$ kcal mol⁻¹ y que a pH 3,0 es de aproximadamente $15,0 \pm 0,1$ kcal mol⁻¹. La diferencia de energía libre entre pH 7,0 y 3,0 es de 8 kcal mol⁻¹, reflejando este dato la contribución de los pares iónicos a la estabilidad estructural de la peroxidasa de palma real (Sawano *et al.*, 2008). Por tanto, se observa que ambos datos son muy similares. La desnaturalización reversible de una

proteína con GuHCl sirve, en última instancia, para calcular la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturizante, es decir, la estabilidad proteica, siendo este valor $23,3 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH } 7,0$, prácticamente igual al obtenido en los estudios anteriores.

Como último dato de estabilidad, indicar que la proteína se mantiene activa en un 80% en un intervalo de concentraciones salinas comprendido entre 0 y 5,2 M (NaCl). Esto hace que la enzima se pueda usar con total eficacia en condiciones salinas extremas.

➤ Mecanismo catalítico y estudios cinéticos

La RPTP oxida una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, siguiendo un mecanismo *ping-pong*, en el que la RPTP pasa a través de dos formas enzimáticas modificadas, los Col y Coll, antes de que la enzima recupere su estado nativo.

Se observa que los sustratos más reactivos para la RPTP son el ácido ferúlico y el ABTS, seguidos de las aminas aromáticas y, finalmente, el guayacol y el catecol, compuestos fenólicos con uno y dos grupos hidroxilo en su estructura, respectivamente. Estudios similares realizados con la peroxidasa de las hojas de palma africana (AOPTP) han concluido, del mismo modo, que la enzima presenta su mayor reactividad con el ácido ferúlico, seguido de las aminas aromáticas y, finalmente, de los compuestos fenólicos que presentan en su estructura uno o dos grupos hidroxilo (Tabla XLVIII). La peroxidasa de soja (SBP) es más reactiva con el guayacol que con las aminas aromáticas, ocurriendo lo mismo con la peroxidasa de cacahuete (PNP). El orden de reactividad es el mismo, así como el número de veces que es más reactiva la enzima con respecto a cada sustrato (Sakharov *et al.*, 2002). Las peroxidasas de rábano (HRP) y tabaco (TcPx) se comportan, entre sí, de la misma manera, pero difiriendo bastante del resto de enzimas. Es decir, son aproximadamente igual de reactivas con los sustratos guayacol y o-dianisida, y del orden de 10-15 veces menos reactivas con el sustrato o-fenilendiamina. La diferente reactividad de estas enzimas se debe a las diferencias existentes en su secuencia de aminoácidos, que provocan ligeras modificaciones en el centro activo, lo cual hace que cada sustrato presente una accesibilidad al centro activo distinta.

La k_{app} , es un parámetro indicativo de la capacidad catalítica de la enzima con el sustrato reductor (similar a la k_3) que se calcula con la Ec. 137. La concentración de Coll se puede aproximar a la concentración inicial de peroxidasa ($[E]_0$), ya que en el ciclo de las peroxidasas $k_2 > k_3$ y $k_2 > k_1$ (Raybov & Goral, 1997).

$$v = k_3 [\text{Coll}][\text{AH}_2] \quad (136)$$

$$k_3 \approx k_{app} = \frac{V}{[E]_0 [AH_2]} \quad (137)$$

Tabla XLVIII. Resultados de los estudios cinéticos realizados con diferentes sustratos para la reacción de oxidación catalizada por diferentes peroxidasa de plantas, utilizando como peróxido H₂O₂. ¹ (Sakharov *et al.*, 2002), ² (Gazaryan *et al.*, 1995). AOPTP (peroxidasa de palma africana), SBP (peroxidasa de soja), HRP (peroxidasa de rábano), TcPx (peroxidasa de tabaco) y PNP (peroxidasa de cacahuete).

Sustrato	<i>k_{app}</i> (μM ⁻¹ s ⁻¹)				
	AOPTP ¹	SBP ²	HRP ²	TcPx ²	PNP ²
Guayacol	0,21	0,64	1,6	0,51	2,4
A.Ferúlico	18,0	-	-	-	-
o-dianisidina	3,9	0,39	4,3	2,0	2,0
o-fenilendiamina	0,85	0,04	0,49	0,032	0,22

➤ Estudios de inhibición

La RPTP presenta, como muchas otras peroxidasa de clase III, inhibición competitiva por sustrato. Además, se inactiva por sustrato suicida, siendo este sustrato el peróxido de hidrógeno.

Tabla XLIX. Estudio comparativo de los valores de *r* para diferentes enzimas peroxidasa de clase II y III. HRP-C: peroxidasa de rábano nativa, HRP-C': peroxidasa de rábano desglucosilada, HRP-C*(F143A) y HRP-C*(R38K) peroxidasa de rábano con una mutación puntual en aminoácidos muy importantes para el acceso al centro activo, LiP: lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, ARP: *Coprinus cinereus* peroxidasa de *Arthromyces ramosus* y RPTP: peroxidasa de palma real. El valor de *n* indica el número de veces que es más sensible o menos resistente a la inactivación, la enzima que la peroxidasa de palma real.

Peroxidasa	Clase	<i>r</i>	<i>n</i>	Referencia
HRP-C	III	625	3,5	Hiner <i>et al.</i> , 1995
HRP-C'	III	335	6,5	Hiner <i>et al.</i> , 1995
HRP-C*(F143A)	III	385	5,6	Hiner <i>et al.</i> , 1995
HRP-C*(R38K)	III	20	108	Hiner <i>et al.</i> , 1995
LiP	II	65 ± 15	33	Hiner <i>et al.</i> , 2002
ARP	II	425 ± 35	5	Hiner <i>et al.</i> , 2002
RPTP	III	2154 ± 97	1	-

El número de recambio *r* para la RPTP tiene un valor de 2154 ± 97. Si comparamos este valor con los obtenidos para otras peroxidasa, se observa que la peroxidasa de palma real es mucho menos sensible al peróxido de hidrógeno que otras peroxidasa estudiadas hasta la fecha (Tabla XLIX), lo cual está en concordancia con su elevada estabilidad. La peroxidasa de palma real es, al menos, cuatro veces más resistente a la inactivación que el resto de peroxidasa sobre las que se ha llevado a cabo este estudio.

La inactivación por sustrato suicida de la RPTP se ajusta a una exponencial decreciente de segundo orden con cuatro parámetros. En el caso de la peroxidasa de rábano y sus variantes (Hiner *et al.*, 1995), la cinética de inactivación también se ajusta a esa misma función, en la que el valor del parámetro d es constante para todas ellas, ocurriendo lo mismo en los casos de las peroxidases de clase II, LiP y ARP (Hiner *et al.*, 2002). La ascorbato peroxidasa (clase I) sigue una inactivación que se ajusta a una línea recta (Hiner *et al.*, 2000). La peroxidasa de melón (*Cucumis melon L.*), en cambio, tiene una zona de inactivación rápida, en la que pierde, durante el primer minuto, la mayor parte de la actividad enzimática, y, posteriormente, retiene una actividad remanente que va disminuyendo con el tiempo de un modo más lento (Rodríguez-López *et al.*, 2000). Así pues, la peroxidasa de palma real (RPTP) tiene un comportamiento similar al de la peroxidasa de melón, es decir un periodo inicial de inactivación rápida durante los primeros minutos de reacción y, a continuación, un periodo de inactivación más lento, ambos dependientes de la concentración de peróxido de hidrógeno.

Si se tuviera que concluir si la peroxidasa de palma real es más o menos estable a la exposición del peróxido de hidrógeno, se puede decir que, aunque la k_i^{ap} (s^{-1}) de la fase de inactivación rápida es mucho más alta que las de otras peroxidases de palmas [HRP-C ($4,6 \pm 0,2$) $\cdot 10^{-3} s^{-1}$, LiP ($18,5 \pm 2,3$) $\cdot 10^{-3} s^{-1}$, ARP ($1,37 \pm 0,27$) $\cdot 10^{-3} s^{-1}$, APX ($2,13 \pm 0,08$) $\cdot 10^{-4} s^{-1}$], del orden de 19, 5, 63 y 404 veces mayor, respectivamente}, no sólo es este valor el que se ha de tener en cuenta. La peroxidasa de palma real es la más resistente al peróxido (Tabla XLIX). Además, es la que presenta un mayor valor de la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor y, por tanto, la menos afín a la molécula de peróxido de hidrógeno. Así, las HRP-C ($1,3 \pm 0,2$) mM, LiP ($6,1 \pm 0,5$) mM, ARP ($3,83 \pm 0,35$) mM, APX ($8 \cdot 10^{-4}$) mM, tienen una afinidad por el peróxido de hidrógeno del orden de 20, 4, 7, y 32 veces superior a la de peroxidasa de palma real, respectivamente. Estos datos, unidos a una elevada constante catalítica, a una eficiencia del proceso catalítico superior al resto de enzimas y a una eficiencia del proceso de inhibición similar, hacen de la peroxidasa de palma una enzima mucho más estable a la exposición al peróxido y a su actuación como sustrato suicida.

Si se considera la fase lenta del proceso cinético, la más persistente en el tiempo, se comprueba un valor de la constante de velocidad de inhibición similar al del resto de peroxidases. Este dato, unido a una menor afinidad de la enzima por el inhibidor, a una mayor eficiencia del proceso catalítico y a una menor eficiencia del proceso de inhibición, hacen de esta enzima la más resistente al peróxido de hidrógeno encontrada hasta la fecha (Tabla L).

Tabla L. Parámetros cinéticos de la inactivación de diferentes peroxidasa con peróxido de hidrógeno como sustrato suicida. Los datos de las peroxidasa HRP-C, LiP, ARP y APX han sido tomados de las referencias: (a): Hiner *et al.*, 1995, (b): Hiner *et al.*, 2002 y (c): Rodríguez-López *et al.*, 2000.

Zona cinética	k_i^{aP} (s ⁻¹)	K_i^{aP} (mM)	k_{cat}^{aP} (s ⁻¹)	$1/K_i^{aP}$ (M ⁻¹)	k_{cat}^{aP}/K_i^{aP} (s ⁻¹ M ⁻¹)	k_i^{aP}/K_i^{aP} (s ⁻¹ M ⁻¹)
HRP-C ^a	$(4,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$1,3 \pm 0,2$	2,9	775,0	2248	3,5
LiP ^b	$(20,0 \pm 3,0) \cdot 10^{-3}$	$6,1 \pm 0,45$	1,3	164,0	213	3,03
ARP ^b	$(1,37 \pm 0,27) \cdot 10^{-3}$	$3,83 \pm 0,35$	0,6	261,0	157	0,36
APX ^c	$(2,13 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	-	1250,0	-	266,3
RPTP ^{Rápida}	$(8,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$	$25,63 \pm 5,33$	185,2	39,0	7226	3,36
RPTP ^{Lenta}	$(8,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	$66,03 \pm 13,57$	17,9	15,0	271	0,13

Comparando estos datos con los datos cinéticos de la resistencia de las peroxidasa de clases I, II y III a la inactivación con peróxido de hidrógeno, se puede decir que las peroxidasa de clase I son las menos resistentes al peróxido de hidrógeno. Así, la APX, con una concentración de H₂O₂ 10,0 μM, en 30 min retiene un 70% de actividad residual y en unos 200 min pierde casi el 80% de la actividad enzimática. Las peroxidasa de clase II son más resistentes que las peroxidasa de clase I, pero menos resistentes que las de clase III. La ARP, con una concentración de peróxido 50,0 mM, pierde el 96% de su actividad enzimática en 30 min. Finalmente, de las peroxidasa de clase III estudiadas, la menos estable es la peroxidasa de rábano, perdiendo ésta en 10 min el 50% de su actividad con una concentración de peróxido de hidrógeno 50,0 mM. Sin embargo, con esta misma concentración, la peroxidasa de melón retiene el 65% de actividad residual en ese mismo tiempo, por lo que es más estable. La peroxidasa de palma real (RPTP) necesita una concentración de peróxido de hidrógeno > 50,0 mM para que en 10 min reduzca su actividad al 60%, por lo que es la peroxidasa de clase III más resistente al peróxido de hidrógeno.

➤ **Características espectrales de la RPTP y de sus formas enzimáticas modificadas, los Col, Coll y Colll.**

La RPTP, como toda peroxidasa de clase III, presenta en su espectro de absorción, una banda Soret a 403 nm, característica de su grupo prostético (grupo hemo), y dos bandas, denominadas α y β, que aparecen a 485-490 y 630-635 nm, respectivamente. La evolución de las bandas con el pH indica cómo evoluciona la estructura terciaria de la enzima con el cambio de este parámetro. Una modificación ácida del pH no produce cambios significativos hasta un pH < 1,5, al igual que ocurría con los parámetros de fluorescencia y las medidas de actividad. Por ello, la desnaturalización se debe fundamentalmente a un cambio de orientación de los aminoácidos aromáticos con respecto del grupo hemo, seguido de un proceso de agregación proteica y una pérdida del grupo hemo. En cuanto a los valores de pK_a en la zona ácida, por medidas de actividad se obtiene un valor de 4,4, el cual no coincide con el valor que se obtiene por medidas de absorbancia a 403 nm, que toma un valor de 3,0. A pH 4,4, hay un cambio significativo de la actividad

(esta se reduce al 70%) que no está relacionado con un cambio del grupo hemo. Ello sirve para entender que en la actividad enzimática de una enzima no sólo influye el centro activo sino que cambios en el entorno de otros residuos pueden modificar ligeramente la función de las proteínas.

La evolución de las bandas con el pH básico indica que aquéllas no se alteran a valores de pH comprendidos entre 6,0 y 9,0, si bien entre valores de pH 9,0 y 12,0 la banda Soret se desplaza hacia mayores longitudes de onda y crece ligeramente en intensidad. Es a $\text{pH} > 12,0$ cuando aparecen los verdaderos cambios. Los valores de pK_a , determinados en la zona básica por medidas de actividad y de los parámetros espectrales son 8,9 y 9,2, respectivamente. Por ello, en esta zona son los cambios en los mismos aminoácidos los que generan las diferencias. Este cambio de actividad y de características espectrales en el entorno del grupo hemo no está relacionado con los aminoácidos aromáticos, ya que los parámetros fluorescentes no sufren ninguna modificación a estos valores de pH. La modificación de la banda Soret indicaría una alteración en el grupo hemo.

