



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Modulación del potencial redox de complejos teóricos de cobre, mímicos del sitio activo de lacasas**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Hugo Vázquez Lima



TUTOR: Patricia Guadarrama Acosta    AÑO: 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *Agradecimientos*

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Patricia Guadarrama

Beca de CONACYT número 163599  
Beca para finalizar estudios de Doctorado del IIM

Dirección General de Servicios de Cómputo Académico de la UNAM  
por el tiempo de cómputo de la supercomputadora KanBalam

los Doctores Norah Barba, Alberto Vela y Sergei Fomine

Este trabajo se realizó en el departamento de Polímeros del Instituto de Investigación en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Este trabajo de investigación ha sido presentado en:**

Presentación Oral

8<sup>ava</sup> Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica                      Noviembre 2009

*“Modulación de la afinidad electrónica del cobre T1 como sitio activo de lacasas, mediante modificaciones sistemáticas”.*

Presentación de Poster

Metals in Biology Gordon Research Conference                      Enero 2010

*“Modeling the impact on the redox potential of hydrogen bonding to sulphur cystein atom in T1 Cu site”*

Presentación Oral corta

Bioinorganic Chemistry Gordon Research Seminar                      Febrero 2010

*“Modulation of the electron affinity of type 1 copper through systematic modifications”*

Presentación Oral

QuimiUNAM 2010    Noviembre 2010

*“Redox potential modulation of theoretical copper complexes, mimics of Laccase active site”*

Presentación de Poster

Metals in Biology Gordon Research Conference                      Enero 2011

*“Coordination isomers in copper complexes determined by DFT calculations: Implications on EPR, UV-vis and CV experiment interpretations”*

Presentación de Poster

Bioinorganic Chemistry Gordon Research Seminar                      Febrero 2011

*“Protein-forced hydrogen bonds in the second sphere of T1 Cu sites of multicopper oxidases”*

**Artículos derivados de este trabajo de investigación:**

Journal of Molecular Modeling

Aceptado

Enero 2011

H. Vázquez-Lima, P. Guadarrama, Claudia Martínez-Anaya “*Geometric distortions on a three-coordinated Tl Cu site model as potential strategy to modulate the redox potential. A theoretical study*” J. Mol. Mod. In press. doi: 10.1007/s00894-011-1063-y

International Journal of Quantum Chemistry

Aceptado

Enero 2011

H. Vázquez-Lima, P. Guadarrama “*Analysis of structural factors related to spectroscopic data and redox potentials of CuTl models through DFT tools*” Int. J. Quant. Chem. In press. doi: 10.1002/qua.23130

# Índice

1. Resumen	5
<i>a. Español</i>	5
<i>b. English</i>	6
2. Antecedentes	7
<i>a. Generales</i>	7
<i>b. Distorsiones geométricas</i>	9
<i>c. Puentes de hidrógeno en la primera esfera de coordinación</i>	12
<i>d. Efectos electrostáticos</i>	14
<i>e. Modelos sintéticos</i>	15
<i>f. Cálculos teóricos</i>	16
3. Objetivo	18
<i>a. General</i>	18
<i>b. Particulares</i>	18
4. Metodología	19
<i>a. Validación</i>	19
i. Geométrica	19
ii. Redox	20
<i>b. Consideraciones para el estudio de distorsiones geométricas</i>	21
i. Aproximaciones para distorsiones geométricas	21
ii. Modificaciones sistemáticas	22
<i>c. Modelos QM/QM de multicobre oxidasas</i>	23
i. Aproximaciones para modelos QM/QM	23
ii. Modelos QM/QM	24
5. Resultados	27
<i>a. Resultados de validación</i>	27
i. Geométrica	27
ii. Redox	28
<i>b. Distorsiones geométricas</i>	34
<i>c. Puentes de hidrógeno y efectos electrostáticos</i>	43
<i>d. Modelos finales</i>	57
6. Conclusiones	59
7. Bibliografía	61
8. Anexo cálculos de NBO	67

# 1. Resumen

## *a. Español*

Uno de los sitios activos más estudiados por la química bioinorgánica es el cobre Tipo 1 (Cu T1) de las multicobre oxidasas (ceruloplasmina, lacasa, ascorbato oxidasa). Dentro de éstas, las lacasas han cobrado gran importancia biotecnológica en los últimos años debido a su capacidad para oxidar un gran número de compuestos tóxicos. Una característica que determina la efectividad de las enzimas para degradar contaminantes es el potencial redox, siendo más eficientes aquellas enzimas con potenciales más altos. Dichos potenciales están determinados por los sitios de Cu T1. Estos sitios presentan propiedades espectroscópicas muy parecidas en las diferentes proteínas pero potenciales redox en un amplio rango. En la literatura se han descrito 5 factores que modifican el potencial en las proteínas: hidrofobicidad, número de coordinación, tensiones geométricas en la primera esfera de coordinación, puentes de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación y efectos electrostáticos alrededor del sitio. El objetivo de este trabajo fue determinar una metodología teórica para el estudio de los cinco factores que controlan el potencial redox del sitio Cu T1. Una vez establecida la metodología, se realizaron modificaciones sistemáticas a estos factores para encontrar características que incrementen el potencial redox. Todas estas características fueron incluidas en un modelo sintético mímico del Cu T1.

Se utilizó la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) para el estudio de modelos. Se realizaron validaciones geométricas y de potenciales redox con modelos conocidos a fin de encontrar el funcional y base adecuados para el estudio. Para determinar cuáles tensiones geométricas aumentan el potencial redox se empleó un modelo pequeño de 30 átomos donde se modificaron sistemáticamente distancias, ángulos y ángulos diedros. Para el estudio de puentes de hidrógeno y efectos electrostáticos se utilizó un modelo de la proteína Fet3 de 700 átomos tratado con la metodología QM/QM de ONIOM.

Las principales conclusiones del trabajo fueron: la transferencia de carga por parte del tiolato hacia el catión de cobre tiene una alta sensibilidad a la modificación de ángulos diedros e incide de manera importante en la modulación del potencial redox. Los puentes de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación no son favorables en modelos pequeños, son forzados por redes de puentes de hidrógeno en la proteínas y modulan sensiblemente el potencial redox. La carga del cumulo T2-T3, que se encuentra a una distancia de 13 Å del sitio de Cu T1 modula el potencial redox significativamente. Los compuestos propuestos para su posterior síntesis incorporan las características identificadas para el aumento de potencial redox superan los potenciales de compuestos similares reportados en la literatura.



## *b. English*

One of the active sites most studied by the bioinorganic chemistry is the Type 1 copper (T1 Cu) from the multicopper oxidases (ceruloplasmine, laccase, ascorbate oxidase). Among them, the laccases have gained enormous biotechnological relevance in the last years due to their capability to oxidize a great variety of toxic compounds. The redox potential is the feature that measures the effectiveness of these enzymes in pollutants degradation, being more effective those with higher redox potentials. The redox potential in these enzymes is determined by the T1 Cu sites, which exhibit similar spectroscopic properties in most of the enzymes but a broad range of redox potentials. There are 5 determinants described in the literature that modulate the redox potential in the proteins: hydrophobicity, coordination number, geometric distortions on the first coordination sphere, hydrogen bonds in the second coordination sphere and electrostatic effects around the active site. The goal of this work was to establish a theoretical methodology to study the five aspects that modulate the redox potential of T1 Cu sites. Once this methodology was established, systematic modifications to these determinants were carried out to identify specific characteristics that increases the redox potential. All these characteristics were included in a synthetic model mimic of T1 Cu site.

The density functional theory (DFT) was used to study these models. Both geometric and redox potential validations were carried out making use of known models to find the right functional and basis set for this study. To identify which geometric tensions enhance the redox potential, a 30 atoms model was employed and systematic modifications were carried out in distances, angles and dihedral angles. In the hydrogen bonds and electrostatic effects studies, a 700 atoms model of the protein Fet3 was optimized with a QM/QM methodology using ONIOM.

The principal conclusions from this work were: there is a high sensibility in the thiolate to copper cation charge transfer process to the modification of diehedral angles and this process has a deep impact on the redox potential modulation; the hydrogen bonds in the second sphere are not favorable in small models, they depend on the hydrogen bond network of the protein to be enforced and modulate the redox potential; the T2-T3 cluster charge at 13 distance from T1 Cu site modulates the redox potential. The proposed compounds for further synthesis incorporate these features and rise the redox potential higher than the ones reported for similar experimental compounds in the literature.

## 2. Antecedentes

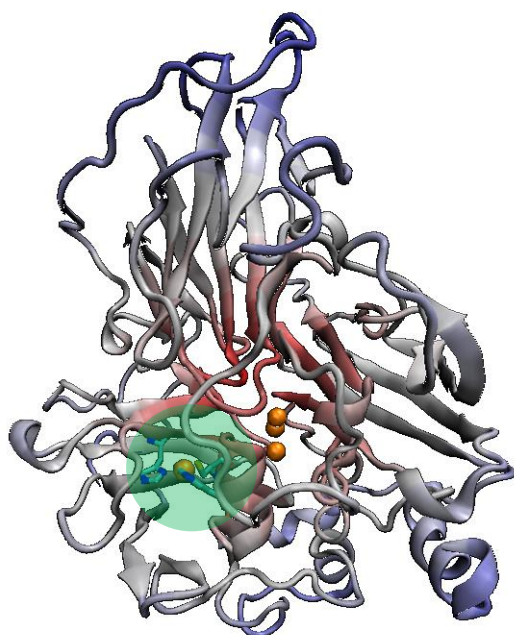
### *a. Generales*

La química bioinorgánica ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a los avances en las técnicas espectroscópicas para el estudio de metales embebidos en proteínas (resonancia magnética de espín (EPR), dicroísmo circular magnético (MCD), absorción en UV-visible y absorción de rayos X (XAS), entre otras) [1]. Además, el mejoramiento en la resolución de estructuras cristalográficas de metaloproteínas es un excelente complemento al cúmulo de datos espectroscópicos. Toda esta información permite elucidar el papel que tienen los compuestos de coordinación en los procesos biológicos. De particular interés son los metales de transición en el contexto de las proteínas. Éstos intervienen en cinco funciones principales: estructurales, almacenamiento, catálisis, transporte de oxígeno y reacciones redox, siendo esta última una de las más importantes [2]. Dos de los metales de transición se destacan por su amplia distribución en las metaloproteínas que llevan a cabo procesos redox: hierro y cobre [3].