Cuando se trata la RPTP con excesos de $\sim 0,5$, 4 y 500 de peróxido de hidrógeno, en ausencia de sustrato reductor, se obtiene los Col, Coll y ColIII, respectivamente, pudiéndose apreciar las características espectrales de estas formas enzimáticas modificadas. Estos compuestos tienen las mismas características que los de otras peroxidasas de clase III, en cambio, sus tiempos de vida media son diferentes. Normalmente, las peroxidasas de clase III, también llamadas guayacol-peroxidasas, generan un Col bastante estable y, sin embargo, son las ascorbato peroxidasas las que generan Col muy inestables que se transforman rápidamente en Coll sin la adición de sustratos reductores (Patterson *et al.*, 1995). El comportamiento de la peroxidasa de palma real es más propio de una ascorbato peroxidasa que de una peroxidasa de clase III. Revisando los comportamientos de otras peroxidasas del mismo tipo, se observa que la peroxidasa de soja se comporta del mismo modo que la RPTP, es decir que el Col es estable menos de 5 min, reduciéndose a Coll y cuando se trabaja con cantidades muy pequeñas de peróxido de hidrógeno, el Col retorna a la enzima nativa sin llegar a reducirse a Coll, compuesto que se determina fácilmente y es estable durante al menos 2 h (Nissum *et al.*, 2001). Este fenómeno también se observa en el caso de la peroxidasa de hojas de té (Kvaratskhelia *et al.*, 1997). La peroxidasa aniónica de tabaco, sin embargo, presenta el comportamiento típico de una peroxidasa de clase III: formación de un Col estable durante 20 min, un ColIII estable durante más de 40 min, y la imposibilidad de apreciar el Coll, ya que es mucho más activo que el Col (Gazaryan *et al.*, 1995). Por otro lado, la peroxidasa de rábano se comporta como las peroxidasas de palma real, de soja y de hojas de té. La explicación de esta diferencia en enzimas del mismo tipo se encuentra en su estructura primaria. Todas las peroxidasas están caracterizadas por poseer una serie de péptidos altamente conservados en el entorno del grupo hemo, pero existe cierta variabilidad en

secuencias que controlan el acceso al centro activo. Si se comparan estas secuencias, la peroxidasa aniónica de tabaco tiene un grupo cargado negativamente (Glu141) que se corresponde con el grupo (Phe143) de la peroxidasa de rábano, lo cual influye claramente sobre la reactividad hacia diferentes sustratos, sobre la accesibilidad de donadores de electrones al centro activo y sobre la estabilidad del Col. En el caso de la peroxidasa de palma real, posee un Phe143 al igual que la peroxidasa de rábano y la peroxidasa de soja, de ahí, su similar comportamiento.

➤ **Estructura primaria de la RPTP**

La RPTP es una oxidorreductasa que posee 323 residuos y una masa molecular desglicosilada de 33760,5 Da. El porcentaje de glicosilación es de ~ 24%. En su estructura, aparecen 12 posibles sitios de N-glicosilación (N8, N28, N60, N71, N114, N144, N154, N187, N211, N256, N267 y N298) que forman parte de la secuencia consenso NX(S/T), necesaria para que exista glicosilación, siendo X cualquier aminoácido. Mediante el análisis de los péptidos tripticos, las posiciones 8, 28, 144, 187 y 298 están N-glicosiladas (5645,1 Da), los N de las posiciones 71, 114 y 154 no están glicosiladas. Por ello, las posiciones 60, 211, 256 y 267 deben de estar N-glicosiladas (5183 Da), ya que los estudios de la estructura tridimensional, revelan 9 sitios de glicosilación. El patrón de glicosilación propuesto de la RPT se muestra en el Fig. 65, con 24 residuos cargados negativamente (Asp, Glu) y 16 con carga positiva (Arg, Lys).

Tabla LI. Cantidad de cada uno de los residuos que posee la RPTP. Los datos han sido obtenidos con la herramienta ProtParam del programa ExPASy.

Residuo	Cantidad	Abundancia (%)
Ala	45	13,9
Arg	10	3,1
Asn	22	6,8
Asp	14	4,3
Cys	8	2,5
Gln	12	3,7
Glu	10	3,1
Gly	20	6,2
His	5	1,5
Ile	16	5,0
Leu	30	9,3
Lys	6	1,9
Met	7	2,2
Phe	13	4,0
Pro	14	4,3
Ser	30	9,3
Thr	30	9,3
Trp	1	0,3
Tyr	6	1,9
Val	22	6,8

La distribución de aminoácidos de la RPTP se muestra en la Tabla LI, siendo el residuo del extremo N-terminal un Asp (D). Se clasifica como proteína estable, con un índice de inestabilidad de 33,81.

➤ Estructura secundaria de la peroxidasa de palma real por DC

Las peroxidasas de rábano (cHRP), la aniónica de cacahuete (aPrx) y la de palmera *Chamaerops excelsa* (CEP) tienen un contenido de estructuras secundarias bastante similar al de la RPTP, con un elevado porcentaje de α -hélices (~ 40%), hojas β (~ 10%) y estructuras desordenadas (~ 25%). Sin embargo, la peroxidasa de palma africana (AOPTP) difiere del resto, pensándose, hasta ahora, que su pobre homología con el resto de peroxidasas (~20%) es la causa de esta diferencia (Tabla LII).

Tabla LII. Datos comparativos del contenido en estructuras secundarias de diferentes peroxidasas de plantas. [1] Pina *et al.*, 2001; [2] Zamorano *et al.*, 2004; [3] Zamorano *et al.*, 2009; [4] Zamorano *et al.*, 2008; [5] Rodríguez *et al.*, 2002. (N) nativa y (D) desnaturalizada.

Enzima	(α -hélices) _N	(α -hélices) _D	(Hojas β) _N	(Hojas β) _D	(Desord.) _N	(Desord.) _D	Ref.
cHRP	42	27	11	17	26	38	[1]
aPrx	47,2	30,4	6,2	9,0	20,0	37,4	[2]
CEP	38	10	7	28	33	47	[3]
RPTP	41	8	12	20	27	56	[4]
AOPTP	14,9	11,7	37,8	23,1	29,7	49,6	[5]

➤ Estructura tridimensional de la RPTP

Los cristales de la RPTP pertenecen al grupo espacial trigonal P3₁21, con unas dimensiones de la celda unidad que son a = b = 116,83 Å y c = 92,24 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$ y que contienen una molécula de proteína por unidad asimétrica.

El modelo final indica que la RPTP es una glicoproteína monomérica, compuesta por una cadena polipeptídica. Posee una masa molecular de 44,6 kDa y tiene 304 residuos, además de un grupo hemo, dos iones calcio (Ca²⁺), ocho iones sulfato (SO₄²⁻), una molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una molécula de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), 16 moléculas de etilenglicol y 586 moléculas de agua. La unidad asimétrica también contiene nueve N-glicanos que están formados por 15 moléculas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac), 5 de α -L-fucosas (Fuc), 8 moléculas de manosa (Man) y una xilosa (Xyl) (Fig. 68).

La RPTP tiene 13 α -hélices: 17-28 (A), 30-45 (B), 77-90 (C), 102-112 (D), 131-137 (D'), 145-155 (E), 159-170 (F), 176-183 (F'), 198-204 (F''), 237-240 (G), 246-252 (H), 259-266 (I) y 268-284 (J) (Fig.70). Además, posee dos hélices adicionales muy cortas entre las hélices B y C: 52-54 (B') y 64-66 (B'').

Cuatro puentes disulfuro entre parejas de cisteínas altamente conservadas (11-91, 44-49, 97-299 y 176-208) que mantienen la rigidez estructural.

El centro activo está constituido por un grupo hemo que posee un átomo de hierro centrado en el plano hémico, entre los dominios distal y proximal. En el primero, los residuos altamente conservados e implicados en los procesos de catálisis ácido-base son Arg38, Phe41, His42 y Asn70; en el segundo los residuos más conservados en las peroxidasas de clase III son His169 y Asp248, estando implicados en la estabilización de los distintos estados de oxidación del hierro hémico. Otro residuo de este último dominio altamente conservado es la Ser170, ligando del átomo de calcio proximal.

Al igual que otras peroxidasas de clase III, la RPTP posee dos átomos de calcio, uno a cada lado del plano hémico, que están heptacoordinados, con una distancia de coordinación media de 2,4 Å. Todos los residuos que rodean al átomo de calcio distal (His42, Asp43, Cys44, Val46, Gly48, Cys49, Asp50, Ser52 y Glu64) están conservados en las peroxidasas de clase III y se encuentran unidos al centro activo de la enzima por una red de interacciones. Lo mismo ocurre con los residuos que rodean al átomo de calcio proximal, Ser170, Asp213, Asp223, Thr226 y Val229. Mediante una extensa red de enlaces de hidrógeno, ambos iones están conectados, actuando esta red como un conducto del flujo de electrones entre ambas regiones proteicas. La eliminación de estos iones reduce la funcionalidad y la estabilidad enzimáticas, ya que se produce una reorientación de los residuos del centro activo.

La RPTP posee un alto contenido en glicanos. Mediante análisis de difracción de Rayos X de los 12 posibles sitios de N-glicosilación, 9 contienen cadenas de glicanos, pero éstos no coinciden con los sitios de glicosilación encontrados en los mapas tripticos. Las posiciones N glicosiladas por análisis de difracción son Asn8, Asn28, Asn114, Asn144, Asn154, Asn211, Asn256, Asn267 y Asn298, frente a las encontradas en los fragmentos peptídicos que son Asn8, Asn28, Asn60, Asn144, Asn187, Asn211, Asn256, Asn267 y Asn298. Ello nos lleva a pensar que la RPTP tiene diferentes glicoformas.

➤ **Análisis de acoplamiento estadístico (SCA)**

El SCA permite conocer qué residuos están más conservados dentro del grupo de peroxidasas de plantas, estos son, los residuos directamente relacionados con el centro activo (His169, His42 y Arg38), los que mantienen la hidrofobicidad del plano hémico, necesaria para la correcta unión del sustrato (Phe152, Leu165) y otros que están implicados directamente en el mantenimiento estructural de la enzima. Hay 16 residuos con un porcentaje de conservación de sitio superior al 50%.

Otra aplicación de este análisis es poder conocer qué parejas de residuos están acopladas y por ello han evolucionado conjuntamente, mediante la determinación de la energía de acoplamiento estadístico. La matriz de acoplamiento estadístico indica la presencia de dos grupos de residuos acoplados estadísticamente basándonos en la presencia/ausencia de residuos de cisteína. Un grupo ha evolucionado con cierta dependencia de los residuos cisteína (peroxidasas de clase II y III) y el otro, en cambio, no está acoplado a ninguna cisteína y contiene aminoácidos típicos de las peroxidasas de clase I. Un conjunto de residuos involucrados en el centro activo aparece en ambos grupos. Por ello, con este estudio, aparece una nueva clasificación de las peroxidasas de plantas, por un lado las peroxidasas de clase I, ya que no contienen iones calcio, ni puentes disulfuro, y, por otro, conjuntamente las peroxidasas de clases II y III. Las peroxidasas de clase I son el ancestro común, a partir del cual han surgido las peroxidasas de clases II y III por adición a su estructura de los iones calcio y de los puentes disulfuro.

7. Conclusiones

➤ **Screening y purificación de la peroxidasa de palma real**

1. De las cinco especies de palmeras utilizadas en el screening, las hojas de la palmera real (*Roystonea regia*) poseen una actividad peroxidasa, 2, 11, 15 y 27 veces mayor que la de las palmeras *Chamaerops excelsa*, *Whashingtonia filifera*, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*, respectivamente.
2. El proceso de purificación de la peroxidasa de las hojas de la palmera real finalizó con un rendimiento del 47%.
3. Se obtiene una enzima con un 99% de pureza y una actividad específica de $\sim 6500 \text{ U mg}^{-1}$.

➤ **Características físico-químicas de la peroxidasa de palma real (RPTP)**

4. La RPTP posee una masa molecular de 44,6 kDa.
5. La RPTP posee una única isoenzima ácida, con un pI de 5,3.
6. La RPTP es una enzima altamente glicosilada, con un 24% de glicanos en su estructura.
7. La RPTP tiene un coeficiente de extinción molar a 403 nm de $60,8 \pm 2,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
8. La RPTP es una enzima dimérica en solución.

➤ **Características espectrales**

9. Como cualquier peroxidasa de la superfamilia de plantas, la RPTP 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 a 280 nm, y las bandas características α y β , que aparecen a 485-490 y 630-635 nm, respectivamente.
10. La RPTP a pH 2,0 tiene en su espectro la banda Soret a 406 nm y las bandas α y β prácticamente invariantes. A ese pH, la enzima es activa y el valor del pK_a 3,0 indica que hay un cambio en el entorno del grupo hemo que no supone pérdida de la actividad enzimática. Es a $\text{pH} < 2,0$ cuando la banda Soret se reduce y la enzima se desnaturaliza irreversiblemente por agregación.
11. La RPTP a pH 12,0 tiene la banda Soret centrada a 412 nm, apareciendo otras dos bandas a 539 y 576 nm y un ligero hombro a 355-360 nm. A ese valor de pH, la enzima es activa y el valor del pK_b de 9,2 indica un cambio en el entorno del grupo hemo, debido a una reorientación de sus aminoácidos, que no altera su actividad. Es a $\text{pH} > 13,0$ cuando se pierde la banda Soret por agregación proteica.
12. En la reacción catalítica las peroxidases pasan por diferentes formas enzimáticas: Col y Coll. La forma enzimática, Coll surge cuando se somete a la enzima a un franco exceso de peróxido, siendo estable durante 2 h con bandas características a 413, 541 y 576 nm. El Coll es estable durante

menos de 10 min, ya que retorna a la enzima nativa, y sus bandas características son 370, 413, 525-565 y 650-660. El Col es estable durante 1 h, retornando a la enzima nativa pasando a través del Coll. Sus bandas características son: 350, 400, 550-600 y 650 nm.

➤ **Estabilidad de la peroxidasa de palma real (RPTP)**

13. La RPTP es activa en un intervalo de pH comprendido entre 2,0 y 13,0. A valores extremos de pH, la enzima se desnaturaliza irreversiblemente, debido a un proceso de agregación proteico.
14. La desnaturalización térmica de la RPTP a pH 7,0 es un proceso reversible, por lo tanto controlado termodinámicamente, que se ajusta a un modelo de desnaturalización acoplado con un proceso de disociación, de la enzima dimérica: $N_2 \leftrightarrow 2U$.
15. Los valores de ΔG (25 °C) a pH 7,0 y 3,0 indican que la RPTP tiene una estabilidad de $23,3 \pm 0,1$ y $15,0 \pm 0,1$ kcal mol⁻¹, respectivamente. Por ello, la contribución de los pares iónicos a la estabilidad de la RPTP es de 8 kcal mol⁻¹.
16. La desnaturalización térmica de la RPTP 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: $125,4 \pm 3,3$ kcal mol⁻¹ y $341,7 \pm 2,4$ K (Fluorescencia), $124,1 \pm 3,1$ kcal mol⁻¹ y $343,5 \pm 1,7$ K (DC) y $128,8 \pm 0,5$ kcal mol⁻¹ y $342,0 \pm 0,1$ 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.
17. La desnaturalización química con GuHCl indica que la estabilidad de la enzima, en ausencia de agente desnaturalizante, a pH 7,0 y 25 °C es de $23,3 \pm 0,3$ kcal mol⁻¹. Este proceso se ajusta a un modelo de dos estados, el dímero plegado y el monómero desplegado. El dato de ΔG (25 °C) y pH 7,0 es semejante al obtenido mediante calorimetría.
18. La RPTP mantiene su funcionalidad hasta concentraciones salinas de 5,2 M.

➤ **Estudios cinéticos**

19. La RPTP oxida una gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos, en presencia de H₂O₂, siguiendo un mecanismo *ping-pong*.
20. La RPTP es muy reactiva con los sustratos ácido ferúlico y ABTS, seguidos de las aminas aromáticas (o-dianisidina y o-fenilendiamina) y, finalmente, de los compuestos fenólicos con uno o dos grupos hidroxilo en su estructura (guayacol y catecol).

21. La RPTP presenta inhibición competitiva por sustrato, tanto para el sustrato reductor (ácido ferúlico) como para el peróxido. Con el peróxido, la inhibición es del orden de 50 veces más rápida que con el sustrato reductor.
22. La RPTP presenta inactivación por sustrato suicida, siendo este sustrato el peróxido de hidrógeno. Aún así, es más resistente a este sustrato que el resto de peroxidases de clases I, II y III.

➤ **Análisis estructural de la peroxidasa de palma real (RPTP)**

23. La RPTP tiene una estructura secundaria en la que predominan las α -hélices (54%). Cuando la enzima se desnaturaliza térmicamente a pH 3,0, se reduce mucho el contenido de estas estructuras (8%) a favor de las estructuras desordenadas (56%) y las hojas β (20%). El análisis de difracción revela la existencia de 15 α hélices.
24. Los análisis de la secuencia de aminoácidos mediante espectrometría de masas y técnicas de Biología Molecular revelan que posee 323 aminoácidos, un extremo N-terminal sin bloquear y 12 posibles sitios de glicosilación, de los cuales tres no están glicosilados.
25. La RPTP, mediante estudios de difracción de Rayos X, contiene en su estructura primaria 304 aminoácidos, un grupo hemo como centro activo, 2 iones calcio, 8 iones sulfato, una molécula de peróxido de hidrógeno, una molécula de MES, 16 moléculas de etilenglicol, 586 moléculas de agua, 4 puentes disulfuro y 9 sitios de glicosilación.
26. Los sitios de N-glicosilación no coinciden en ambos estudios, por lo que se concluye que la RPTP posee diferentes glicofomas.
27. El análisis de acoplamiento estadístico (SCA) revela que los residuos más conservados en las peroxidases de la superfamilia de plantas son los que están implicados en los procesos de catálisis (His169, His42, Arg38, Asn248) y en el mantenimiento de la estructura del centro activo (Phe152, Lys84, Arg123, etc.).
28. Un análisis de acoplamiento hace una nueva clasificación de las peroxidases de la superfamilia de plantas, dividiéndolas en dos grupos, por un lado las peroxidases de clase I, que serían el ancestro común, a partir del cual surgiría el segundo grupo (clases II y III), por adición de los iones calcio y los puentes disulfuro. Entre estos dos grupos tan solo existe un 14% de homología, correspondiente a los residuos implicados en los procesos de catálisis.

8. Bibliografía

- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Loerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., & Terwilliger, T.C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Cryst. D58* (2002) 1948-1954.
- 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.
- 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.
- Agostini, E., Coniglio, M.S., Milrad, S.R., Tigier, H.A., Giulietti, A.M. Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 139-144
- Akkara, J.A., Senecal, K.J., & Kaplan, D.L. Síntesis 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.
- 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 of folding of T4 lysozyme. *Biochemistry* 29 (1990) 2403-2408.
- Anfinsen, C. B., Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181 (1973) 223-230.
- Anglero, J.I. Información sobre árboles ornamentales y de sombra. Río Piedras, PR: Universidad de Puerto Rico, Servicio de Extensión Agrícola (1959) s.p.
- Arai, M.; Kuwajima, K., Role of the molten globule state in protein folding, *Adv. Protein Chem.*, 53 (2000) 209-282
- Arseguel, D., & Baboulène, M. Removal of phenol from coupling of tale and peroxidase. Application for depollution of waste water containing phenolic compounds, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 61 (1994) 331-335.
- Azuaga, A.I., Conejero-Lara, F., Rivas, G., de Filippis, V., Fontana, A., & Mateo, P.L. The thermodynamics of association and unfolding of the 205-316 C-terminal fragment of thermolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1252 (1995) 95-102.
- Azuaga, A.I., Galisteo, M.L., Mayorga, O.L., Cortijo, M., & Mateo, P.L. Heat and cold denaturation of beta-lactoglobulin B. *FEBS Lett.* 309 (1992) 258-260.
- Bach, D., & Chapman, D. "Biological Microcalorimetry" (Beezer, A.E., Ed.) Academic Press, London (1980) pag. 265.
- Banci, L. Structural properties of peroxidases, *J. Biotechnol.* 53 (1997) 253-263.
- Banci, L., Bertini, I., Capannoli, C., Del Conte, R., Tien, M. Spectroscopic characterization of active mutants of manganese peroxidase : mutations on the proximal side affect calcium binding of the distal side. *Biochemistry* 38 (1999) 9617-9625
- Barber, K.R., Rodríguez-Marañón, M.J., Shaw, G.S., van Huystee, R.B. Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 232 (1995) 825-833
- Barret, O.W. The food plants of Puerto Rico. Journal of the Department of Agriculture of Puerto Rico 9-2 (1925) 61-208.
- Bartlett, G.J., & Taylor, W.R. Using scores derived from statistical coupling analysis to distinguish correct and incorrect folds in de-novo protein structure prediction. *Proteins* 71-1 (2008) 950-959.

- Becktel, W.J., & Schellman, J.A. Protein stability curves, *Biopolymers* 26 (1987) 1859-1877.
- Benson, A.M., Suruda, A.J., & Talalay, P. Concentration-dependent association of Δ -3-ketosteroid isomerase of *Pseudomonas testosterone*. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 276-280.
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 417 (2002) 463-468.
- Berkowitz, S.A. Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals. *The AAPS Journal* 8-3 (2006) 590-605.
- Bernards, M.A., Kristen Summerhurst, D., Razem, F.A. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 113-126
- Bhunia, A., Durani, S., Wangikar, P.P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol. Bioeng.* 72(5) (2002) 562-567
- Bohne-Lang, A., & von der Lieth, C.W. Glycosylation of proteins: a computer based method for the rapid exploration of conformational space of N-glycans. *Pac. Symp. Biocomput.* (2002) 285-296.
- Bolscher, B.G.J.M., Plat, H., & Wever, R. Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 784 (1984) 177-186
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
- Brandts, J.F. The thermodynamics of protein denaturation. I. The denaturation of Chymotrypsinogen. *J. AM. Chem. Soc.* 86 (1964) 4291-4301.
- Brunet, J. F.; González, G. A.; Sotomayor, C. P., Intramolecular tryptophan heme energy transfer in horseradish peroxidase, *Photochem. Photobiol.* 38 (1983) 253-254.
- 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 complexes of polyaniline and poly(2-acrylamido-3-methyl-1-propane-sulfonic acid) catalyzed by pH-stable palm peroxidase, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1360-1306.
- Caramyshev, A.V., Firsova, Y.N., Slasya, 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. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9888-9894.
- Caza, N., Bewtra, J.K., Biswas, N., Taylor, K.E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res.* 33 (1999) 3012-3018
- Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH, *Biochemistry* 39 (2000) 263-270.
- Chivukula, M., Spadaro, J.T., Renganathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* 34(23) (1995) 7765-7772
- Cleland, W.W. The enzymes, 3rd ed., Boyer, P.D., ed. Academic, New York, Vol. II (1970) 1-65.
- Cleland, W.W. The Enzymes, 3rd ed., Hackney, D.D., ed., Academic, New York, Vol. XIX (1990) 99-158.
- Colas, C. & De Montellano, P.R. Horseradish peroxidase mutants that autocatalytically modify their prosthetic heme group: insights into mammalian peroxidase heme-protein covalent bonds. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24131-24140.

- Collaborative Computacional Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D50* (1994) 760-763.
- Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C.; Pasta, P., Recent biotechnological developments in the use of peroxidase, *Elsevier Science 17* (1999) 163-168.
- Conejero-Lara, F., & Mateo, P.L. Presence of a slow dimerization equilibrium of the thermal unfolding of the 205-316 thermolysin fragment at neutral pH. *Biochemistry 35* (1996) 3477-3486.
- Cooks, R.G., Rockwood, A.L. The "Thompson": suggested unit for mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (1991) 93.
- Cooper, V.A., Nicell, J.A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.* 30(4) (1996) 954-960
- Creighton, T. E., Protein folding, *Biochem. J.* 270 (1990) 1-16.
- DeLano, W.L. The PyMol Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA (2002).
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A.G., van Berkel, W.J. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *FEBS J.* 273(10) (2006) 2293.
- Dill, K.A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry 29* (1990) 7133-7155.
- Dordick, J.S., Marletta, M.A., & Klivanov, A.M. Polymerization of phenols catalized by peroxidase in non-aqueous media, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 31-36.
- Dowe, R.J., Erman, J.E. Physicochemical characterization of the alkaline denaturation of cytochrome c peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 827 (1985) 183-189
- Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B.E., Regalado, C., Whitaker, J.R. Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) roots. *J. Agric. Food. Chem.* 49(9) (2001) 4450-4456
- Duarte-Vázquez, M.A., Ortega-Tovar, M.A., García-Almendárez, B.E., Regalado, C. J. Renoval of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) peroxidase. *Chem. Technol. Biotechnol.* 78(1) (2003) 42-47
- Dunford, H.B. Peroxidases in Chemistry and Biology, edited by J. Everse, K.E. Everse & M.B. Grisham, Vol.II. Boca raton, FL, USA: CRC Press (1991) 1-24.
- Dunford, H.B. Heme peroxidases, *Wiley-Vch, Nueva York, USA* (1999).
- Dunford, H.B. How do enzymes work? Effect of electron circuits on transition state acid dissociation constants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 819-822.
- Eadie, G.S. The inhibicion of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. *J. Biol. Chem.* 146 (1942) 85-93.
- Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry 6* (1967) 1948-1954.
- Edman, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 283-293.
- Edman, P. On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides, *Acta Chem. Scand.* 10 (1956) 761-768.
- Emdadul Haque, Md., Debnath, D., Basak, S., Chakrabarti, A. Structural changes in horseradish peroxidase in presence of low concentration or urea. *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 269-274

- Emsley, P., & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Cryst. D60* (2004) 2126-2132.
- Erman, J.E., Vitello, L.B., Miller, M.A., Shaw, A., Brown, K.A. & Kraut, J. Histidine 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome c peroxidase compound I. *Biochemistry*, 32 (1993) 9798-806.
- Estabrook, R.A., Luo, J., Purdy, M.M., Sharma, V., Weakliem, P., Bruice, T.C., & Reich, N. Statistical coevolution analysis and molecular dynamics: Identification of amino acid pairs essential for catalysis. *PNAS* 102-4 (2005) 994-999.
- Evans, J.J. Spectral similarities and kinetic differences of two tomato plant peroxidase isoenzymes. *Plant Physiol.* 45 (1970) 66-69.
- Evans, P.R. Data reduction, *Proceedings of CCP4 Study Weekend* (1993) 114-122.
- Everett, R.R., Soedjak, H.S., & Butler, A. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. *J. Biol. Chem.* 265-26 (1990) 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.
- Faugeron, C., Lhernould, S., Lemoine, J., Costa, G., Morvan, H. Identification of unconjugated N-glycans in strawberry plants. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (1997) 891-895
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., & Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (1989) 64-71.
- 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.
- Ferapontova, E. E., Grigorenco, G. V., Egorov, M. A., Borchers, T., Ruzgas, T., Gorton, L. Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold. *Biosens. Bioelectron.* 16(3) (2001) 147-157
- Filimonov, V.V., & Rogov, V.V. Reversible association of the equilibrium unfolding intermediate of λ Cro Represor. *J. Mol. Biol.* 225 (1996) 767-777.
- Filizola, M., & Loew, G.H. Probing the role of protein environment in compound I formation of chloroperoxidase (CPO). *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 3599-3605.
- Finzel, B.C., Poulos, T.L., Kraut, J. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13027-13036
- Francis, J.K. Roystonea borinquena O.F. Cook. Puerto Rican royal palm. SO-ITF-SM-55. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station (1992) 5 p.
- Freire, E. Thermal denaturation methods in the study of protein folding. *Methods Enzymol.* 259 (1995) 144-168.
- Freire, E., Statistical thermodynamic analysis of the heat capacity function associated with protein folding-unfolding transitions, *Comm. Mol. Cell. Biophys.* 6 (1989) 123-140.
- Freire, E., & Biltonen, R.L. Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and applications to homogeneous systems. *Biopolymers.* 17 (1978) 463-479.
- Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., & Sánchez-Ruiz, J.M. Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19 (1990) 159-188.
- Gajhede, M. Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 91-98.