Enfocándonos en el cobre, sus complejos bioinorgánicos se han clasificado como Cu T1, Cu T2 y Cu T3, de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas en el estado completamente oxidado (Cu II). El Cu T1 se caracteriza por tener un acoplamiento hiperfino paralelo pequeño de  $\sim 1 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$  en el EPR y una banda de absorción característica de 600 nm en el UV-visible. El Cu T2 tiene un acoplamiento hiperfino de  $1.6 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$  en el EPR pero carece de absorción significativa en el UV-visible y el Cu T3, asociado a dos átomos de cobre acoplados antiferromagnéticamente, no presenta señal en el EPR pero sí una banda de absorción característica en el UV-visible alrededor de 330 nm [4]. Además existen otros tres casos particulares de reciente descubrimiento: Cu A, que consta de dos átomos de cobre acoplados antiferromagnéticamente y una banda de absorción en el UV-visible a 830 nm [5]; Cu B, acoplado antiferromagnéticamente con un complejo de hierro y una banda débil de absorción en 655 nm [6]; Cu Z, que se caracteriza por una señal en el EPR de valencia mezclada correspondiente a un electrón desapareado deslocalizado entre los 4 átomos de Cu que integran este sitio [7, 8, 9].

El caso que estudiamos en este trabajo corresponde a complejos tricoordinados de cobre involucrados en procesos de alto potencial redox ( $\sim 800 \text{ mV}$  vs NHE) [10]. Estos complejos son un caso particular de Cu T1 que suelen contar con cuatro ligantes, pero que en las proteínas de alto potencial redox el ion de cobre sólo se encuentra coordinado a dos residuos de histidina (imidazoles) y uno de cisteína (tiolato). Uno de los sistemas más ampliamente estudiados que contiene este sitio especial de Cu T1 son las enzimas lacasas de origen fúngico.

Las lacasas son enzimas que pertenecen a la familia de multicobre-oxidasas y contienen 4 átomos de cobre divididos en: un Cu T1 encargado de la primera abstracción electrónica del sustrato a ser oxidado y un cúmulo de 3 cobres, Cu T2 y Cu T3, encargados de la reducción de oxígeno a agua valiéndose de los electrones del sitio Cu T1 y protones del medio (ver figura 1). Estas enzimas tienen un sitio activo inespecífico, capaz de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos, lo que les confiere un enorme potencial biotecnológico. Es por esta razón que nuevas enzimas son buscadas privilegiando aquellas que tengan mayor estabilidad y mayor potencial redox [11].



**Figura 1** Estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB 1GYC). En naranja se observan los 4 átomos de cobre y en el círculo verde el sitio de Cu T1.

Una de las características más interesantes de este grupo de enzimas es el amplio rango de potenciales redox que presentan, de 430 a 790 mV. Se ha establecido que el potencial está determinado por el sitio de Cu T1 y que son pocas las diferencias geométricas o espectroscópicas entre las diferentes proteínas [11,12]. Uno de los estudios teóricos recientes hace un resumen de los cinco factores que pueden modificar el potencial redox de sitios Cu T1 [13]:

1. Los efectos hidrofóbicos. Un aumento en la hidrofobicidad alrededor del sitio aumenta el potencial redox. Una característica conservada en las proteínas que contienen Cu T1 es un sitio hidrofóbico a su alrededor.
2. El número de coordinación. Los sitios de Cu T1 pueden tener 3, 4 o 5 residuos coordinados al catión de cobre. Los estudios sobre mutaciones donde sólo se elimina uno de los residuos coordinados, establecen que un menor número de residuos aumenta el potencial redox cuando todas las demás características permanecen constantes.
3. Los puentes de hidrógeno hacia átomos de azufre coordinados al metal, que generalmente son puentes de hidrógeno débiles entre amidas de la cadena principal proteica y el azufre del residuo de cisteína coordinado al cobre.
4. Las restricciones proteicas, que se traducen en distorsiones geométricas de la primera esfera de coordinación del cobre.
5. Las interacciones electrostáticas intraproteína, que ocurren debido a la desestabilización del estado oxidado de Cu T1 mediante residuos cargados positivamente en la vecindad del mismo. También puede existir el efecto contrario: estabilización debido a residuos cargados negativamente.

Los dos primeros efectos representan el nivel máximo de incremento de potencial redox reportado, al referirse al sitio de Cu T1 de lacasa de alto potencial redox. En las lacasas, el sitio de Cu T1 está rodeado por aminoácidos hidrofóbicos para evitar el contacto con el disolvente. El menor número de coordinación reportado en proteínas, que da lugar al potencial redox más alto, es de 3. Esta es otra característica inherente de las lacasas de alto potencial redox.

Los tres puntos restantes se desarrollarán por separado en los siguientes subtemas.

### *b. Distorsiones geométricas*

Las primeras aproximaciones para describir las distorsiones geométricas del sitio activo de metaloproteínas ocurren durante los años 60, cuando los autores Malström [14] y Williams [15] desarrollan independientemente sus propias teorías. Éstas son revisadas nuevamente a mediados de los años 90 cuando el cúmulo de estructuras cristalográficas de metaloproteínas con sitios de Cu T1 permite una discusión más profunda [16, 17]. Para poder explicar cómo el entorno proteico de las metaloproteínas de cobre puede forzar geometrías de coordinación, Williams utiliza un modelo pequeño del sitio de Cu T1 que incluye sólo la primera esfera de coordinación. En este modelo la geometría es dictada por la orientación que el catión de cobre impone a los ligantes. Si este modelo ficticio retiene la disposición geométrica de los ligantes obtenida de la proteína, sin la necesidad de la misma, se puede hablar de un sitio no restringido. Si por el contrario, el sitio tiene una disposición geométrica en la proteína y otra en el modelo pequeño, se habla entonces de la existencia de entasis (Williams [16]) o un estado “rack” (Malström [17]), dependiendo de la teoría utilizada. Más allá de la terminología, los autores coinciden en que estos estados distorsionados pueden conferir a los complejos de cobre propiedades especiales: absorciones intensas en el UV-visible, acoplamientos hiperfinos estrechos en el EPR o altos potenciales redox.

Esta discusión sobre entasis se llevó a cabo considerando proteínas con sitios de Cu T1 tetracoordinados, con dos ligantes imidazol (residuos de histidinas), un ligante tiolato (residuo de cisteína) y como cuarto ligante un tioéter o una amida (residuos de metionina o glutamina respectivamente) [18]. Debido a que la mayoría de las proteínas con sitios Cu T1 aisladas y estudiadas caen dentro del grupo de tetracoordinadas, existe una gran cantidad de evidencia espectroscópica de ellas [18], lo cual ha permitido hacer una distinción entre dos tipos diferentes de interacción cobre-azufre:  $\pi$  o pseudo- $\sigma$ , de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. La interacción predominantemente  $\pi$  se caracteriza por tener una mayor frecuencia en la espectroscopia Raman ( $403\text{ cm}^{-1}$ ) y una banda de absorción en el UV-visible alrededor de 600 nm correspondiente a una transferencia de carga del ligante al metal (LMCT). Para el caso de la interacción predominantemente pseudo- $\sigma$  se observa una banda a menor frecuencia en espectroscopia Raman, alrededor de  $383\text{ cm}^{-1}$ , indicativo de un enlace más débil [18]. La banda de absorción en el UV-visible para esta transferencia de carga se ubica alrededor de 450 nm. Estas dos diferentes formas de transferencia de carga se explican mediante la participación de diferentes orbitales  $p$  del azufre. La etiqueta “pseudo” en la

interacción pseudo- $\sigma$  se asigna cuando el ángulo C-S-Cu es mayor a  $90^\circ$ , debido a que la densidad del orbital  $p$  del azufre en esta interacción no está completamente orientada sobre el eje S - Cu [19]. En la mayoría de las proteínas se observa la presencia de ambas interacciones, siendo aquella que domina la que otorga la coloración a la proteína, azul para la interacción  $\pi$  y verde para la interacción pseudo- $\sigma$  (ver figura 2) [20].

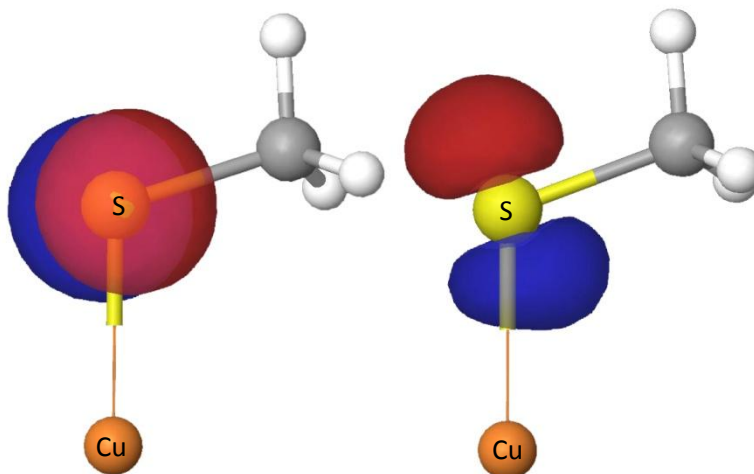


Figura 2. Interacción Cu-S. Izquierda, interacción  $\pi$ ; derecha interacción pseudo- $\sigma$ .

El predominio de la interacción  $\pi$  o pseudo- $\sigma$  depende de la disposición de los residuos en cada proteína. Esta disposición es generada por la estructura secundaria y terciaria de cada proteína confiriéndole rigidez a la primera esfera de coordinación del Cu T1.