- Gajhede, M., Schuller, D.J., 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., & Lagrimini, L.M. Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry* 41(4) (1996) 1029-1034.
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., George, S.J., & Thorneley, N.F. Anionic tobacco peroxidase is active at extremely low pH: veratryl alcohol oxidation with a pH optimum of 1.8. *Biochem. J.* 320 (1996) 369-3723.
- Gazaryan, I.G., Chubar, T.A., Ignatenko, O.V., Mareeva, E.A., Orlova, M.A., Kapeliuch, Y.L., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Tishkov, V.I. Tryptophanless recombinant horseradish peroxidase: stability and catalytic properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262(1) (1999) 297-301
- Gill, S.C., & von Hippel, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analy. Biochem.* 182 (1989) 319-326.
- Greenfield, N.J. Methods to estimate the conformational of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235 (1996) 1-10.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Sturtevant, J.M., & Venyamov, S.Y. Cold denaturation of Staphylococcal nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3343-3347.
- Harthill, J.E., Ashford, D.A.N. N-glycosylation of horseradish peroxidase from cell culture. *Biochem. Soc. Trans.* 20 (1992) 113
- Haschke, R.H., Friedhoff, J.M. Calcium related properties of horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 80(4) (1978) 1039-1042.
- Hendsch, Z.S. & Tidor, B. Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. *Protein Science* 3 (1994) 211-226.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G., & Gajhede, 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., Schuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T., & Gajhede, M. Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry* 37 (1998) 8054-8060.
- Henriksen, A., Smith, A.T., & Gajhede, M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35005-35011.
- 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.
- Hill, B.C., Horowitz, P.M., & Robinson, N.C. Detection, characterization, and quenching of the intrinsic fluorescence of bovine heart cytochrome c oxidase, *Biochemistry* 25 (1986) 2287-2292.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1193A-1203A.
- Hiner, A.N.P., Hernández-Ruiz, J., García-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.* 234 (1995) 506-512.
- Hiner, A.N.P., Rodríguez-López, J.N., Arnao, M.B., Lloyd Raven, E., García-Canovas, F., & Acosta, M. A. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 348 (2000) 321-328.

- Hiner, A.N.P., Hernández-Ruíz, J., Rodríguez-López, J.N., García-Canovas, F., Brisset, N.C., Smith, A.T., Arnao, M.B., & Acosta, M. A. Reactions of the Class II peroxidases, lignin peroxidase and *Arthromyces ramosus* peroxidase, with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 277(30) (2002) 26879-26885.
- 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.
- Hofstee, B.H. On the evaluation of the constants V_m y K_M enzyme reactions. *Science* 116 (1952) 329-331
- Hoshino, F., Kajino, T., Sugiyama, H., Asami, O., Takahashi, H. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. *FEBS Lett.* 530 (2002) 249-252
- Howard, R.A. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Monocotyledoneae. Jamaica Plain, MA: Harvard University, Arnold Arboretum. Vol.3 (1979).
- Howes, B.D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C. & Smulevich, G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276 (2001a) 40704-40711.
- Howes, B.D., Veitch, N.C., Smith, A.T., White, C.G. & Smulevich, G. Haem-linked interactions in horseradish peroxidase revealed by spectroscopic analysis of the Phe-221-->Met mutant. *Biochem. J.* 353 (2001b) 181-191.
- Hu, C., Krol, M., van Huystee, R.B. Comparison of anionic with cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Plant Cell* 22 (1990) 65-70
- Hu, C., Lee, D., Chibbar, R.N., van Huystee, R.B. Ca^{2+} and peroxidase derived from cultured peanut cells. *Physiol. Plant* 70 (1987) 99-102
- Hu, C., Smith, R., van Huystee, R. Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and anionic isoenzymes. *J. Plant Physiol.* 135 (1989) 391-397.
- Hu, C.F., van Huystee, R.B. Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases. *Biochem. J.* 263 (1989) 129-135
- Hunter, M.J. A method for the determination of protein partial specific volumes. *J. Phys. Chem.* 70 (1966) 3285-3292.
- Jaenicke, L. A rapid micromethod for the determination of nitrogen and phosphate in biological material. *Anal. Biochem.* 61 (1974) 623-627.
- Johnson, W.C., Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7 (1990) 205-214.
- Johnson, W.C., Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35 (1999) 307-312.
- Kaposi, A.D., Fidy, J., Manas, E.S., Vanderkooi, J.M., Wright, W.W. Horseradish peroxidase monitored by infrared spectroscopy: effect of temperature, substrate and calcium. *Biochim. Biophys. Acta* 1435 (1999) 41-50
- Kawamura, S., Tanaka, I. & Kimura, M. Contribution of a SALT bridge to the thermostability of DNA binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* determined by site directed mutagenesis. *J. Biochem.* 121 (1997) 448-455.
- Karas, M., Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299-2301.
- Kedderis, G.L., & Hollenberg, P.F. Steady State Kinetics of chloroperoxidase-catalyzed N-demethylation reactions. *J. Biol. Chem.* 258-20 (1983) 12413-12419.
- Kim, Y.H., An, A.S., Song, B.K., Kim, D.S., Chelikani, R. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnol. Lett.* 25(18) (2003) 1521-1524

- Kinsley, C., Nicell, J.A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores. Technol.* 73 (2000) 139-146
- Klumpp, G., Furlan, C.M., Domingos, M., Klumpp, A. Response of stress indicators and growth parameters of *Tiobuchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatao, Brazil. *Sci. Total Environ.* 246(1) (2000) 79-91
- Kresheck, G.C., Erman, J.E. Calorimetric studies of the thermal denaturation of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 27 (1988) 2490-2496
- Kumar, S. & Nussinov, R. Salt bridge stability in monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* 293 (1999) 1241-1255.
- Kupke, D.W., & Dorrier, T.E. Protein concentration measurements: The dry weight. *Methods Enzymol.* 48 (1978) 155-162.
- 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 protein denaturation, *Biophys. Chem.*, 69 (1997) 125-135.
- Kuwajima, K. Circular Dichroism. *Methods Mol. Biol.* 40 (1995) 115-135.
- Kuwajima, K., The molten-globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6 (1989) 87-103.
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C., & Thorneley, R.N.F. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology* 114 (1997) 1237-1245.
- Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R. & Fidy, J. The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the heme. *Biophys. J.* 84 (2003) 2542-2552.
- Lamm, O. Die differentialgleichung der ultrazentrifugierung. *Ark Mat Astr Fys Part B.* 21B (1929) 1-4.
- Laue, T.M. Sedimentation equilibrium as a thermodynamic tool. *Methods Enzymol.* 259 (1995) 427-452.
- Lavid, N., Schwartz, A., Lewinsohn, E., Tel-Or, E. Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaeae* (Nymphaeaceae). *Planta* 214 (2001) 189-195
- Le Blanc, J.C., Hager, J.W., Ilisiu, A.M., Hunter, C., Zhong, F., & Chu, I. Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q TRAP) used for high sensitivity proteomics applications. *Proteomics* 3 (2003) 859-869.
- Leslie, A.G.W. Recent changes to the MOSFLM package for processing filmimage plate data. *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.* 26 (1992).
- Leonard, J.J., Yonetani, J. Interaction of cytochrome c peroxidase with cytochrome c. *Biochemistry* 13(7) (1974) 1465-1468
- Lige, B., Ma, S. & van Huystee, R.B. The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Arch. Biochem. Biophys.* 386 (2001) 17-24.
- Lindgren, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Csöregi, E., Bautista Ardila, G., Sakharov Yu, I., 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
- Lineaweaver, H., Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658-666.
- Liu, W., Kumar, J., Treipathy, S., Senecal, K.J., & Samuelson, L. Enzymatically synthesized conducting polyaniline, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 71-78.

- Lockless, S.W., & Ranganathan, R. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 286 (1999) 295-299.
- Loo, S., Erman, J.E. A kinetic study of the reaction between cytochrome c peroxidase and hydrogen peroxide. Dependence on pH and ionic strength. *Biochemistry* 14 (1975) 3467.
- 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 (Moscú)* 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 (Moscú)* 64 (1999) 832-838.
- Mabrey, S., & Sturtevant, J. M. High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems. *Methods Membr. Biol.* 9 (1978) 237-274
- MacDiarmid, Alan. G., Polyaniline and polypyrrole: where are we headed?, *Synth. Met.* 84 (1997) 27-34.
- Makino, R., Chiang, R., Hager, L.P. Oxidation-reduction potential measurements on chloroperoxidase and its complexes. *Biochemistry* 15 (1976) 4748-4754.
- Malik, V., Pundir, C. Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on arylamine glass. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 (2002) 191-197
- Manavalan, P., Johnson, W.C. Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 167-1 (1987) 176-185.
- Manly, S.P., Matthews, K.S., & Sturtevant, J.M. Thermal denaturation of the core protein of lac repressor, *Biochemistry* 24 (1985) 3842-3846.
- Marquez, L.A., Quitoriano, M., Zilinskas, B.A., & Dunford, H.B. Kinetic and spectral properties of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Letters* 389 (1996) 153-156.
- Marti, D.N. & Bosshard, H.R. Electrostatic interactions in leucine zippers: thermodynamic analysis of the contributions of Glu and His residues and the effect of mutating salt bridges. *J. Mol. Biol.* 330 (2003) 621-637.
- Martinez, C., Montillet, J., Bresson, E., Agnel, J., Dai, G., Daniel, J., Geiger, J., Nicole, M. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11 (1998) 1038-1047.
- Matthews, B.W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 491-497.
- McEldoon, J.P., Dordick, J.S. Extraordinary thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 555-558
- Medda, R., Padiglia, A., Longu, S., Bellelli, A., Arcovito, A., Cavallo, S., Pedersen, J.Z., Floris, G. Critical role of Ca²⁺ ions in the reaction mechanism of Euphorbia characias peroxidase. *Biochemistry* 42(29) (2003) 8909-8918
- Mehlhorn, H. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant, Cell & Environ.* 13(9) (1990) 971-976
- Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J., & Needleman, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263 (8) (1988) 3550-3553

- Millis, C.D., Cai, D., Stankovic, M.T., Tien, M. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28 (1989) 8484-8489
- Mirza, O., Henriksen, A., Ostergaard, L., Welinder, K.G. & Gajhede, M. Arabidopsis thaliana peroxidase N: structure a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallogr. Sect. D* 56 (2000) 372-375.
- Montgomery, D., Jordan, R., McMacken, R., & Freire, E. Thermodynamic structural analysis of the folding/unfolding transitions of the *E. coli* molecular chaperone DnaK. *J. Mol. Biol.* 232 (1993) 680-692.
- Morales, M., & Ros-Barceló, A. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 45-2 (1997) 229-232.
- Morin, P.E., Diggs, D., & Freire, E. Thermal stability of membrane-reconstituted yeast cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 29 (1990) 781-788.
- Morita, Y., Funatsu, J., & Mikami, B. Plant peroxidases: Biochemistry and Physiology, editado por K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penel & H. Greppin, Génova (Universidad de Génova) (1993) 1-4.
- Morohashi, Y. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1643-1650
- Morvan, H., Lhernould, S. Unconjugated N-glycans probing or signalling in plant tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 34 (1996) 335-341
- Mullis, K.G., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1 (1986) 263-73.
- Mullis, K.G., & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335-50.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood structure method. *Acta Cryst. D* 53 (1997) 240-255.
- Murthy, M.R.N., Reid III, T.J., Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M.G. Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.*, 152 (1981) 465-499
- Myers, J.K. & Pace, C.N. Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophysical J.* 71 (1996) 2033-2039.
- Myers, J.K., Pace, C.N., & Scholtz, J.M. Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.* 4 (1995) 2138-2148.
- 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.
- Newmyer, S.L. & de Montellano, P.R. Rescue of the catalytic activity of an H42A mutant of horseradish peroxidase by exogenous imidazoles. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 14891-14896.
- Nissum, M., Schiodt, C.B., & Welinder, K.G. Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4-12.0, and veratryl alcohol at pH 2.4. *Biochimica et biophysica acta* 1545 (2001) 339-348.
- Nonaka, D., Wariishi, H. & Fujii, H. Paramagnetic ¹³C and ¹⁵N NMR analyses of cyanide- (¹³C¹⁵N-) ligated ferric peroxidases: the push effect, not pull effect, modulates the compound I formation rate. *Biochemistry* 48 (2009) 898-905.
- Nozaki, Y. Determination of the concentration of protein by dry weight – A comparison with spectrophotometric methods. *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1986) 437-446.
- Ogawa, S., Shiro, Y., & Morishima, I. Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90(2) (1979) 674-678

- Oguchi, T., Tawaki, S., Uyama, H., Kobayashi, S. Soluble polyphenol. *Macromol. Rapid. Commun.* 20 (1999) 401-447
- Ostergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K.G., Mundy, J., Gajhede, M., & Henriksen, A. Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol. Biol.* 44 (2000) 231-243.
- Pace, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266-280.
- Pace, C.N. Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.* 8 (1990) 93-98.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4 (1995) 2411-2423.
- Pace, C.N. Single surface stabilizer. *Nature Struct. Biol.* 7 (2000) 345-346.
- Pace, C.N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 29-35.
- Pappa, H.S., Cass, A.E.G. A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 212 (1993) 227-235
- Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C., & Dunand, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89 (2007a) 567-579.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., & Dunand, C. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 68 (2007b) 1605-1611.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, 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
- Paul, K.G., & Stigbrand, T. Four isoperoxidases from horseradish root. *Acta Chem. Scand.* 24 (1970) 3607-3617.
- 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 H₂ 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.
- 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 protein structure. *Annu. 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.

- Ptitsyn, O. B., Molten globule and protein folding, *Adv. Protein Chem.*, **1995**, 47, 83-229.
- Ragland, B.D., Konrad, R.J., Chaffin, C., Robinson, C.A., Hardy, R.W. Evaluation of a homogeneous direct LDL-cholesterol assay in diabetic patients: effect of glycemic control. *Clin. Chem.* 46(11) (**2000**) 1848-1851
- Raitman, O.A., Katz, E., Buckmann, A.F., Willner, I. Integration of polyaniline/poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports: an in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactase in the integrated bioelectrocatalytic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 124(22) (**2002**) 6487-6496
- Ramakrishna, N., Lacey, J., Candish, A.A., Smith, J.E., Goodbrand, I.A. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay of 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., Jensen, 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. *Phytochemistry Reviews* 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 the African oil palm tree *Elaeis guineensis*, *Eur. J. Biochem.* 269 (**2002**) 2584-2590.
- Rodríguez-López, J.N., Espín, J.C., del Amor, F., Tudela, J., Martínez, V., Cerdá, A., & García-Canovas, F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48 (**2000**) 1537-1541.
- Rodríguez-López, J.N., Lowe, D.J., Hernández-Ruiz, J., Hiner, A.N.P., García-Canovas, 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 No 48 (**2001**) 11838-11847.
- Rodríguez-López, J.N., Smith, A.T., Thorneley, R.N.F. Role of arginine 38 in horseradish peroxidase. A critical residue for substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 271 (**1996**) 4023-4030.
- Rodríguez-Marañón, M.J., Stillman, M.J., van Huystee, R.B. Co-dependency of calcium and porphyrin for an integrated molecular structure of peanut peroxidase: a circular dichroism analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (**1993**) 326-332
- Ros Barceló, A. Lignification in plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* 176 (**1997**) 87-132
- Ros Barceló, A., Gómez-Ros, L.V., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J.S., Pedreño, M.A. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution. *Phytochem. Rev.* 3 (**2004**) 61-78
- Russ, W.P., Lowery, D.M., Mishra, P., Yaffe, M.B., & Ranganathan, R. Natural-like function in artificial WW domains. *Nature* 437 (**2005**) 579-583.
- Ruzgas, T., Csöregi, E., Katakis, I., Kenausis, G., & Gorton, L., Preliminary investigations of an amperometric oligosaccharide dehydrogenase-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., Marko-Varga, G. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chem. Acta.* 330 (**1996b**) 123-138.
- Ryan, B.J., O'Connell, M.J., & O'Fágáin, 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 royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties, *Plant Sci.* 161 (2001) 853-860.
- Sakharov, I.Y., Vesga Blanco, M.K., & Sakharova, I.V. Substrate specificity of African oil palm tree peroxidase, *Biochemistry (Moscu)* 67 (2002) 1043-1047.
- Sánchez-Ruiz, J.M. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry, *Biophys. J.* 61 (1992) 921-935.
- 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. *Biochemistry* 27 (1988) 1648-1652.
- Santimone, M. The mechanism of ferrocyclochrome C oxidation by a horseradish peroxidase. *Biochimie* 57(1) (1975) 91-96
- Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T., & Gorton, L. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem. J.* 340 (1999) 579-583.
- Sawano, M., Yamamoto, H., Ogasahara, K., Kidokoro, S., Katoh., Ohnuma, T., Katoh, E., Yokoyama, S., & Yutani, K. Thermodynamics basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures, *Biochemistry* 47 (2008) 721-730.
- Schellman, J.A. The thermodynamic stability of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16 (1987) 115-137.
- Schiodt, C.B., Veitch, N.C., Welinder, K.G. Roles of distal arginine in activity and stability of *Coprinus cinereus* peroxidase elucidated by kinetic and NMR analysis of the Arg51Gln, -Asn, -Leu y -Lys mutants. *J. Inorg. Biochem.* 101(2) (2007) 336-347
- Schloss, P., Walter, C., Mader, M. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabaeum* L. *Planta* 170 (1987) 225.
- Schopfer, P., Liszky, A., Bechtold, M., Frahy, G., Wagner, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214 (2002) 821-828
- Schuck, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modelling, *Biophys. J.* 78 (2000) 1606-1619.
- Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B., McPherson, A., & Poulos, T. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4 (1996) 311-321.
- Schell, D., Tsai, J., Scholtz, J.M. & Pace, C.N. Hydrogen bonding increases packing density in the protein interior. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* 63 (2006) 278-282.
- Scialabba, A., Bellani, L.M., Dell'Aquila, A. Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur. J. Histochem.* 46(4) (2002) 351-358
- Segel, I.H. Enzyme Kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *John Wiley and Sons, New York* (1975) 606-625.
- Shannon, L.M., Kay, E., Lew, J.Y. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. *Biol. Chem.* 241(9) (1966) 2166-2172.
- Sharma, A.K., Sehgal, N., Kumar, A. A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechno. Lett.* 24 (2002) 1737.

- Shaw, G.S., Sun, Y., Barber, K.R., van Huystee, R.B. Sequence specific analysis of the heterogeneous glycan chain from peanut peroxidase by 1H-NMR spectroscopy. *Phytochem.* 53 (2000) 135-144
- Shin, K-S., Kim, Y.H., Lim, J-S. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. *The Journal of Micro.* 43(6) (2005) 503-509
- Shih, J.H.C., Shannon, L.M., Kay, E., Lew, J.Y., Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. IV. Structural relationships. *J. Biol. Chem.* 246(14) (1971) 4546-4551.
- Smith, A.T., & Veitch, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current opinion in chemical biology* 2(2) (1998) 269-278.
- Smulevich, G., Paoli, M., De Sanctis, G., Mantini, A.R., Ascoli, F., & Coletta, M. Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH. *Biochemistry* 36(3) (1997) 640-649
- 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.
- Stickle, D.F., Presta, L.G., Dill, K.A. & Rose, G.D. Hydrogen bonding in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 1143-1159.
- Sturtevant, J. M. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38 (1987) 463-488.
- Süel, G.M., Lockless, S.W., Wall, M.A., & Ranganathan, R. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 59-69.
- Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y., Kim, S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochem.* 67 (2006) 219-224
- Takahashi, N., Hotta, T., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Bligny, R., Akazawa, T., Endo, S., Arata, Y. Xylose-containing common structural unit in N-linked oligosaccharides of laccase from sycamore cells. *Biochemistry* 25(2) (1986) 388-395
- 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 processes, *Biochemistry* 35 (1996) 7573-7579.
- Tamura, A., Kimura, K., Takahara, H., & Akasaka, K. Cold denaturation and heat denaturation of *Streptomyces subtilisin* inhibitor: (I). CD and DSC studies. *Biochemistry* 30 (1991) 11307-11313.
- Tatoli, S., Zazza, C., Sanna, N., Palma, A. & Aschi, M. The role of Arginine 38 in horseradish peroxidase enzyme revisited: a computational investigation. *Biophys. Chem.* 141 (2009) 87-93.
- 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.
- Tsapralis, G., Wing Sze Chan, D., English, A.M. Conformational states in denaturants of cytochrome c and horseradish peroxidases examined by fluorescence and circular dichroism. *Biochemistry* 37(7) (1998) 2004-2016
- 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., & Teplyakov, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 1022-1025.

- van Huystee, R.B., Roig, M.G., Shnyrov, V.L., & Sakharov, I.Y. Peroxidase Stability Related to Its Calcium and Glycans. *Phytochemistry Reviews* 3 (2004) 19-28.
- van Huystee, R.B., Xu, Y., O'Donnell, J. Variation in solet band absorption of peroxidase due to calcium. *Plant Physiol. Biochem.* 30(3) (1992) 293-297
- van Huystee, R.B., Sun, Y., Lige, B. A retrospective look at the cationic peanut peroxidase structure. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22(4) (2002) 335-354
- Van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., & Groen, F.C. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 191 (1990) 110-118.
- Veitch, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry Reviews* 65 (2004) 259-269.
- Veitch, N.C. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* 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.
- Vistica, J., Dam, J., Balbo, A., Yikilmaz, E., Mariuzza, R.A., Rouault, T.A., & Schuck, P. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 234-256.
- Watanabe, L., Nascimento, 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.
- Weber, P.C. Physical principles of protein crystallization. *Adv. Protein Chem.* 41 (1991) 1-36.
- Welinder, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2 (1992) 388-393.
- Welinder, K.G., & Gajhede, M. Structure and evolution of peroxidases, *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*, Universidad de Copenhague y Universidad de Génova, Génova, Suiza (1993) 35-42.
- Wendzinski, F., Gründing, B., Renneberg, R., Spener, F. Highly sensitive determination of hydrogen peroxide and peroxidase with tetrathiafulvalene-based electrodes and the application in immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* 12(1) (1997) 43-52
- Welinder, K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 151 (1985) 497-504
- Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., & Fenn, J.B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* 57 (1985) 675-679.
- Wyss, D.F., Choi, J.S., Wagner, G. Composition and sequence specific resonance assignments of the heterogeneous N-linked glycan in the 13.6 kDa adhesion domain of human CD2 as determined by NMR on the intact glycoprotein. *Biochemistry* 34(5) (1995) 1622-1634
- Xie, D., Bhakuni, V., & Freire, E. Calorimetric determination of the energetics of the molten globule intermediate in protein folding apo-alpha-lactalbumina. *Biochemistry* 30 (1991) 10673-10678.
- Xu, Y., van Huystee, R.B. Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion and activation. *J. Plant Physiol.* 141 (1993) 141.
- Yang, J.T., Wu, C.S., & Martínez, H.M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130 (1986) 208-269.
- 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 (1966) 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 of peroxidase 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 and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: A defence system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochem.* 31 (1992) 1895-1898.

Apéndices

APÉNDICE I

1. Nomenclatura de los aminoácidos esenciales con las abreviaturas de tres y una letra.

Aminoácido	Tipo	Nomenclatura	Aminoácido	Tipo	Nomenclatura
Alanina		Ala (A)	Serina		Ser (S)
Valina		Val (V)	Treonina		Thr (T)
Leucina		Leu (L)	Tirosina	Polares	Tyr (Y)
Isoleucina		Ile (I)	Asparagina		Asn (N)
Prolina	No	Pro (P)	Glutamina		Gln (Q)
Metionina	Polares	Met (M)	Ácido aspártico	Ácidos	Asp (D)
Fenilalanina		Phe (F)	Ácido glutámico		Glu (Q)
Triptófano		Trp (W)	Lisina		Lys (K)
Cisteina		Cys (C)	Arginina	Básicos	Arg (R)
Glicina		Gly (G)	Histidina		His (H)

2. El código genético

Segunda posición

Primera posición	Segunda posición				Tercera posición
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

3. Número de codones que codifican cada aminoácido

Residuo	Número de codones
M, W	1
F, Y, H, Q, N, K, D, E, C	2
I	3
V, P, T, A, G	4
L, S, R	6

4. Nomenclatura utilizada para expresar los diferentes tipos de degeneración

Código	Nucleótidos
R	A + G
Y	C + T
M	A + C
K	G + T
S	G + C
W	A + T
H	A + C + T
B	G + T + C
D	G + A + T
V	G + A + C
N	A + C + T + G

APÉNDICE II

1. Representaciones gráficas correspondientes a los estudios cinéticos de la RTPP con diferentes sustratos, que proporcionan los valores de las constantes microscópicas k_1 y k_3 .

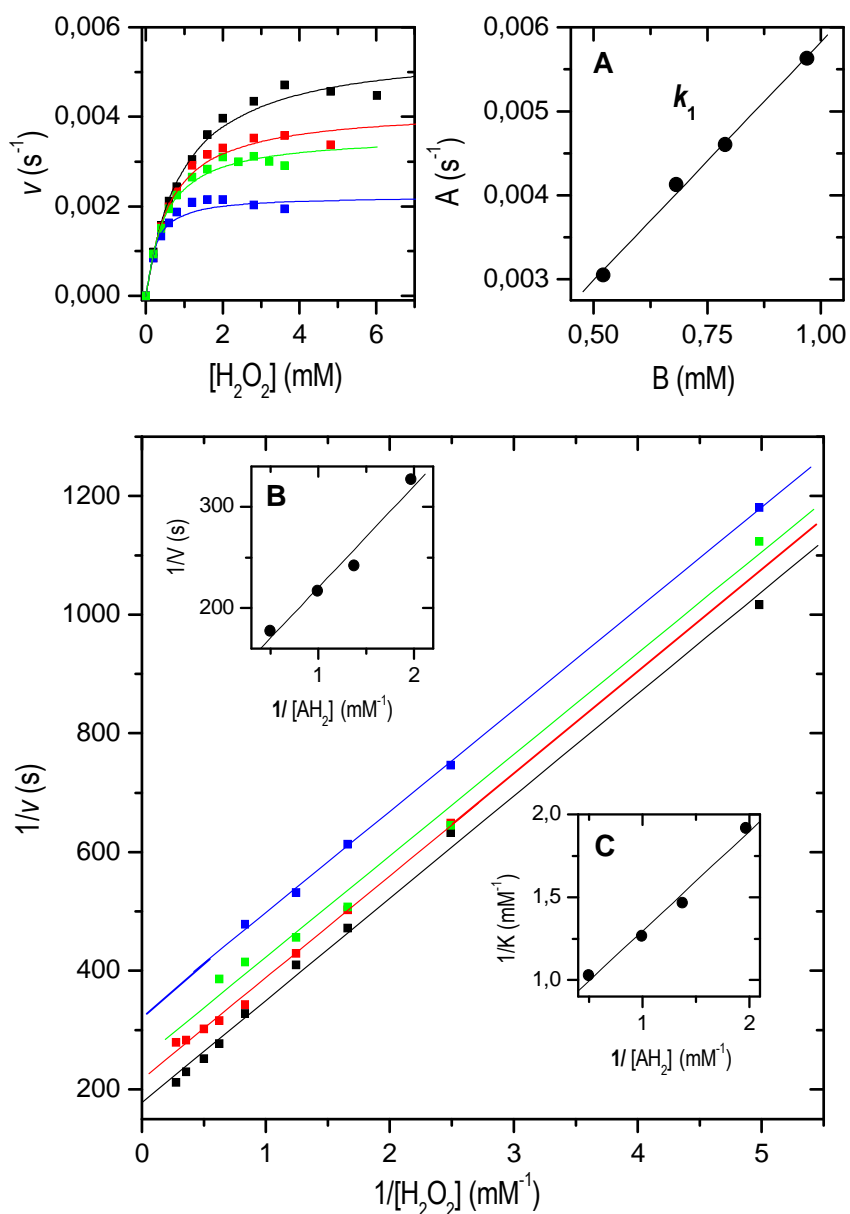


Figura 42. Parámetros cinéticos usando o-fenilendiamina como sustrato constante. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de sustrato reductor: 2,02, 1,01, 0,73 y 0,51 mM, en tampón citrato 100,0 mM, pH 6,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RTPP de $1,02 \cdot 10^{-9}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,98$.