La prueba experimental de esta aseveración se encuentra en el trabajo realizado por Comba [21, 22]. Una mutante de la proteína amicianina (que contiene un Cu T1 tetracoordinado) presenta un cambio en la absorción UV-visible dependiendo de la temperatura. A temperatura ambiente presenta una coloración azul y se torna verde con el descenso de temperatura. La proteína nativa es de coloración azul en el rango de temperatura estudiado. La mutación de la proteína reduce las restricciones geométricas sobre el Cu T1, originando el cambio de coloración. La explicación dada para este tipo de comportamiento es la existencia de dos conformaciones de la primera esfera de coordinación para los sitios tetracoordinados [22]. Cálculos realizados para un modelo de Cu T1 tetracoordinado  $[\text{Cu}(\text{imidazol})_2(\text{SCH}_3)(\text{S}(\text{CH}_3)_2)]^+$  a nivel de teoría de funcionales de la densidad (DFT), con el funcional B3LYP, identifican dos mínimos con energías similares (diferencia de 1.2 kJ/mol). El primer mínimo caracterizado se asocia con la transferencia de carga tipo  $\pi$ , mientras que el segundo es asociado con las dos transiciones  $\pi$  y pseudo- $\sigma$ . De esta manera, para que la transferencia de carga a 450 nm ocurra, y por tanto la coloración verde de la proteína aparezca, el segundo mínimo debe estar más poblado; cosa que sucede en el caso particular de esta mutante de amicianina con el descenso de temperatura.

Otra aproximación para el estudio de las interacciones  $\pi$  y pseudo- $\sigma$  implica la mutación del sitio de Cu T1 tricoordinado de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*. Esta lacasa es azul en estado nativo y verde en la mutante. El sitio Cu T1 de la mutante es tetracoordinado y está integrado por tres residuos de histidina y uno de cisteína (tres imidazoles y un tiolato) [20]. El análisis detallado de las espectroscopias EPR, MCD y UV-visible, acompañado de cálculos en un sólo punto a nivel DFT con el funcional BP86, permitió a los autores concluir que el sitio Cu T1 adquiere la coloración verde porque la coordinación extra de una histidina en posición axial provoca la rotación del orbital  $dx^2-y^2$  del cobre. Esto favorece la interacción pseudo- $\sigma$  y reduce la interacción  $\pi$ .

Retomando los sitios de Cu T1 tricoordinados, sólo se han reportado proteínas con interacción predominantemente  $\pi$ , por lo que algunos autores asocian el comportamiento pseudo- $\sigma$  y la existencia de entasis al cuarto ligante [18, 20]. En este sentido es necesario abordar la evidencia experimental de entasis en sitios tricoordinados.

El primer trabajo que propone entasis en los sitios de Cu T1 tricoordinados es el realizado por Piontek [23], quien aisló la primera estructura cristalográfica de lacasa fúngica activa (de *Trametes versicolor* (Protein Data Bank (PDB): 1GYC)) con todos los átomos de cobre presentes. En ese trabajo se propone un mecanismo para explicar el alto potencial redox de la enzima. Uno de los residuos de histidina coordinado al Cu T1 está conectado mediante la cadena principal de la proteína a un residuo de ácido glutámico (carboxilato). Este residuo a su vez genera un puente de hidrógeno con otro residuo de serina (alcohol). El mecanismo supone que la formación del puente de hidrógeno glutámico-serina genera una distorsión en el sitio Cu T1 (ver figura 3). El efecto total es el alargamiento de la distancia Cu-N del sitio, sugiriendo una distorsión geométrica entática.

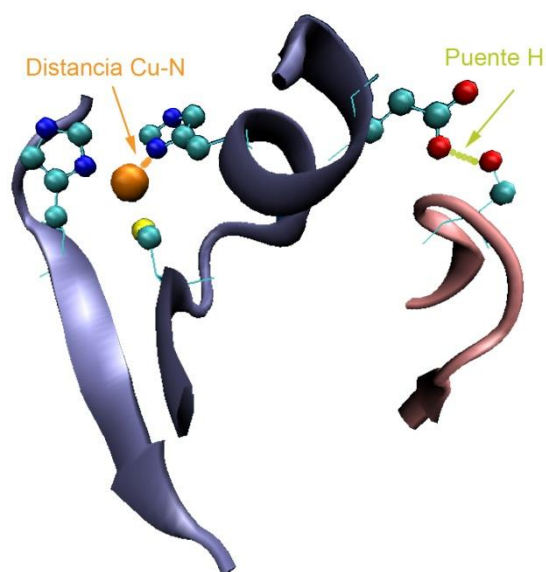


Figura 3. Sitio Cu T1 de lacasa de *T. versicolor* en donde se muestra la posible tensión en la distancia Cu-N. Hidrógenos no incluidos.

La distancia Cu-N comparada en ese estudio corresponde a una diferencia de 0.17 Å entre la estructura de *T. versicolor* (distancia Cu-N = 2.04 Å, resolución 1.9 Å, PDB 1GYC) y la estructura cristalizada de la lacasa de *Coprinus cinereus* que se conocía entonces (distancia Cu-N = 1.87 Å, resolución 2.23 Å, PDB 1A65). Una estructura cristalográfica de la lacasa de *C. cinereus* determinada con mejor resolución (resolución 1.65 Å, PDB 1HFU) presenta una distancia Cu-N de 2.03 Å, lo que implica una diferencia de tan sólo 0.01 Å. Este dato pone en duda la teoría de regulación por puente de hidrógeno; sin embargo, estudios posteriores de alineación de secuencias entre diferentes lacasas plantean una correlación entre la existencia del puente de hidrógeno y el aumento del potencial redox [11]. Debido a que las estructuras cristalográficas sólo muestran una geometría fija en el contexto de un cristal y no el conjunto de conformaciones que adopta la proteína en solución, no podemos darle toda la confianza a las distancias cristalográficas y dejaremos al mecanismo de puente de hidrógeno distante como una posibilidad.

Un punto a resaltar de las restricciones proteicas es la poca reorganización de los sitios de Cu T1 después de la reducción. En un estudio donde la lacasa cristalizada de *Melanocarpus albomyces* es expuesta a radiación para inducir la reducción de la enzima se observa virtualmente el mismo sitio de coordinación para Cu T1 tanto en el estado oxidado como en el reducido [24]. Esta poca reorganización es inferida en otras proteínas con sitios de Cu T1 al relacionar una baja energía de reorganización con altas velocidades de transferencia electrónica [25].

### *c. Puentes de hidrógeno en la primera esfera de coordinación*

Otro factor identificado como regulador del potencial redox es la presencia de puentes de hidrógeno hacia átomos de azufre coordinados a metales. Estos puentes han sido ampliamente estudiados en proteínas de hierro–azufre [26, 27] y en modelos sintéticos de las mismas [28, 29, 30], observando siempre una correlación entre su presencia y el aumento del potencial redox. Incluso modelos sintéticos que contienen enlaces platino–azufre pueden presentar aumento del potencial redox con la presencia de estos puentes de hidrógeno [31].

Un estudio detallado de la repercusión de puentes de hidrógeno en la interacción tiolato–hierro de modelos sintéticos establece que la contribución de puentes de hidrógeno es debida a dos factores: interacciones electrostáticas (dipolos) o interacciones covalentes (población del orbital de antienlace X-H, donde X es un átomo electronegativo) [32]. Mediante estudios espectroscópicos y modelado molecular se estableció que la presencia de puentes de hidrógeno amida–tiolato reduce la covalencia del enlace hierro–azufre y que la naturaleza de la interacción amida–tiolato en estos sistemas es principalmente dipolar, aunque existe un cierto porcentaje de covalencia (8%) determinado mediante un análisis de poblaciones de Mulliken. Este estudio hace un símil con los puentes de hidrógeno en sitios de Cu T1, por lo que podemos esperar que la covalencia del enlace cobre–azufre disminuya en la presencia de amidas cercanas

al átomo de azufre, quedando por determinar las contribuciones covalentes y electrostáticas de la interacción.

Una herramienta útil para la cuantificación de la covalencia en puentes de hidrógeno es el análisis de orbitales naturales de enlace (Natural Bond Orbital, NBO 5.0) [33]. Este método ha sido utilizado antes para establecer la covalencia en otros sistemas en donde están involucrados puentes de hidrógeno [34]. Debido a que la metodología de NBO permite cuantificar la interacción de pares libres con orbitales de antienlace, en las interacciones de puente de hidrógeno será utilizada para análisis de los mismos en este trabajo.

En lo que respecta a puentes de hidrógeno en interacciones cobre–azufre, el estudio más reciente de su impacto fue llevado a cabo por Lu et al. [35]. En él se realizaron mutaciones de la proteína azurina, que contiene un sitio Cu T1 tetracoordinado con dos puentes de hidrógeno amida–tiolato. La intención fue modificar la segunda esfera de coordinación del cobre en cuanto a hidrofobicidad y puentes de hidrógeno para observar su impacto en los potenciales redox. La mutante F114P\* elimina uno de los puentes de hidrógeno amida–tiolato disminuyendo el potencial  $\sim 90$  mV y probando el papel de estos puentes en la regulación redox de sitios Cu T1. Por otro lado, la doble mutación N47S M121L perturba la red de puentes de hidrógeno vecina a las amidas de la interacción amida–tiolato. Esto genera un aumento en la distancia  $N_{\text{amida}} - S_{\text{tiolato}}$  de 0.18 Å y un aumento en el potencial de 230 mV. Este resultado sugiere que la red de puentes de hidrógeno vecina al sitio Cu T1 impone ciertas restricciones a la distancia  $N_{\text{amida}} - S_{\text{tiolato}}$ , puesto que al perturbar esta red la distancia se modifica.

Otro estudio donde realizaron perturbaciones de puentes de hidrógeno alrededor del sitio Cu T1 [36, 37] demuestra que la mutación P80I en pseudoazurina reduce la distancia  $N_{\text{amida}} - S_{\text{tiolato}}$  de 4.05 Å en la nativa a 3.64 Å en la mutante. Esto indica que las perturbaciones alrededor del sitio Cu T1 no siguen una tendencia clara y que cada perturbación debe ser estudiada para determinar un aumento o disminución de la distancia  $N_{\text{amida}} - S_{\text{tiolato}}$ .