(A) $y = 1,56E-4 \pm 2,04E-4 + (0,00567 \pm 2,70E-4) x$ ($R = 0,99775$)

(B) $y = 119,94113 \pm 17,60675 + (100,35627 \pm 13,31648) x$ ($R = 0,98284$)

(C) $y = 0,69474 \pm 0,07117 + (0,60143 \pm 0,05383) x$ ($R = 0,99209$)

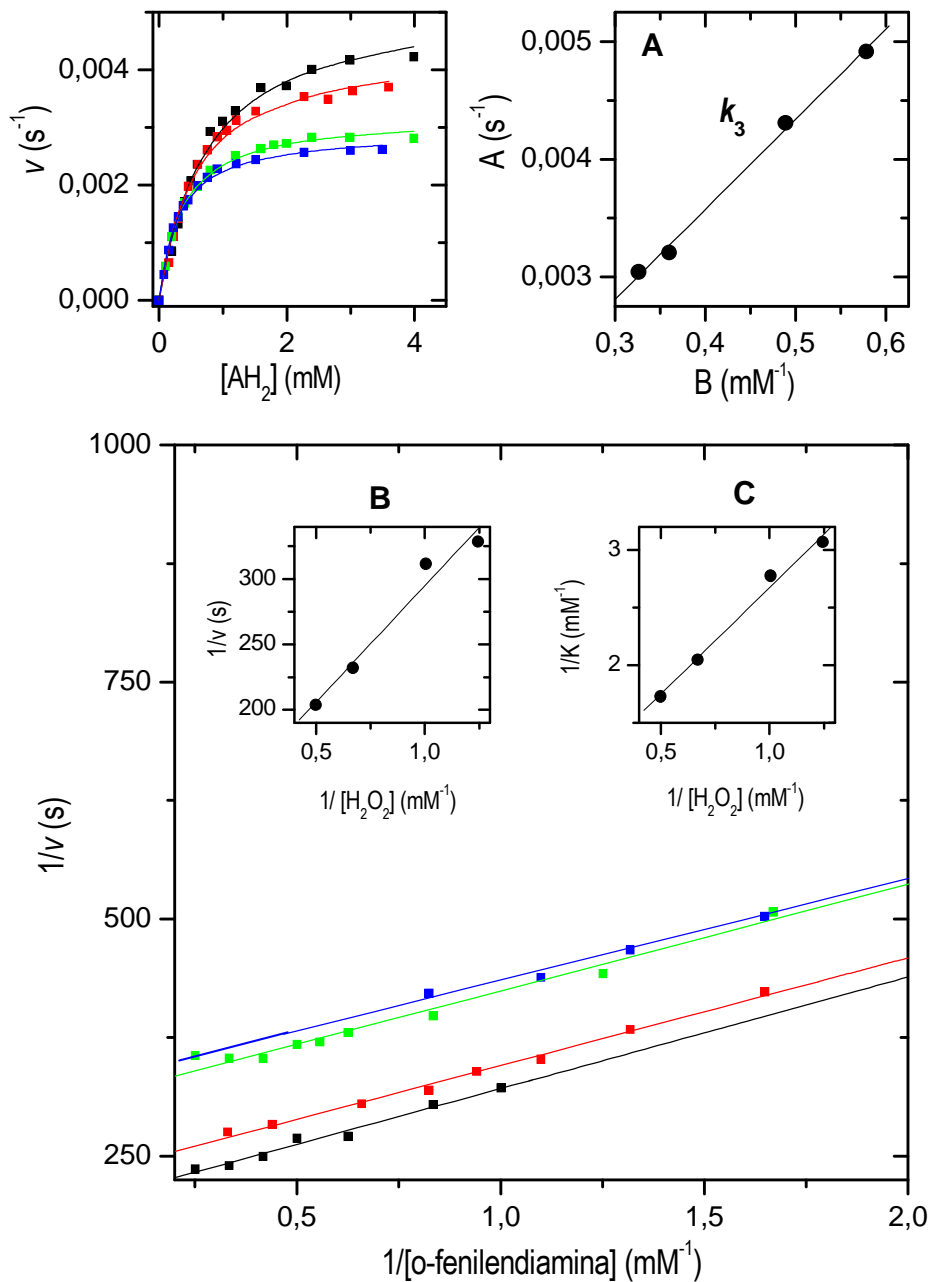


Figura 43. Parámetros cinéticos usando o-fenilendiamina como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de H₂O₂: 2,0, 1,5 1,0 y 0,80 mM, en tampón citrato 100,0 mM, pH 6,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RTP de 1,02·10⁻⁹ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación R > 0,98.

(A) $y = 5,09E-4 \pm 1,47E-4 + (0,00766 \pm 3,26E-4) x$ (R = 0,99820)

(B) $y = 117,03225 \pm 21,57774 + (177,8755 \pm 23,91312) x$ (R = 0,98240)

(C) $y = 0,82721 \pm 0,12707 + (1,84565 \pm 0,14565) x$ (R = 0,99423)

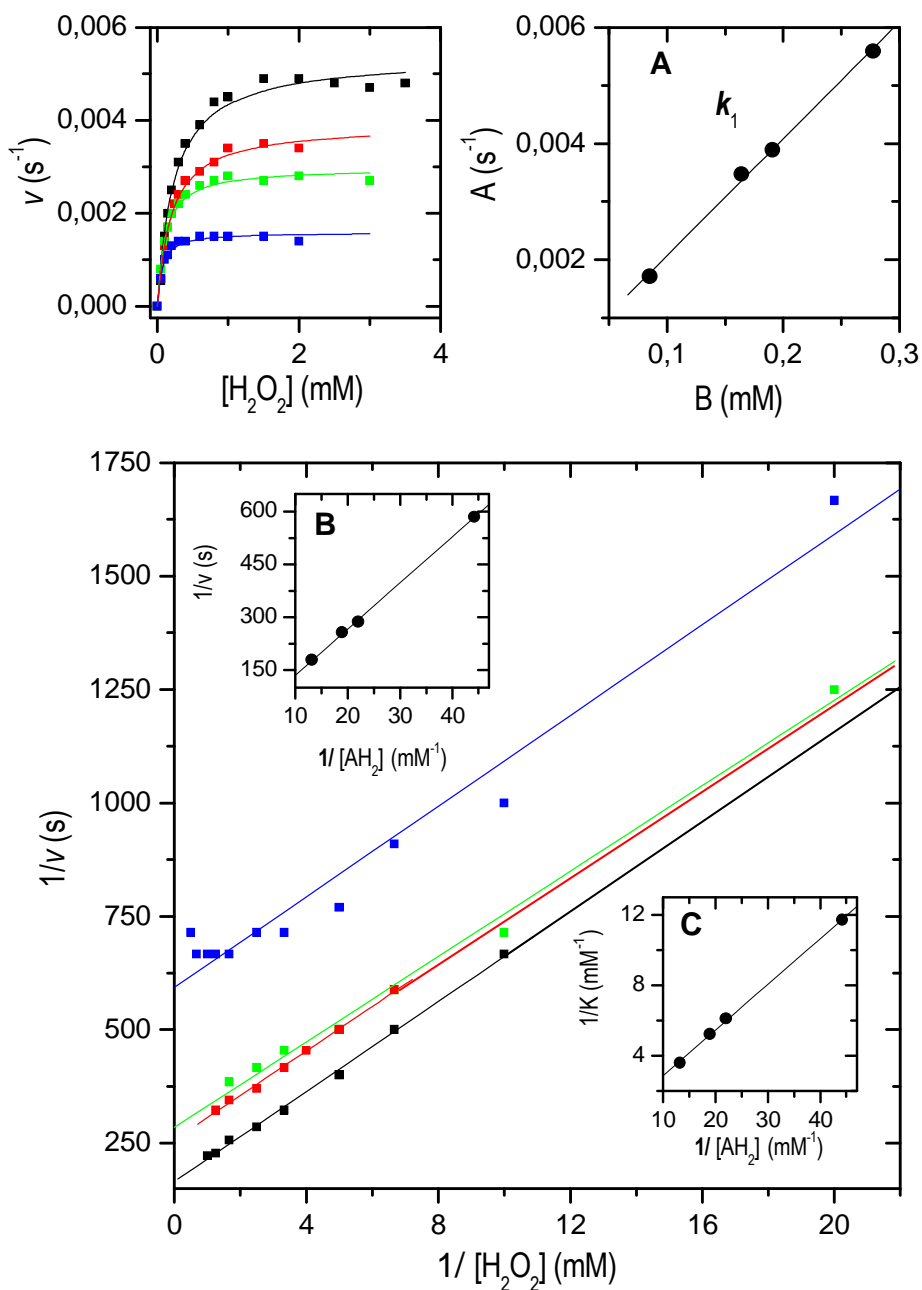


Figura 44. Parámetros cinéticos usando ácido ferúlico como sustrato constante. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de sustrato reductor: 0,076, 0,053, 0,045 y 0,023 mM, en tampón citrato 10,0 mM, pH 4,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $8,91 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 6,10E-5 \pm 1,47E-5 + (0,02011 \pm 7,65E-4) x$ ($R = 0,99856$)

(B) $y = 4,10983 \pm 6,34682 + (13,12397 \pm 0,23276) x$ ($R = 0,99969$)

(C) $y = 0,27793 \pm 0,13254 + (0,25957 \pm 0,00486) x$ ($R = 0,99965$)

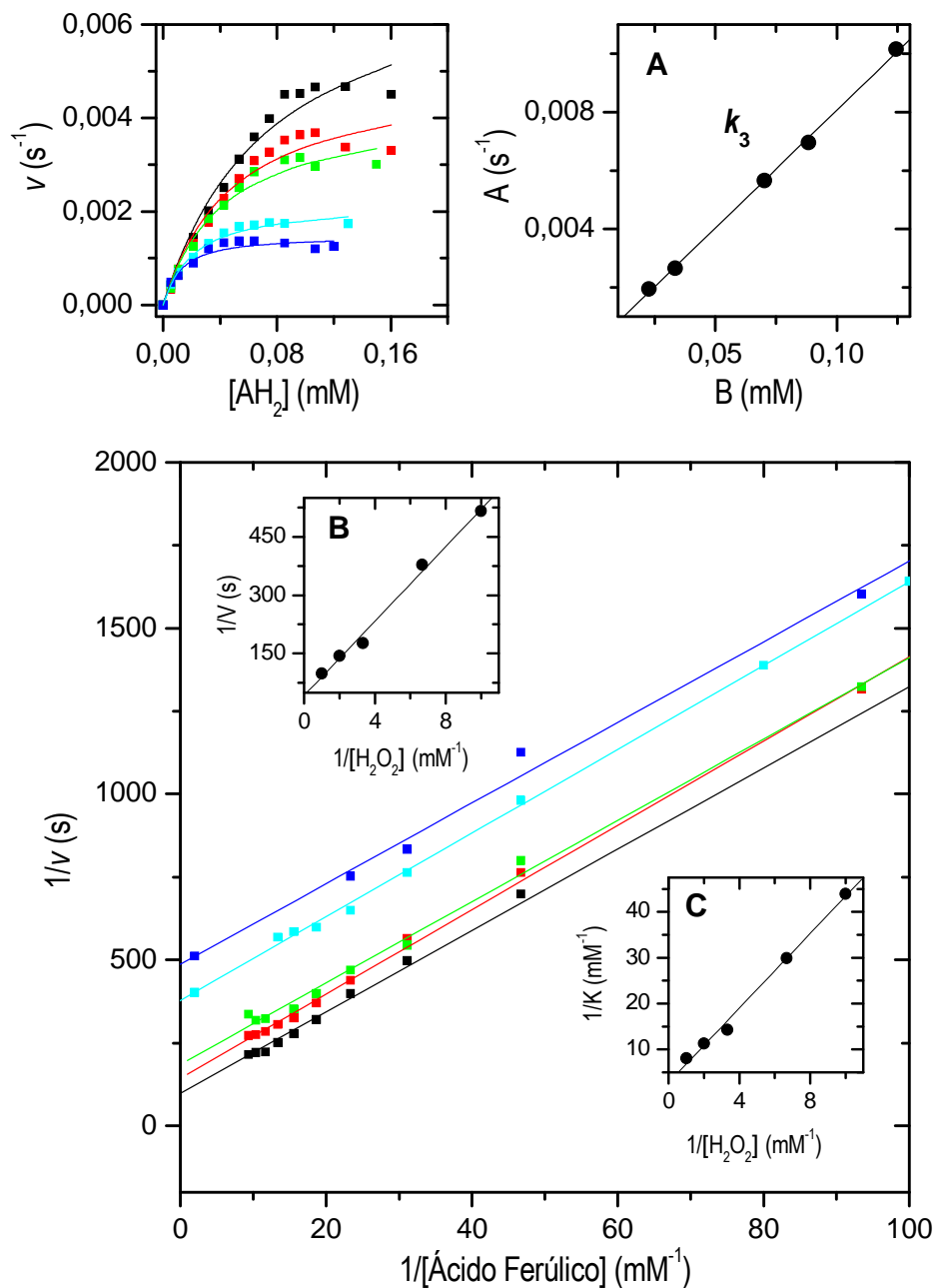


Figura 45. Parámetros cinéticos usando ácido ferúlico como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cinco concentraciones de H_2O_2 : 1,00, 0,50, 0,30, 0,15 y 0,10 mM, en tampón citrato 10,0 mM, pH 4,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $8,91 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.
 (A) $y = -3,80E-6 \pm 1,27E-4 + (0,08071 \pm 0,00165) x$ ($R = 0,99937$)
 (B) $y = 47,73667 \pm 14,07078 + (42,87837 \pm 2,48308) x$ ($R = 0,99597$)
 (C) $y = 2,78904 \pm 1,09848 + (4,06356 \pm 0,19385) x$ ($R = 0,99660$)

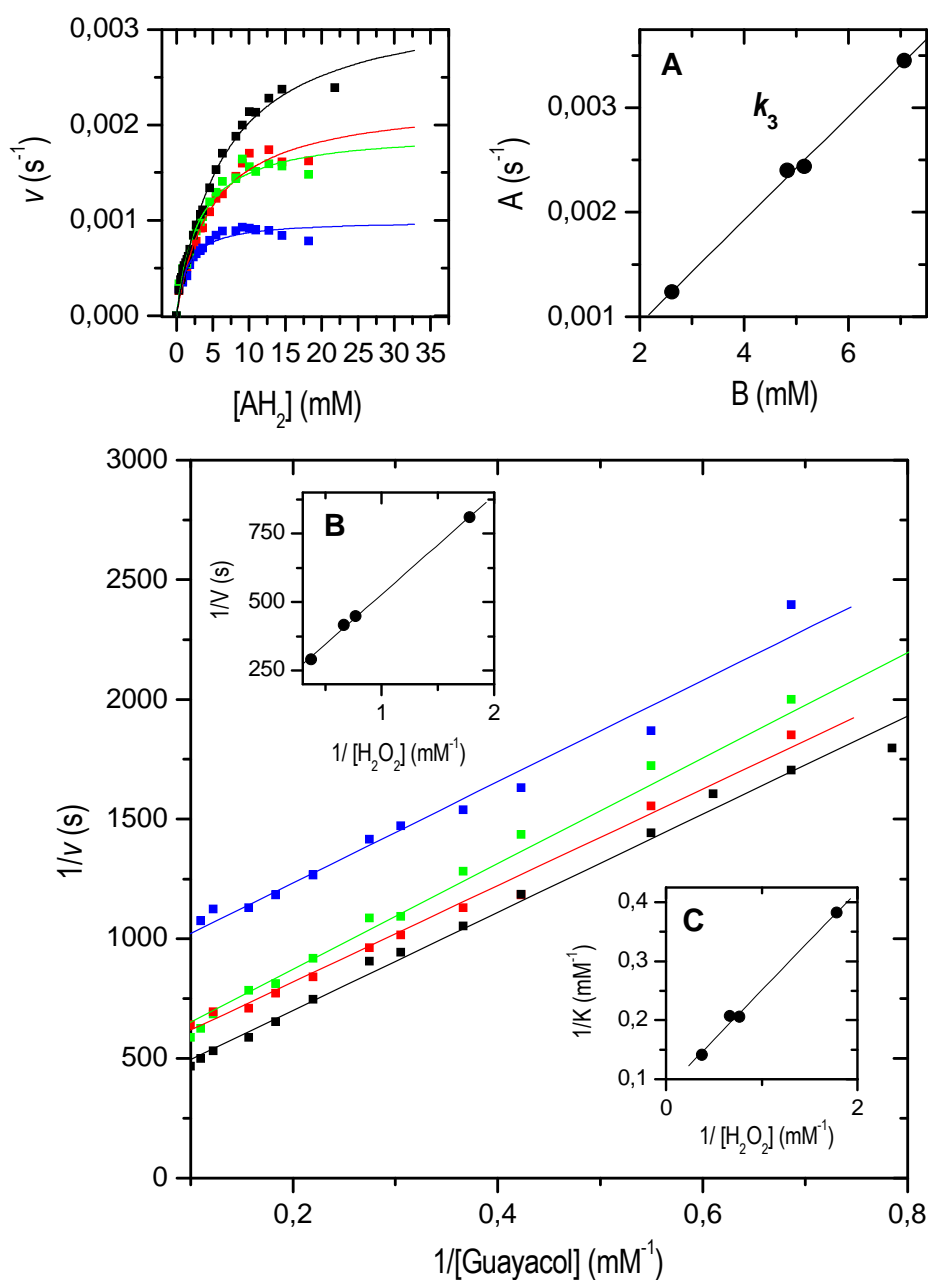


Figura 46. Parámetros cinéticos usando guayacol como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de H_2O_2 : 0,56, 1,30, 1,50, y 2,70 mM, en tampón fosfato 10,0 mM, pH 6,9 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $5,61 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.
 (A) $y = -5,23\text{E-}5 \pm 9,73\text{E-}5 + (4,945\text{E-}4 \pm 1,883\text{E-}5) x$ ($R = 0,99855$)
 (B) $y = 164,77645 \pm 11,22443 + (362,80069 \pm 10,74333) x$ ($R = 0,99912$)
 (C) $y = 0,08309 \pm 0,00998 + (0,16784 \pm 0,00955) x$ ($R = 0,99678$)

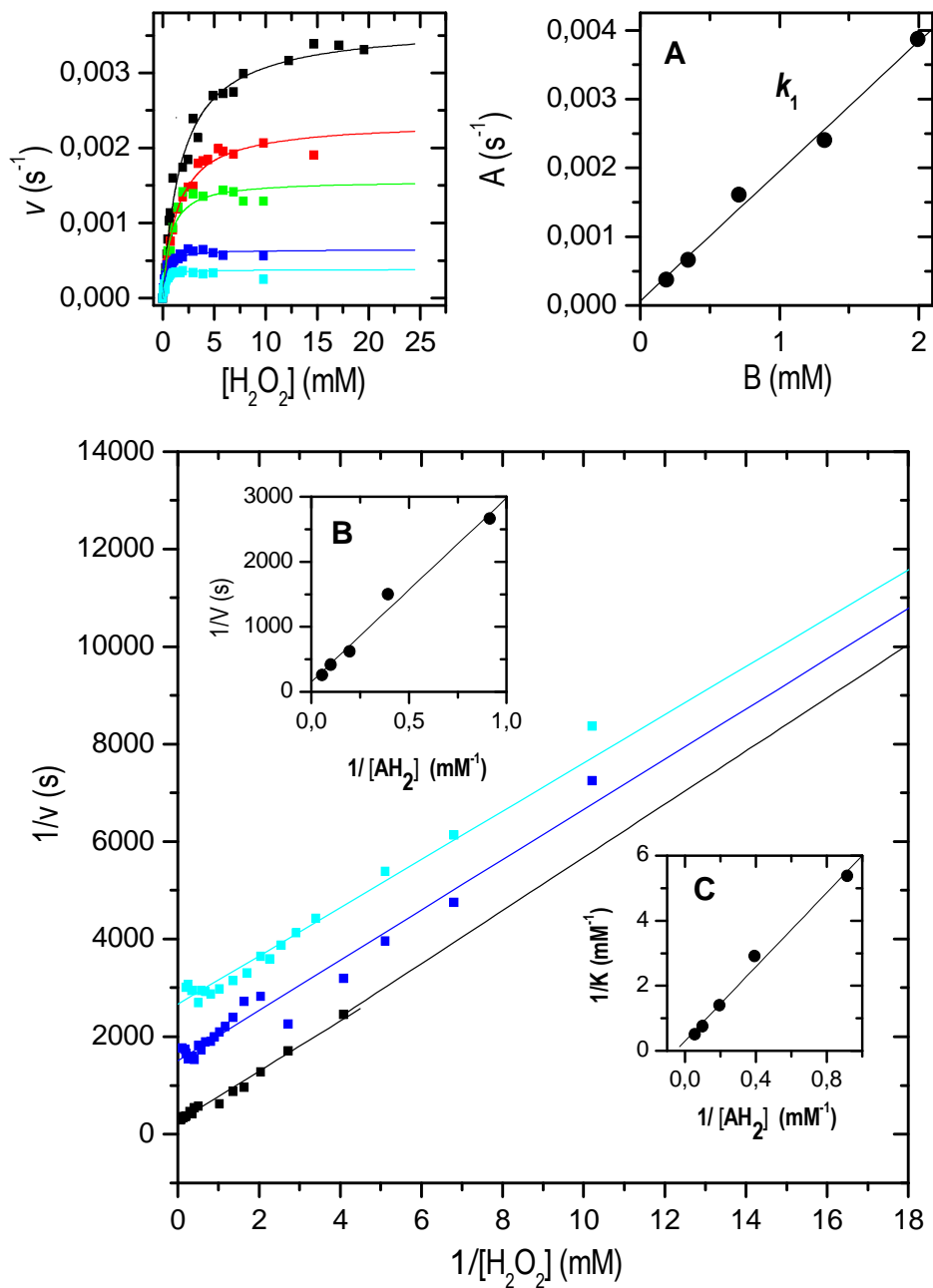


Figura 47. Parámetros cinéticos usando guayacol como sustrato constante. Se ha trabajado a cinco concentraciones de sustrato reductor: 18,2, 10,0, 5,0, 2,5 y 1,0 mM, en tampón fosfato 10,0 mM, pH 6,9 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RTPP de $5,61 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 6,910E-5 \pm 1,18E-4 + (0,00188 \pm 1,05E-4) x$ ($R = 0,99540$)

(B) $y = 154,64168 \pm 102,41757 + (2824,507 \pm 223,96233) x$ ($R = 0,99070$)

(C) $y = 0,30113 \pm 0,16301 + (5,70022 \pm 0,35647) x$ ($R = 0,99419$)

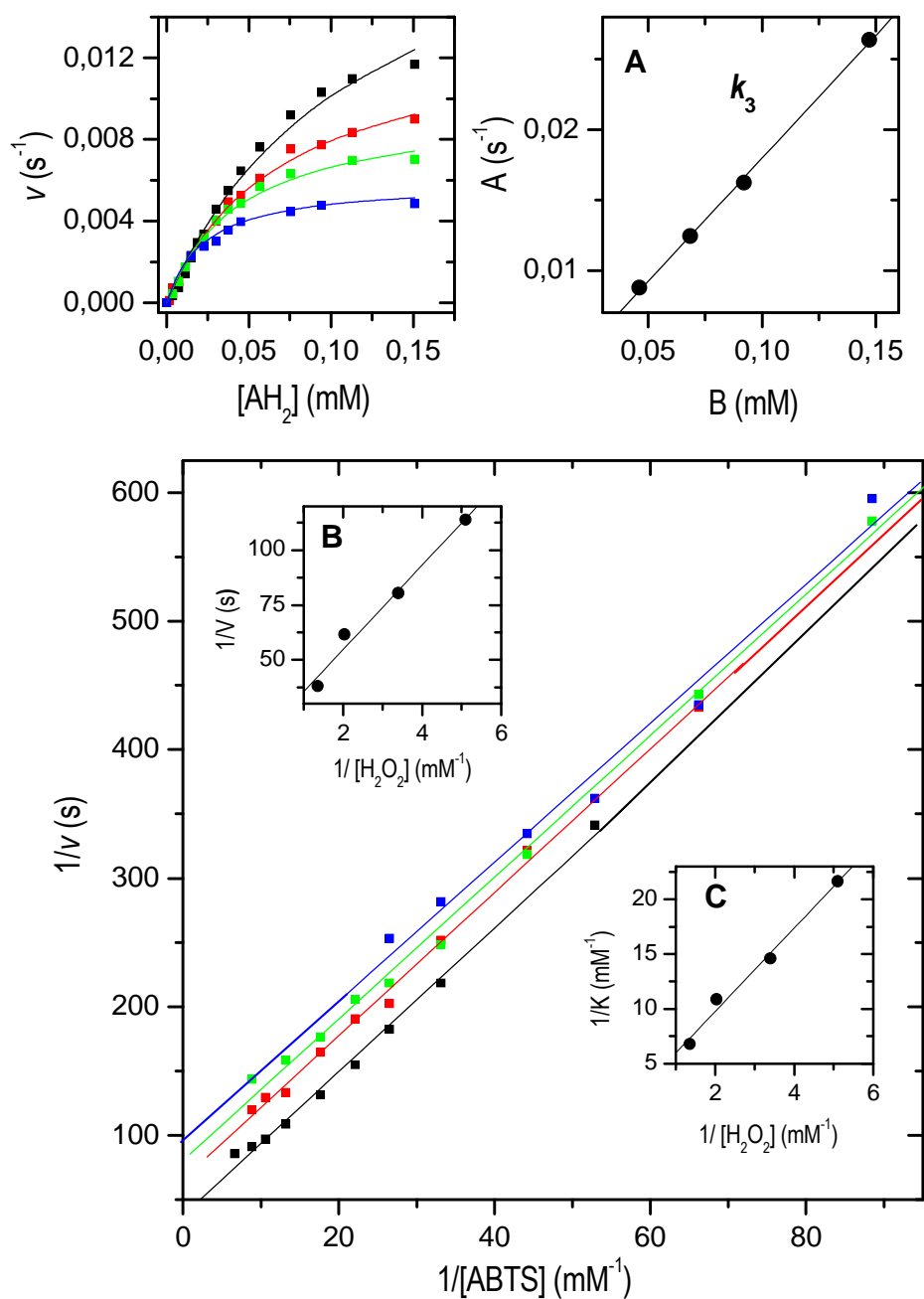


Figura 48. Parámetros cinéticos usando ABTS como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de H_2O_2 : 0,20, 0,29, 0,49, y 0,73 mM, en tampón citrato 10,0 mM, pH 3,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $6,05 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 4,97E-4 \pm 3,97E-4 + (0,17472 \pm 0,00413) x$ ($R = 0,99944$)