Para hacer un análisis de la perturbación de puentes de hidrógeno en el sitio de Cu T1 de lacasas se recurrió a la proteína Fet3 (PDB 1ZPU) y su mutante H483Q [38]. La proteína Fet3 tiene una gran homología con lacasas fúngicas, por lo que es posible extrapolar los resultados. La mutante H483Q de Fet3 elimina un puente de hidrógeno estructural entre el sitio de Cu T1 y el cúmulo T2-T3 como se muestra en la figura 4. Además se cuenta con información de los átomos de cobre en la mutante con respecto al número de coordinación y su estado de oxidación, determinados por espectroscopia de absorción de rayos X en K-edge. Los potenciales redox de la proteína mutante y la

\*Representa la notación utilizada para describir las mutaciones puntuales de una proteína. Se coloca inicialmente el residuo nativo de la proteína utilizando el código de una sola letra para aminoácidos, seguido de la posición que ocupa el residuo en la estructura primaria de la proteína para finalizar con el residuo que es sustituido en la mutante.



nativa también fueron determinados. Con estos elementos es posible estudiar cómo las perturbaciones en los puentes de hidrógeno afectan el potencial redox del sitio Cu T1, valiéndose de datos experimentales.

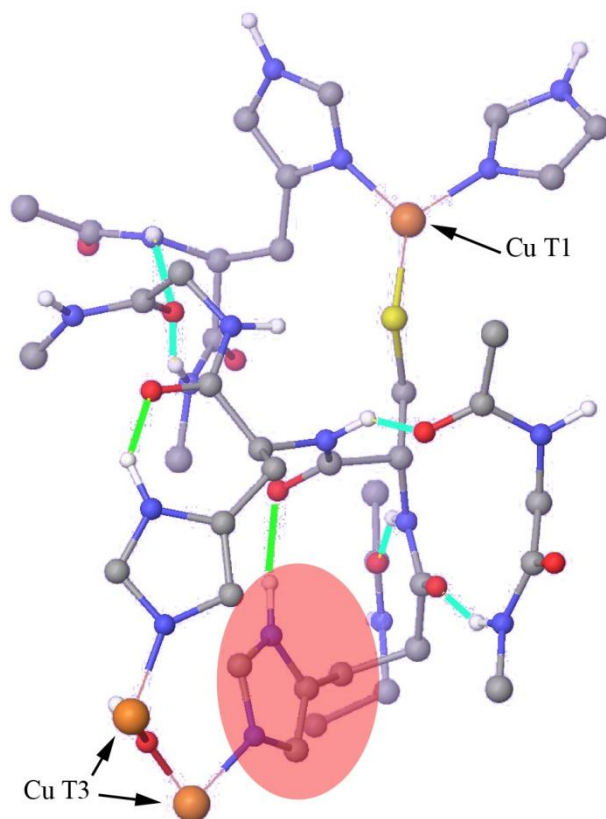


Figura 4. Red de puentes de hidrógeno en la proteína de Fet3. En azul se muestran los 5 puentes de hidrógeno de la cadena principal alrededor de la cisteína del sitio Cu T1. En verde se muestran dos puentes de hidrógeno que conectan el cúmulo T2-T3 con el sitio Cu T1. El círculo rojo indica el sitio de la mutación H483Q que elimina 1 puente de hidrógeno.

#### *d. Efectos electrostáticos*

Existen dos efectos electrostáticos relevantes mediante los cuales una proteína puede modificar el potencial redox de su sitio activo: interacciones carga-carga o interacciones carga-dipolo [13]. Aunque el término “interacción” es comúnmente utilizado en bioinorgánica para referirse a los efectos electrostáticos entre dos zonas de una misma proteína, vale la pena aclarar que no implica ningún momento que dos partes de una sola proteína se comporten como entidades diferentes. En este sentido, el término “interacción carga-carga intraproteica” se refiere a la posición relativa de residuos cargados o iones dentro de la proteína y la “interacción carga-dipolo intraproteica” se refiere a la polarización originada por residuos cargados o iones que se genera en los grupos vecinos a estos.

En lo que respecta a las interacciones carga-carga existe evidencia de modificación de potencial redox en sitios Cu T1 cuando se introduce una carga extra. Esto sucede en la

mutante M44K de la proteína azurina, cuando aumenta su potencial redox en ~50 mV con respecto a la nativa debido a la incorporación de una carga positiva extra en la vecindad del sitio Cu T1 [39]. Este efecto también ha sido observado en otras proteínas con sitios de Cu T1 [13] y en modelos experimentales [40].

Las interacciones dipolo-carga son identificadas como el factor electrostático más importante que aporta la proteína a sitios redox [41, 42]. Esto es debido a que dentro de las proteínas existe una gran cantidad de dipolos preorganizados que suman sus interacciones y afectan la estabilización del sitio activo. Para hacer cuenta de este efecto es necesario considerar todos los dipolos de la proteína, sin embargo en algunas ocasiones es posible lograrlo con modelos que incluyan algunos aminoácidos de la segunda esfera de coordinación [42].

### *e. Modelos sintéticos*

Dentro de los modelos sintéticos del Cu T1, tres sobresalen debido a sus cualidades geométricas o propiedades espectroscópicas. El complejo sintetizado por Kitajama [43] representa el primer modelo sintético capaz de reproducir las propiedades espectroscópicas del Cu T1 y une al cobre mediante tres ligantes pirazolil y un tiolato, simulando un sitio Cu T1 tetracoordinado. A continuación se encuentra el modelo presentado por Tolman, que es el primer complejo tricoordinado de Cu II con geometría trigonal plana [44]. Este complejo utiliza un ligante voluminoso que contiene dos nitrógenos  $sp^2$  coordinando al cobre al que se une un ligante tiolato. El tercer modelo, sintetizado por Cao y Huang [45], representa un mímico geométrico del Cu T1 donde se utilizó un calixareno como soporte para colocar dos grupos tioéter y dos N-metilimidazoles. De esta manera el ligante genera una tricoordinación con dos imidazoles y un tioéter; sin embargo, el estado de oxidación del cobre en este complejo es 1 y no 2 como ocurre en los sitios de Cu T1. Los modelos se encuentran descritos en la figura 5 de la sección 4.a.

En la presente tesis se hizo una validación geométrica en la que se utilizó el modelo de Cao y Huang junto con otros dos modelos más pequeños que contienen características relevantes de los sitios Cu T1. Uno de ellos presenta una tetracoordinación con un nitrógeno aromático, una amina terciaria y dos tioéteres. Además, cuenta con estructuras cristalográficas en los estados de oxidación Cu I y Cu II [46]. El otro contiene un ligante tiolato unido a Cu II en un modelo pequeño que permite la evaluación de la reproducción de la distancia Cu-S por los diferentes funcionales dentro de la teoría de DFT [47].

Después de la síntesis del complejo tricoordinado de cobre, Tolman prosiguió con la exploración de complejos tricoordinados de cobre utilizando el mismo ligante con dos nitrógenos  $sp^2$  e intercambiando el tiolato por piridina, fenolatos y tiolatos modificados. De esta manera se produjo una serie de complejos con potenciales redox determinados en THF [48, 49, 50], misma que fue utilizada para la validación de la reproducción de potenciales redox en este trabajo.

### *f. Cálculos teóricos*

Con respecto a los estudios teóricos realizados sobre el sitio Cu T1, los principales problemas a abordar han sido tres: reproducción de propiedades espectroscópicas [18], reproducción de potencial redox [13] y evaluación de tensiones geométricas (entasis) en sitios de Cu T1 [51, 52].

Con respecto a la reproducción de propiedades espectroscópicas, Solomon et al. subrayan la relevancia de evaluar resultados de DFT con datos experimentales para obtener una buena descripción de la covalencia metal–ligante [18]. En este sentido, realizaron una modificación del funcional BP86 [53, 54, 55, 56] para reproducir datos espectroscópicos de EPR del complejo  $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ , en particular la densidad de espín del Cu [57]. Incorporaron 38% de intercambio Hartree-Fock (HF) al intercambio total del funcional para obtener el funcional híbrido B(38)P86 que reproducía la densidad atómica de espín experimentalmente observada sobre el cobre (62%), mediante un análisis de poblaciones de Mulliken. Este funcional ha sido utilizado para la evaluación de diferentes sitios de Cu T1, sin embargo también se indica que funcionales como B3LYP, BHandHLYP y BP86 dan resultados similares [18, 19].

Como se ha mencionado anteriormente, los factores que modulan el potencial redox en proteínas son diversos. De igual manera, la reproducción de potenciales redox de proteínas con sitios Cu T1 mediante aproximaciones teóricas ha sido variada y controversial. Uno de los primeros trabajos que intenta recoger la mayor cantidad de factores es el realizado por Datta et al. [58], donde se utiliza un modelo de ONIOM de dos capas B3LYP/Amber para calcular la energía del sitio Cu T1 de plastocianina. La interacción de cargas y la energía de solvatación se calcularon mediante el campo de fuerza Amber y las aproximaciones de Born y Onsager respectivamente. En ese trabajo se consideran explícitamente las cargas de la proteína con la aproximación de una constante dieléctrica baja determinada por dinámica molecular. Esta aproximación dio buenos resultados en el caso estudiado, pero la simplificación de los efectos electrostáticos mediante cargas solvatadas en un dieléctrico continuo ha sido ampliamente criticada [41, 42]. Además el tamaño del modelo de ONIOM fue modesto, con 12 aminoácidos y 6 moléculas de disolvente en total.

Otra aproximación comúnmente utilizada es realizar cálculos de modelos pequeños de proteínas y referenciar los valores con respecto a una de ellas. Esta estrategia fue seguida por Jensen et al. [13] para establecer un modelo que recogiera todos los factores que modulan el potencial redox de seis sitios Cu T1 diferentes. Su estudio considera que sólo la primera esfera de coordinación y algunos aminoácidos alrededor del sitio Cu T1 (~100 átomos en total) determinan el potencial redox de las proteínas. Realizaron los cálculos a tres niveles de teoría: HF, DFT y Møller-Plesset (MP2); determinando que los valores de HF en fase gas eran los mejores debido a las limitaciones de MP2 en cuanto a costo computacional y el hecho que HF presentaba un correcto ordenamiento de los valores con respecto a los experimentales. Más que una buena metodología para el cálculo de potenciales redox en proteínas, el estudio parece encontrar una serie de

afortunadas coincidencias que permiten despreciar las interacciones electrostáticas que aporta la proteína al sitio Cu T1.

El tercer tipo de trabajo teórico compara las distancias cristalográficas de sitios de Cu T1 con las optimizaciones libres de modelos pequeños para establecer si existen tensiones en los residuos que coordinan al cobre y comprobar o descartar entasis. Ryde et al. realizaron un estudio con modelos pequeños de Cu T1 y concluyeron que no existe tensión en los tres residuos conservados del sitio Cu T1 (dos histidinas y una cisteína), y que de existir tensiones se presentan en el cuarto residuo (generalmente ocupado por metionina). La regulación ejercida por el cuarto ligante sólo puede llegar hasta un máximo de  $\sim 100$  mV [51, 52]. Además es importante mencionar que en ese estudio hicieron una comparación de DFT con MP2 encontrando que el nivel de teoría B3LYP/DZpdf/6-31g\* es suficiente, tanto para la descripción geométrica como para la energética en los sitios Cu T1.

Una vez establecidos los antecedentes de este trabajo de investigación se procede a detallar los objetivos general y particulares .

### 3. Objetivo

#### *a. Objetivo general*

Construir y evaluar aquel complejo mímico del sitio activo de lacasas que proporcione un potencial redox teórico superior al potencial experimental de las lacasas reportadas hasta el momento.

#### *b. Objetivos particulares*

1. Establecer y validar una metodología computacional para la reproducción de parámetros geométricos y potenciales redox de complejos de cobre con bajos números de coordinación.
2. Estudiar y modificar sistemáticamente los factores que modulan el potencial redox en las proteínas multicobre oxidasas para identificar características que eleven el potencial redox en complejos de cobre.
3. Diseñar un complejo teórico simplificado, mímico del cobre T1 (unidad de catálisis), buscando un potencial redox teórico superior a 790 mV vs NHE (potencial de la lacasa de *T. versicolor*), empleando DFT como herramienta de cálculo.

## 4. Metodología

### a. Validación

#### i. Geométrica

Se seleccionaron tres modelos pequeños de complejos de cobre que presentan características similares al sitio Cu T1. Estos modelos se presentan en la figura 5.

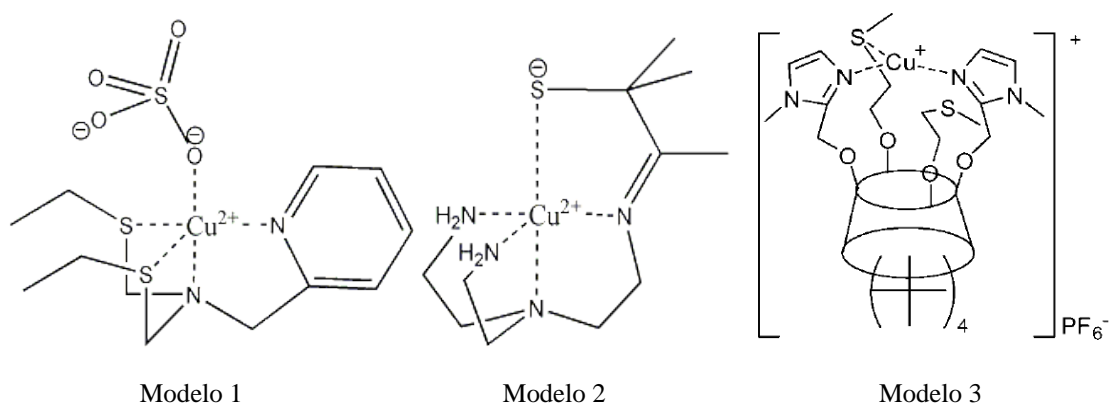


Figura 5. Modelos 1, 2 y 3 utilizados para la validación geométrica de funcionales.

La estructura cristalográfica del modelo 1 ha sido determinada por rayos X en diferentes estados de oxidación del cobre:  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  [46]; este modelo tiene un nitrógeno aromático coordinado al átomo de cobre. El segundo modelo tiene una interacción poco común de  $\text{Cu}^{2+}$  con un tiolato y una interacción con nitrógeno  $\text{sp}^2$  no aromático [47]. El tercer modelo es el más parecido a un Cu T1 tricoordinado, donde el catión  $\text{Cu}^+$  es coordinado por dos anillos de imidazol N-metilados y un tioéter [45]. Los tres modelos permiten la evaluación de dos moléculas con  $\text{Cu}^{2+}$  y dos moléculas con  $\text{Cu}^+$  para una correcta descripción de los estados oxidado y reducido del cobre.

Cada modelo fue optimizado con el nivel DFT utilizando los funcionales BP86 [53, 54, 55, 56], B3LYP [58, 59, 60, 61], PBE0 [62,63,64] y M05 [65, 66] con la base LACVP\* [67] en el programa Jaguar 7.0 [68]. Puesto que en una parte del trabajo se utilizó un método híbrido de Mecánica Cuántica/Mecánica Cuántica (QM/QM) del programa Gaussian 09 [69], también se realizaron optimizaciones de los tres modelos con los funcionales BP86, B3LYP, PBE1PBE (etiqueta para el funcional PBE0 en Gaussian 09) y M05, y la base LACVP\* definidos en este programa.

Adicionalmente se realizaron optimizaciones de los modelos 1 y 2 con el funcional M05, utilizando las bases LACV3P\* y Lanl2dz.

El análisis de resultados (sección 5.a) permitió establecer que la mejor reproducción de parámetros geométricos se obtiene con PBE0/LACVP\*. Este funcional fue utilizado para los cálculos de validación redox que se detallan a continuación.

## ii. Redox

El nivel de teoría DFT ha sido ampliamente utilizado para el cálculo de potenciales redox, mostrando una precisión adecuada para describir diversos sistemas orgánicos e inorgánicos [70]. Es de gran importancia tener una buena metodología para la reproducción de potenciales redox puesto que el objetivo principal de este trabajo es su evaluación. Así, para la validación redox se seleccionó una serie de compuestos relacionados con el mimico estructural del Cu T1 tricoordinado, reportados por Tolman [44, 48, 49, 50] (ver figura 6).

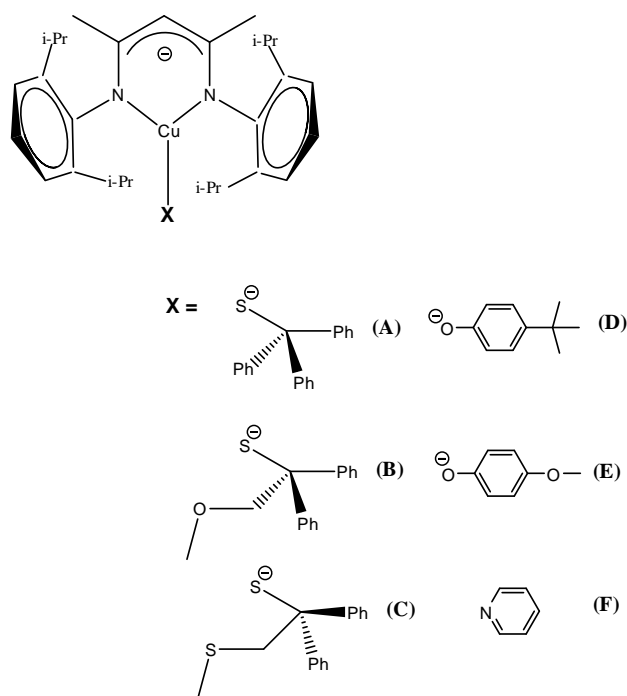
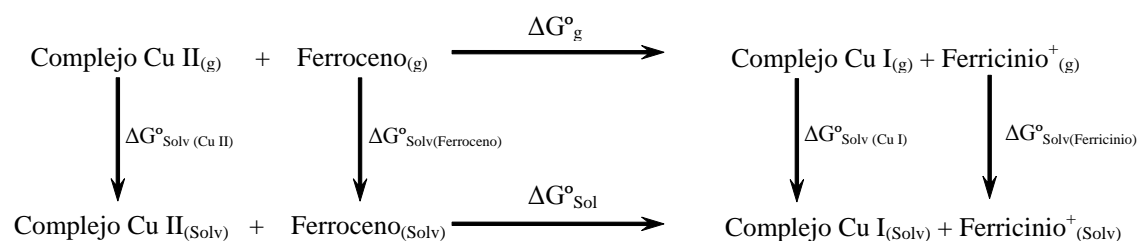


Figura 6. Modelos (A) – (F) para la evaluación de potencial redox. El ligante 2,4-bis(2,6-di-isopropilfenilimido)pentano y los ligantes (A) – (E) tienen carga negativa.

Todos estos complejos están caracterizados espectroscópicamente; se cuenta con su estructura cristalográfica y su potencial redox determinado en THF. Los potenciales fueron determinados mediante voltametría cíclica y los valores fueron referenciados al par Ferroceno/Ferricinio<sup>+</sup> (Fc/Fc<sup>+</sup>). Mediante el uso de un ciclo termodinámico es posible incluir al par Fc/Fc<sup>+</sup> y de esta manera obtener valores teóricos de potencial redox referenciados [71] (ver esquema 1).



Esquema 1. Ciclo termodinámico para el cálculo de potenciales redox.

Con el ciclo termodinámico del esquema 1 es posible estimar la variación de energía libre en solución ( $\Delta G^{\circ}_{\text{sol}}$ ) mediante la ecuación 1. Si a esta energía se le divide entre la constante de Faraday (F) y el número de electrones intercambiados ( $n$ ) se obtiene el valor del potencial redox ( $E^{\circ}$ ) referenciado al par Fc/Fc<sup>+</sup> (ecuación 2).

$$\Delta G^{\circ}_{\text{Sol}} = \Delta G^{\circ}_{\text{g}} + \Delta G^{\circ}_{\text{Solv (CuI)}} + \Delta G^{\circ}_{\text{Solv (Ferricinio)}} - \Delta G^{\circ}_{\text{Solv (CuII)}} - \Delta G^{\circ}_{\text{Solv (Ferroceno)}} \quad \text{Ec.1}$$

$$E^{\circ} = \Delta G^{\circ}_{\text{sol}}/nF \quad \text{Ec.2}$$

Esta metodología fue utilizada para la estimación de  $E^{\circ}$  de los complejos (A) – (F) y los resultados son discutidos en el sección 5.b.