(B) $y = 16,13726 \pm 6,25956 + (19,24568 \pm 1,89551) x$ ($R = 0,99044$)

(C) $y = 2,15621 \pm 0,97401 + (3,80118 \pm 0,29495) x$ ($R = 0,99403$)

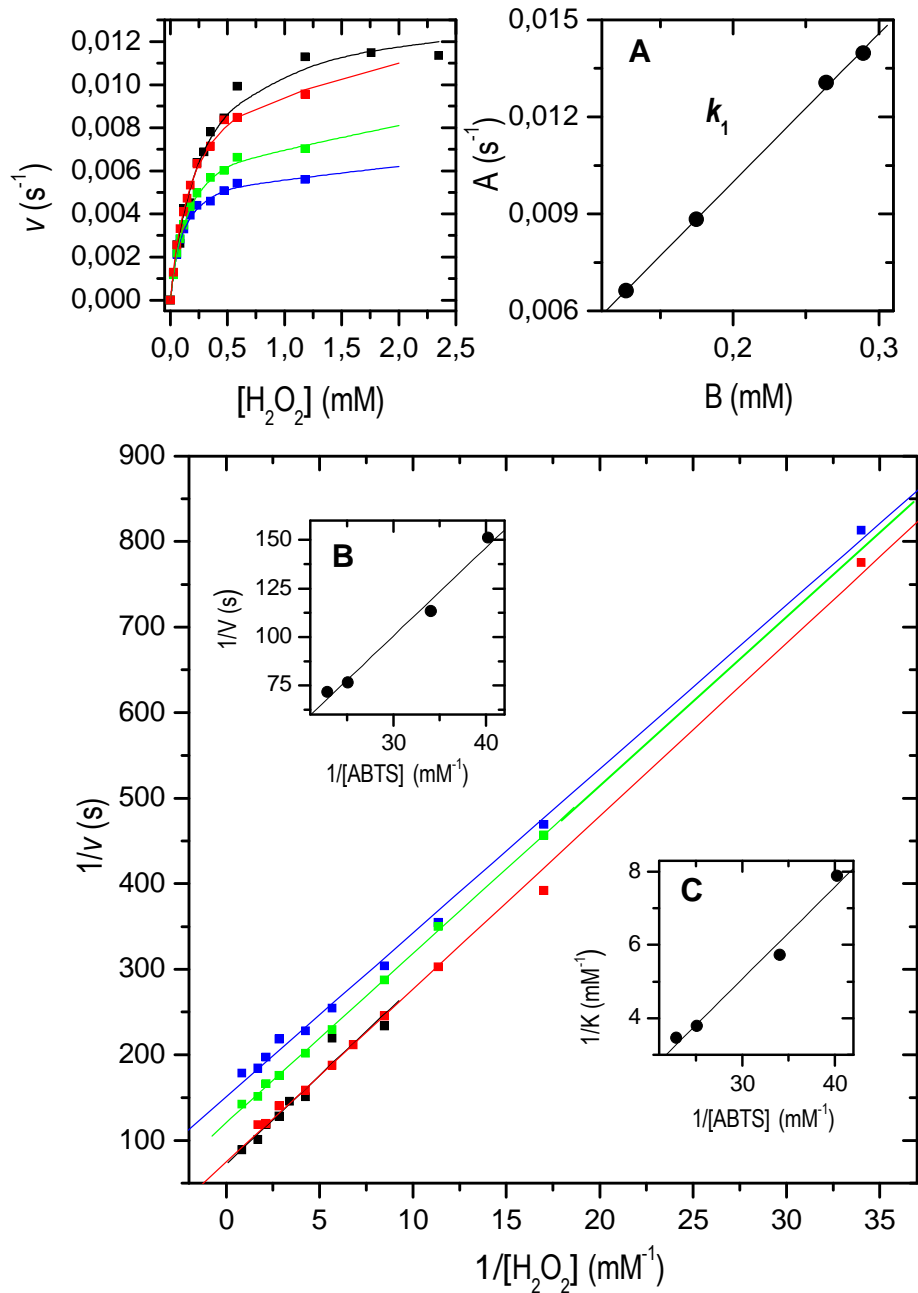


Figura 49. Parámetros cinéticos usando ABTS como sustrato constante. Se ha trabajado a cuatro concentraciones de sustrato reductor: 0,025, 0,029, 0,040 y 0,044 mM, en tampón citrato 10,0 mM, pH 3,0 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $6,05 \cdot 10^{-10}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 8,33E-4 \pm 2,20E-4 + (0,04579 \pm 9,84E-4) x$ ($R = 0,99954$)

(B) $y = -35,91902 \pm 12,66340 + (4,55068 \pm 0,40407) x$ ($R = 0,99221$)

(C) $y = -2,46203 \pm 0,76045 + (0,25120 \pm 0,02426) x$ ($R = 0,99080$)

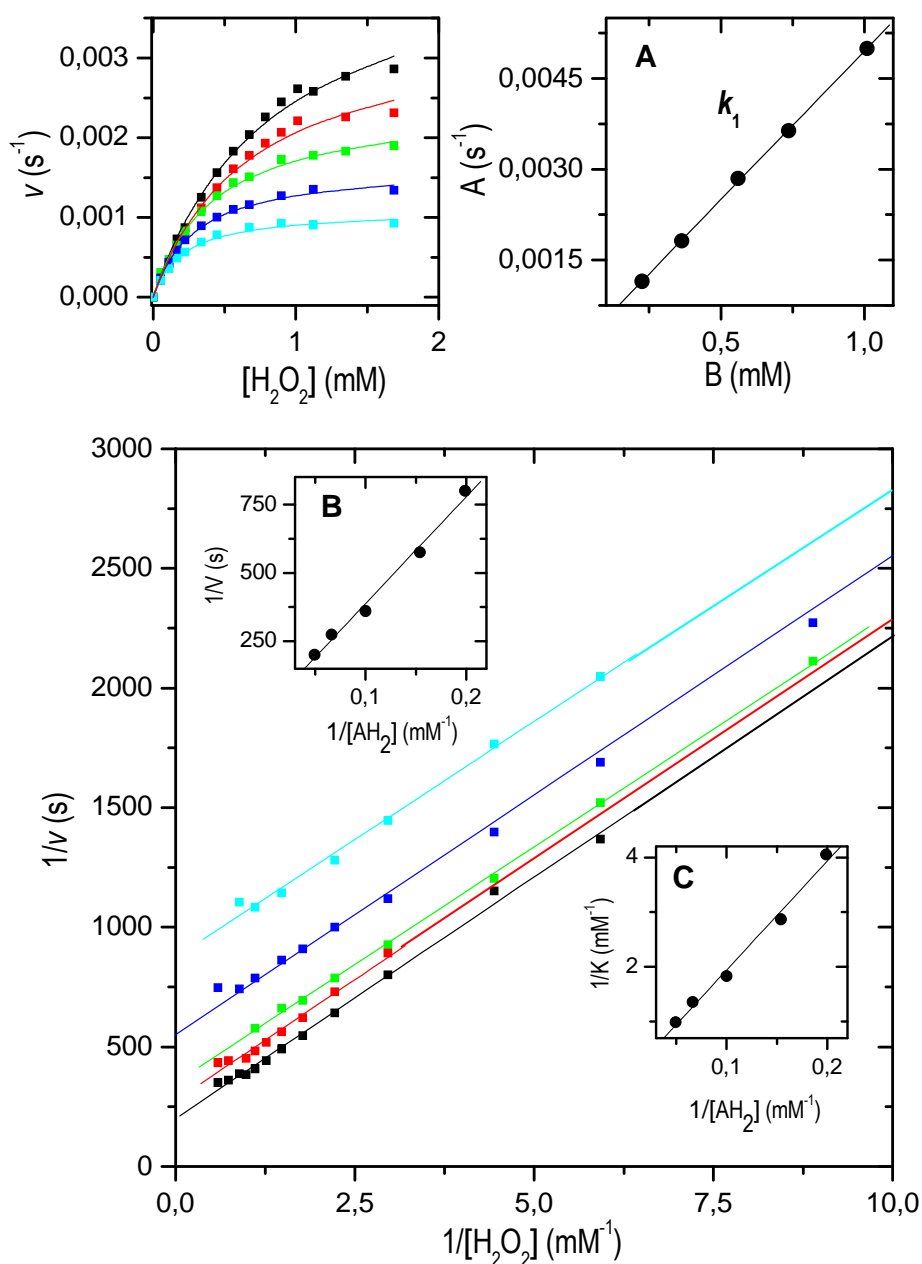


Figura 50. Parámetros cinéticos usando catecol como sustrato constante. Se ha trabajado a cinco concentraciones de sustrato reductor: 20,0, 15,0, 10,0, 6,5 y 5,0 mM, en tampón citrato 30,0 mM, pH 3,5 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RTPP de $3,5 \cdot 10^{-9}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = 4,34E-5 \pm 3,46E-5 + (0,00491 \pm 5,40E-5) x$ ($R = 0,99982$)

(B) $y = -4,59473 \pm 28,7376 + (3915,61925 \pm 226,52023) x$ ($R = 0,99502$)

(C) $y = -0,05296 \pm 0,14874 + (19,93558 \pm 1,17239) x$ ($R = 0,99485$)

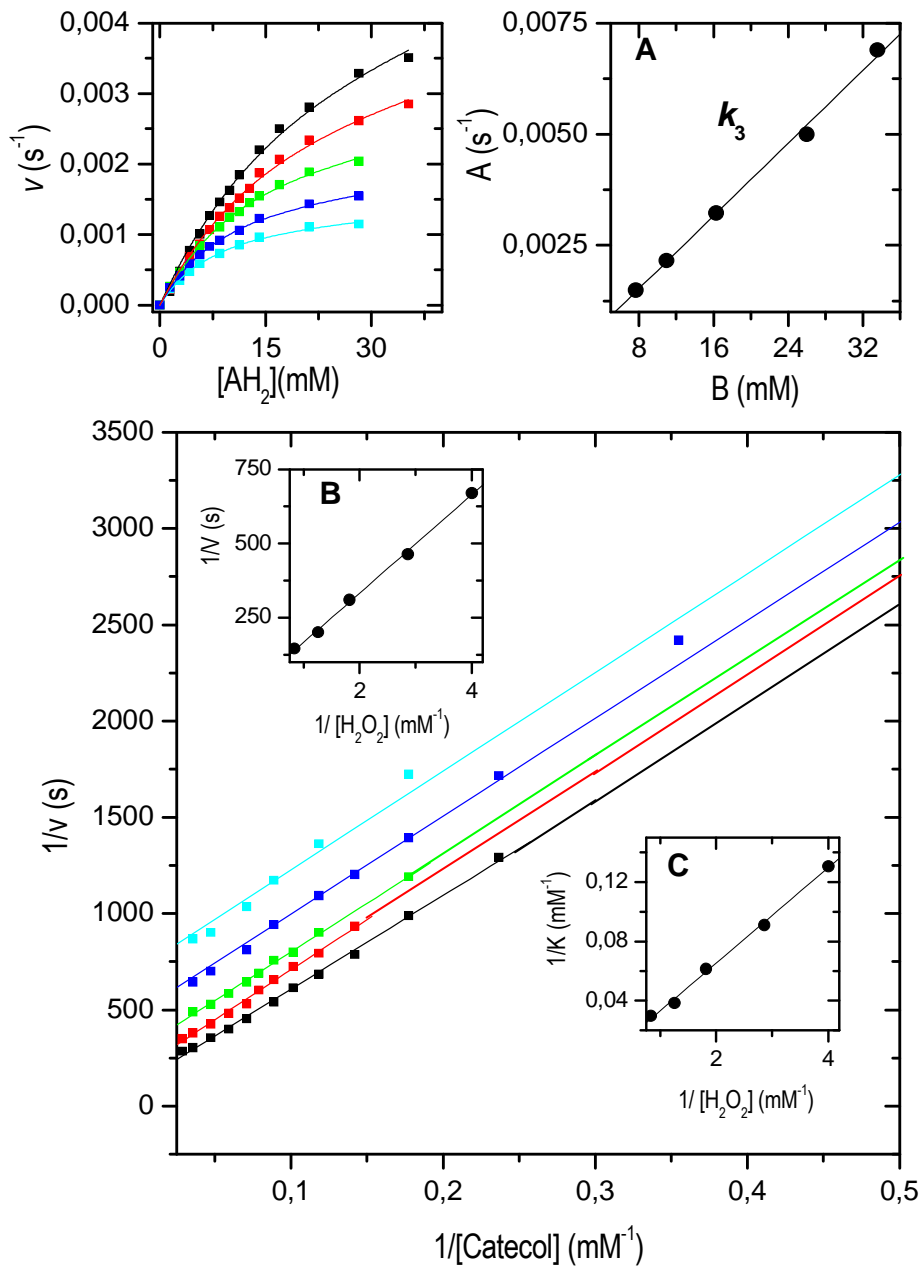


Figura 51. Parámetros cinéticos usando catecol como sustrato, manteniendo constante la concentración de peróxido de hidrógeno. Se ha trabajado a cinco concentraciones de H_2O_2 : 1,00, 0,75, 0,50, 0,34 y 0,25 mM, en tampón citrato 30,0 mM, pH 3,5 y 25 °C. Se ha utilizado una concentración de RPTP de $3,5 \cdot 10^{-9}$ M. Todas las rectas de regresión que se muestran presentan coeficientes de correlación $R > 0,99$.

(A) $y = -1,10E-4 \pm 1,44E-4 + (2,045E-4 \pm 6,784E-6) x$ ($R = 0,99835$)

(B) $y = 0,91404 \pm 9,62509 + (165,85989 \pm 3,94749) x$ ($R = 0,99915$)

(C) $y = 0,016 \pm 0,00239 + (0,03214 \pm 9,80E-4) x$ ($R = 0,99861$)