### *b. Consideraciones para el estudio de distorsiones geométricas*

#### **i. Aproximaciones para distorsiones geométricas**

En esta parte del estudio se realizaron diferentes distorsiones geométricas en un modelo pequeño del sitio Cu T1 (Sección 4.b.ii, Figura 7) para determinar aquellas que pudieran influir en el aumento del potencial redox. Una vez establecidas estas distorsiones, se plantean dos posibles rutas que permitirían incluir estos elementos de diseño en la primera esfera de coordinación del cobre. Se proponen mutaciones puntuales en lacasas para generar estructuras rígidas que permitirían mantener estas distorsiones geométricas dentro de la proteína, así como la incorporación de estas distorsiones geométricas en complejos mímicos de Cu T1. En ambos casos se espera que exista rigidez estructural que impida una libre relajación de los complejos (sitio de Cu T1 en la proteína o complejo mímico de Cu T1).

Como no existirá cambio del número de ligantes ni rearreglos estructurales, es posible considerar que no existirá un cambio significativo de la entropía ante el proceso de reducción y por lo tanto aproximar  $\Delta G^{\circ}_{\text{g}}$  al negativo de la afinidad electrónica (A. E.) del compuesto oxidado (que en nuestro caso fue calculado como  $\Delta E^{\circ}_{\text{g(vertical)}}$ ). La razón de esta aproximación no es que el modelo estudiado presente una baja energía de reorganización sino que, una vez concluido el estudio, los modelos finales tendrán una baja energía de reorganización. Esta aproximación permite eliminar la optimización del complejo en estado reducido y el cálculo de frecuencias tanto del modelo oxidado como del reducido.

La segunda aproximación consiste en eliminar la energía de solvatación del ciclo termodinámico. El modelo estudiado no determina la energía de solvatación de todo el sistema; en el caso de la proteína lo hace la misma proteína y en el caso del mímico, lo hace el complejo completo. Por tal motivo asumimos que la diferencia en la energía de solvatación ( $\Delta \Delta G^{\circ}_{\text{Solv}}$ ) definida como  $\Delta G^{\circ}_{\text{solv(CuII)}} - \Delta G^{\circ}_{\text{solv(CuI)}}$  permanecerá constante, independientemente de las distorsiones del modelo pequeño. Al ser una constante puede ser eliminada del ciclo termodinámico, haciendo énfasis en que las diferencias de



potencial en esta parte del trabajo son relativas y aplican sólo para comparar los potenciales de diferentes distorsiones geométricas.

Sumando estas dos aproximaciones se tiene que  $\Delta G_{\text{Solv}}$  puede ser aproximada a la A.E. y está será la etiqueta utilizada para referirnos a la variación de potencial redox en esta parte del trabajo.

## ii. Modificaciones sistemáticas

Como se mencionó en los antecedentes [11, 23], existe controversia con respecto a la existencia de entasis en sitios de Cu T1 tricoordinados. Independientemente de su existencia, nosotros utilizamos el concepto de entasis y lo exploramos de manera sistemática mediante un modelo del sitio Cu T1 para determinar aquellas distorsiones que aumenten significativamente el potencial redox del sistema, con la menor desestabilización posible del mismo.

Como punto de partida se utilizó el sitio Cu T1 de la lacasa de *Trametes versicolor*. Esta enzima presenta un potencial redox alto (780 mV vs NHE) y un sitio Cu T1 tricoordinado. Utilizando su estructura cristalográfica reportada (PDB 1GYC) generamos un modelo de Cu T1 integrado por el catión de  $\text{Cu}^{2+}$  coordinado por dos metil-imidazoles y un metil-tiolato (ver figura 7).

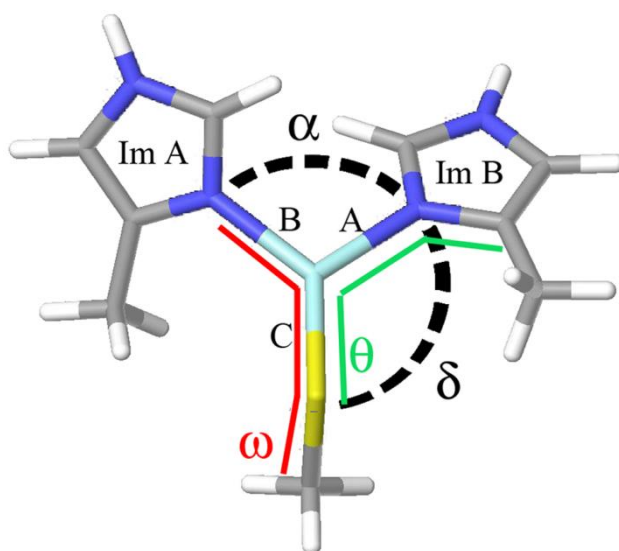


Figura 7. Modelo de Cu T1. Las etiquetas corresponden a las distancias A, B y C; los ángulos  $\alpha$  y  $\delta$ ; y los ángulos diedros  $\omega$  y  $\theta$ . En gris se presentan los átomos de carbono, amarillo para el azufre, azul para nitrógenos, blanco para hidrógenos y azul claro para el cobre.

Este modelo fue optimizado libremente con PBE0/LACVP\*\* y comparado con la estructura cristalográfica de 1GYC. Además se identificaron los parámetros geométricos A, B y C para distancias;  $\alpha$  y  $\delta$  para ángulos de enlace;  $\theta$  y  $\omega$  para ángulos diedros. Cada parámetro fue seleccionado individualmente para realizar modificaciones sistemáticas del mismo, fijándolo en valores específicos y permitiendo la optimización del resto del

modelo la molécula. De esta manera fue posible cuantificar el impacto de la tensión geométrica seleccionada. Las estructuras fueron parcialmente optimizadas en el estado oxidado del cobre (Cu II) y recalculadas para el estado reducido (Cu I) con la estructura del estado oxidado mediante cálculos en un sólo punto.

Con estos dos cálculos fue posible definir dos parámetros: la energía de desestabilización, como la resta de la energía electrónica de la estructura parcialmente optimizada en el estado oxidado menos la energía de la estructura optimizadas sin restricciones en el estado oxidado; y la A. E. relativa, que se define como la resta de la A. E. de la estructura parcialmente optimizada menos la A. E. de la estructura completamente optimizada.

Las distancias A, B y C fueron modificadas con decrementos e incrementos 0.1 Å para obtener un rango de -0.2 Å a +0.4 Å con respecto a la distancia de la estructura optimizada. Para la evaluación de distorsiones geométricas de ángulos se emplearon los ángulos  $\alpha$  ( $N_{ImA}-Cu-N_{ImB}$ ) y  $\delta$  ( $S-Cu-N_{ImB}$ ) que fueron modificados de 10° en 10° desde 90° hasta 180°. Adicionalmente se utilizó el ángulo  $\gamma$  ( $S-Cu-N_{ImA}$ ) que fue modificado en sincronización con los ángulos  $\alpha$  y  $\delta$  desde 120° hasta 90° con decrementos de 5° para evaluar el efecto de la piramidalización de los ligantes.

Por último, los ángulos diedros  $\theta$  ( $S-Cu-N_{ImB}-C_{ImB}$ ) y  $\omega$  ( $C-S-Cu-N_{ImA}$ ) fueron modificados sistemáticamente desde 0° hasta 350° con incrementos de 10°. Adicionalmente se definió el ángulo diedro  $\phi$  ( $S-Cu-N_{ImA}-C_{ImA}$ ) que, junto con el ángulo diedro  $\theta$ , se utilizó para realizar modificaciones sincronizadas de los dos anillos de imidazol alrededor del plano de los ligantes (definido por los átomos  $N_{ImA}$ ,  $N_{ImB}$ , Cu y S).

### *c. Modelos QM/QM de multicobre oxidadas*

#### **i. Aproximaciones para modelos QM/QM**

Para realizar la evaluación de puentes de hidrógeno y efectos electrostáticos intraproteicos se utilizó un modelo híbrido QM/QM con el nombre de ONIOM [72] en Gaussian 09. Se modeló una parte de la proteína Fet3 (~700 átomos) incluyendo al sitio Cu T1 en la capa de teoría de DFT (ver sección 5.c.ii). Los modelos se optimizaron en el estado oxidado y reducido sin realizar cálculos de frecuencias. Aunque en estos modelos se consideraron explícitamente las tensiones que puede ejercer la proteína sobre el sitio de Cu T1, no fue posible realizar cálculos de frecuencias debido al gran tamaño de los modelos. En esta ocasión la aproximación de  $\Delta G_g^\circ$  fue al negativo de la A. E. (calculada como  $\Delta E_{g(adiabático)}^\circ$ ) debido a la consideración de la relajación).

En lo que respecta a la energía de solvatación, el utilizar modelos acotados irremediablemente deja fuera una gran cantidad de residuos cargados de la proteína. Es por esto que el cálculo de la solvatación de tales fragmentos no produciría una descripción adecuada de la solvatación. Aunque el uso de aproximaciones clásicas permite la estimación de la energía de solvatación de proteínas completas [58], éstas

implican la utilización de aproximaciones radicales que difícilmente darán valores correctos de energía de solvatación. El último argumento por el cual se desestimaron las energías de solvatación es que los modelos utilizados provienen de la proteína nativa Fet3 y su mutante H483Q. Estas dos proteínas sólo se diferencian por una mutación puntual al interior de ellas, por lo que es de esperar que ambas tengan una diferencia en la energía de solvatación ( $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$ ) similar. Esto nos permite desestimar  $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$  como una constate.

De esta manera, los potenciales  $E^\circ$  determinados en esta sección serán relativos y sólo útiles para comparación entre ellos mismos. Con estos valores de  $E^\circ$  se puede obtener la diferencia de potencial entre la mutante y la nativa ( $\Delta E^\circ_{\text{teórico}}$ ) que es una cantidad que puede ser comparada con valores experimentales ( $\Delta E^\circ_{\text{experimental}}$ ).

## ii. Modelos QM/QM

Para el estudio de puentes de hidrógeno y efectos electrostáticos sobre el sitio de Cu T1 se recurrió a un modelo de la proteína Fet3. Se consideró originalmente un modelo que incluyera todos los residuos en un radio de 12 Å a partir del átomo de nitrógeno de cadena principal del residuo Ile486 de la estructura cristalográfica 1ZPU del que se eliminaron ciertos residuos como se menciona posteriormente. Este átomo de nitrógeno es parte del puente de hidrógeno amida – tiolato a estudiar.

Posteriormente se seleccionaron secuencias de aminoácidos que incluyeran al sitio de Cu T1 y al cúmulo T2-T3 dentro de este radio de corte, eliminando del modelo aquellos residuos que no participaban directamente en la red de puentes de hidrógeno entre el sitio Cu T1 y el cúmulo T2-T3. De esta manera se generó un modelo que incluye a los residuos His81, His83, las secuencias Trp124-Glu134, Val216-Ser221, Thr412-His418 y Phe481-Leu496; además se incluyeron también los cuatro átomos de cobre en estado Cu II de los sitios T1, T2 y T3 (ve figura 8). Este modelo comprende 42 de los 550 aminoácidos totales de la proteína Fet3.

Para completar el modelo fue necesario incluir las moléculas de agua estructurales cristalizadas en la proteína que están en contacto con el conjunto de aminoácidos seleccionado. Puesto que no se encuentran reportadas estructuras cristalográficas de Fet3 con suficiente resolución para identificar moléculas de agua estructurales, se recurrió a la estructura cristalográfica de la lacasa de *T. versicolor* (1GYC) para extraer la posición de estas moléculas. Esta estructura fue seleccionada debido a que fue utilizada para la generación de la estructura 1ZPU [73] y ambas proteínas tienen una gran homología en sus secuencias (60% de similitud). Por estas razones la posición de los grupos hidroxilos y moléculas de agua estructurales pueden ser extraídas de la estructura de 1GYC y ser utilizadas como punto de partida en las optimizaciones. Se utilizaron las posiciones de los grupos hidroxilo del cúmulo T2-T3 y las moléculas de agua 3390, 4102, 4106, 4107, 4113, 4227, 4229, 4457, 4458, 4459, 4461, 4462, 4463 y 4530.

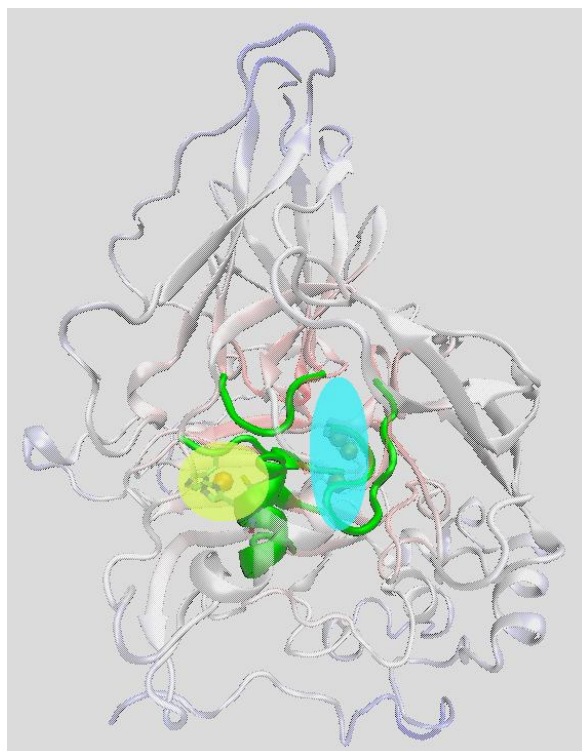


Figura 8. Modelo de 42 aminoácidos de la proteína Fet3. La representación de la proteína Fet3 tiene el siguiente código de colores: en azul se encuentran las regiones más expuestas de la proteína, en rojo las regiones internas y en blanco las regiones intermedias. En verde se encuentra el modelo de 42 aminoácidos, en esferas naranjas, los cuatro átomos de cobre de la proteína. En un círculo amarillo se señala la región del sitio de Cu T1 y en un ovalo azul claro la región del cúmulo T2-T3.

Una vez definido el modelo de la estructura nativa se generó un segundo modelo de la mutante H483Q. Los cambios con respecto a la estructura nativa son los siguientes:

- Sustitución del residuo de histidina 483 por un residuo de glutamina.
- Cambio en el estado de oxidación de los tres átomos de cobre del cúmulo T2-T3 a Cu I, determinado en base a espectroscopia de absorción de rayos X en K-edge de la mutante H483Q [38].
- Eliminación de los grupos hidroxilos coordinados al cúmulo T2-T3. Esto debido a que la estructura con cobres reducidos no presenta hidroxilos coordinados.

Estos dos modelos fueron optimizados mediante la metodología QM/QM ONIOM implementada en Gaussian 09. Los residuos Cis484, His413 y His489; la amida de cadena principal del residuo Ile486 y el catión de cobre del sitio de Cu T1 fueron incluidos en la capa tratada con nivel de teoría alto (PBE1PBE/LACVP\*\*). El resto del modelo fue incluido en la capa con nivel de teoría “bajo” (menos preciso), optimizado con el método semiempírico PM6 [74] (ver figura 9). Las coordenadas de los carbonos  $\alpha$  de los residuos His81, His83, Trp124, Glu134, Val216, Ser221, Thr412, His418, Phe481 y Leu496 fueron congeladas puesto que representan los puntos de unión con el resto de la proteína. De esta manera se hace una aproximación a las restricciones

impuestas por la estructura terciaria de la proteína, permitiendo que los residuos de aminoácidos relevantes se relajen durante la optimización.

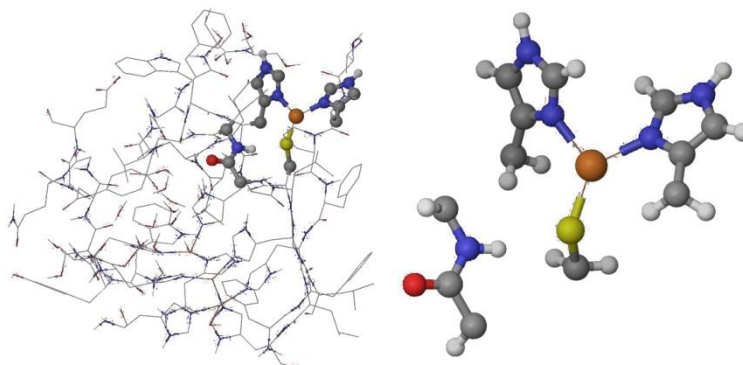


Figura 9. Modelos QM/QM de la proteína nativa Fet3. A la izquierda se presenta el modelo de ~700 átomos, en líneas se representa el nivel bajo de teoría tratado con PM6, en esferas el nivel alto de teoría tratado con PBE1PBE/LACVP\*\*. A la derecha se presenta una expansión de los átomos tratados con nivel alto de teoría. En azul se presenta los átomos de nitrógeno, en gris de carbono, en rojo de oxígeno, en blanco de hidrógeno y en naranja de cobre.

Una vez optimizadas las estructuras en estado oxidado del Cu T1, se procedió a la optimización en estado reducido de los dos modelos. Por último, para la evaluación de los puentes de hidrógeno mediante NBO [33] se utilizaron modelos extraídos de las optimizaciones de ONIOM como el que se presenta en la figura 10.

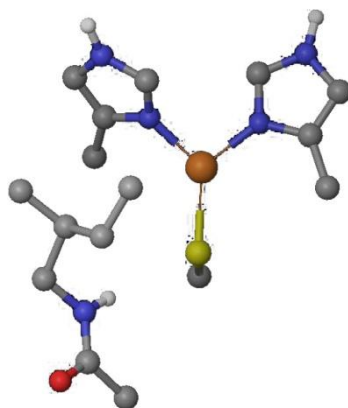


Figura 10. Modelo para el estudio de puentes de hidrógeno mediante NBO. Se han omitido los hidrógenos no polares para claridad de la ilustración. En azul se presentan los átomos de nitrógeno, en gris de carbono, en rojo de oxígeno, en blanco de hidrógeno y en naranja de cobre.

Este modelo incluye la cadena lateral del residuo Ile486 además de la capa de teoría alta de la optimización de ONIOM. Fue optimizado libremente y los resultados comparados con modelos similares obtenidos de las optimizaciones de ONIOM, de la estructura cristalográfica 1ZPU, del modelo de la figura 7 libremente optimizado y de un puente de hidrógeno simple entre N-metil acetamida y tiolato optimizado libremente.

A continuación se enlistan los resultados obtenidos del trabajo de investigación discutiendo su relevancia en el diseño de mimicos del sitio Cu T1 de alto potencial redox.

## 5. Resultados

### *a. Resultados de Validación*

#### **i. Geométrica**

En la validación geométrica se seleccionaron los funcionales BP86, B3LYP, PBE0 y M05 para evaluar la reproducibilidad de parámetros geométricos de 3 complejos de coordinación de cobre con características similares al sitio Cu T1 (Figura 5 en sección 4.a.i). Estos funcionales fueron seleccionados con la intención de probar el desempeño de tres tipos distintos de funcionales: un funcional puro (BP86), uno híbrido (PBE0) y un meta-funcional (M05). Con propósitos comparativos se incluyó el funcional híbrido B3LYP ya que un número importante de los trabajos de Cu T1 se encuentran realizados con este funcional. Las optimizaciones se llevaron a cabo con los programas Gaussian 09 y Jaguar 7.0 y la base LACVP\*, obteniéndose resultados virtualmente iguales. En la tabla 1 se presentan sólo los resultados obtenidos con el programa Jaguar 7.0. El uso de bases más grandes (LACV3P\* y Lan12dz) en los cálculos de optimización no redundó en mejoras en los resultados por lo que se decidió utilizar la base LACVP\* en los subsecuentes cálculos. Las distancias y los ángulos relevantes de la interacción Cu-ligante se comparan en la tabla 1.

Se seleccionó el funcional PBE0 por tener una desviación máxima de 0.09 Å en las distancias Cu-ligante. Aunque las distancias Cu-ligante obtenidas de las optimizaciones con BP86 generaban menores desviaciones en algunos casos, en algunos otros la desviación fue mayor a 0.1 Å. Por esta razón decidimos utilizar el funcional PBE0, que reproduce de una manera más consistente las distancias cristalográficas. La contaminación de spin en los casos estudiados nunca superó 1.2% con respecto al spin total. Todas las optimizaciones subsecuentes se realizaron con el formalismo no restringido y el funcional PBE0/LACVP\*\*

Modelo 1 Cu+										
	Cristal	PBE0			B3LYP		M05		BP86	
		Calculado	Error		Calculado	Error	Calculado	Error	Calculado	Error
Distancias (Angstrom)	Cu-S1	2,230	2,241	-0,011	2,371	-0,141	2,372	-0,142	2,341	-0,111
	Cu-S2	2,275	2,356	-0,081	2,387	-0,112	2,417	-0,142	2,343	-0,068
	Cu-N1	2,035	2,057	-0,022	2,079	-0,044	2,121	-0,086	2,037	-0,002
	Cu-N2	2,158	2,232	-0,074	2,264	-0,106	2,308	-0,150	2,226	-0,068
Ángulos (grados)	S1-Cu-S2	122,1	119,6	2,5	121,2	0,9	119,2	2,9	120,3	1,8
	S1-Cu-N1	127,6	123,6	4,0	121,8	5,8	126,2	1,4	121,0	6,6
	S1-Cu-N2	90,5	89,8	0,7	88,9	1,6	87,9	2,6	91,0	-0,5
	S2-Cu-N1	109,9	116,0	-6,1	116,0	-6,1	112,4	-2,5	118,4	-8,5
	S2-Cu-N2	90,4	89,1	1,3	88,4	2,0	87,8	2,6	90,2	0,2
	N1-Cu-N2	82,9	81,9	1,0	81,6	1,3	79,6	3,3	83,1	-0,2

Modelo 1 Cu2+										
	Cristal	PBE0			B3LYP		M05		BP86	
		Calculado	Error		Calculado	Error	Calculado	Error	Calculado	Error
Distancias (Angstrom)	Cu-S1	2,385	2,469	-0,084	2,529	-0,144	2,501	-0,116	2,480	-0,095
	Cu-S2	2,461	2,483	-0,022	2,561	-0,100	2,567	-0,106	2,552	-0,091
	Cu-N1	2,019	2,063	-0,044	2,093	-0,074	2,127	-0,108	2,092	-0,073
	Cu-N2	2,021	2,101	-0,080	2,166	-0,145	2,179	-0,158	2,170	-0,149
Ángulos (grados)	S1-Cu-S2	108,2	106,0	2,2	111,7	-3,5	109,7	-1,5	102,7	5,5
	S1-Cu-N1	129,4	130,5	-1,1	132,4	-3,0	125,2	4,2	129,8	-0,4
	S1-Cu-N2	87,9	85,3	2,6	83,5	4,4	84,2	3,7	85,7	2,2
	S2-Cu-N1	120,2	118,8	1,4	110,2	10,0	118,7	1,5	122,1	-1,9
	S2-Cu-N2	86,0	83,5	2,5	82,9	3,1	82,0	4,0	82,6	3,4
	N1-Cu-N2	81,8	80,4	1,4	80,2	1,6	78,9	2,9	79,3	2,5

Modelo 2										
	Cristal	PBE0			B3LYP		M05		BP86	
		Calculado	Error		Calculado	Error	Calculado	Error	Calculado	Error
Distancias (Angstrom)	Cu-N1	1,977	2,012	-0,035	2,032	-0,055	2,032	-0,055	2,022	-0,045
	Cu-N2	2,082	2,161	-0,079	2,196	-0,114	2,183	-0,101	2,188	-0,106
	Cu-N3	2,068	2,122	-0,054	2,146	-0,078	2,159	-0,091	2,140	-0,072
	Cu-N4	2,171	2,234	-0,063	2,257	-0,086	2,254	-0,083	2,232	-0,061
	Cu-S	2,253	2,264	-0,011	2,288	-0,035	2,244	0,009	2,292	-0,039
Ángulos (grados)	N1-Cu-N3	135,8	135,2	0,6	133,6	2,2	138,2	-2,4	131,9	3,9
	N1-Cu-N2	84,1	83,6	0,5	83,6	0,5	84,3	-0,3	84,1	-0,0
	N3-Cu-N2	84,6	83,2	1,4	82,6	2,0	82,0	2,6	83,0	1,6
	N1-Cu-N4	111,5	112,9	-1,4	114,1	-2,6	115,1	-3,6	115,1	-3,6
	N3-Cu-N4	108,8	106,9	1,9	107,0	1,8	101,0	7,8	108,4	0,4
	N2-Cu-N4	81,9	80,9	1,0	80,6	1,3	79,8	2,1	81,3	0,6
	N1-Cu-S	86,3	85,5	0,8	85,2	1,1	83,0	3,3	85,1	1,2
	N3-Cu-S	103,2	108,2	-5,0	109,0	-5,8	107,0	-3,8	107,4	-4,2
	N2-Cu-S	170,2	168,0	2,2	167,6	2,6	167,3	2,9	168,4	1,8
N4-Cu-S	100,6	101,2	-0,6	101,4	-0,8	106,6	-6,0	101,0	-0,4	

Modelo 3										
	Cristal	PBE0			M05		BP86			
		Calculado	Error		Calculado	Error	Calculado	Error	Calculado	Error
Distancias (Angstrom)	Cu-S	2,288	2,380	-0,092	2,389	-0,101	2,309	-0,021		
	Cu-N1	1,938	1,995	-0,057	2,056	-0,118	2,001	-0,063		
	Cu-N2	1,939	1,999	-0,060	2,072	-0,133	2,009	-0,070		
Ángulos (grados)	N1-Cu-N2	131,1	127,1	4,0	119,6	11,5	118,0	13,1		
	S-Cu-N1	107,7	107,2	0,5	106,2	1,5	113,9	-6,2		
	S-Cu-N2	121,1	122,1	-1,0	125,9	-4,8	123,8	-2,7		
	Cu-S-C	105,8	101,3	4,5	100,9	4,9	101,5	4,3		

Tabla 1. Ángulos y distancias relevantes de los Modelos 1, 2 y 3.

## ii. Redox

Como primer punto en la validación redox se realizaron optimizaciones libres a nivel DFT con PBE0/LACVP\*\* de los modelos (A) – (F) en los estados de oxidación Cu (I) y Cu (II) (Figura 6, en la sección 4.a.ii). Las estructuras optimizadas fueron comparadas con datos cristalográficos disponibles [44, 48, 49, 50] para verificar una buena reproducción geométrica (ver tabla 2).



X	Cu-N (1)			Cu-N (2)			Cu-X ; X = S, O o N			Cu-S de tioéter		
	Cristal	PBE0	Diferencia	Cristal	PBE0	Diferencia	Cristal	PBE0	Diferencia	Cristal	PBE0	Diferencia
(A) S(CPh <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	1.921	1.950	-0.029	1.923	1.964	-0.041	2.124	2.190	-0.066			
(B) S(CPh <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	1.900	1.950	-0.050	1.908	1.962	-0.054	2.119	2.190	-0.071			
(C) S(CPh <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	1.952	1.992	-0.040	1.987	2.024	-0.037	2.242	2.295	-0.053	2.403	2.554	-0.151
(D) OPh-t-Butil <sup>A</sup>	1.869	1.906	-0.037	1.896	1.950	-0.054	1.817	1.835	-0.018			
(E) OPh-OMetil <sup>A</sup>	1.864	1.911	-0.047	1.888	1.957	-0.069	1.806	1.838	-0.032			
(F) Piridina <sup>B</sup>	1.947	1.970	-0.023	1.947	1.993	-0.046	1.947	1.993	-0.046			

**A:** Complejos cristalizados con cobre en estado de oxidación Cu (II)

**B:** Complejo cristalizado con cobre en estado de oxidación Cu (I).

Tabla 2. Comparación de distancias relevantes (en Å) entre datos cristalográficos y estructuras optimizadas a nivel PBE0/LACVP\*\* de los complejos (A) – (F).

Para los complejos (B) y (C) se obtuvieron 2 estructuras en cada caso; para el complejo (C) el mínimo de menor energía corresponde a la estructura cristalográfica pero en el caso del complejo (B), un mínimo local (2 kcal/mol más desestabilizado que el mínimo global) coincide mejor con la estructura cristalográfica (ver figura 11).

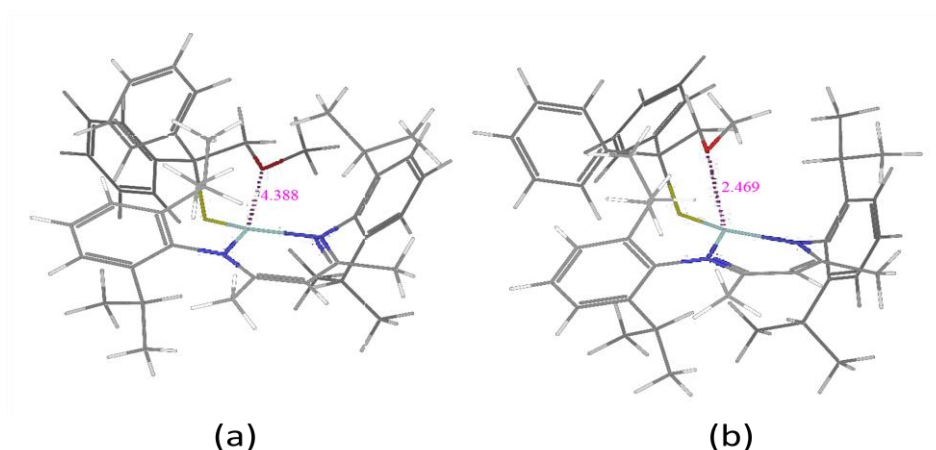


Figura 11. Dos mínimos obtenidos para el complejo (B). (a) complejo tricoordinado correspondiente al mínimo local, (b) complejo tetraordinado correspondiente al mínimo de menor energía. Las distancias Cu–O<sub>éter</sub> (en Å) se muestran en rosa.

Las tres principales distancias Cu–N (1), Cu–N (2) y Cu–X se aproximan a valores cristalográficos con una desviación máxima de 0.07 Å, que es un valor dentro del margen de la validación geométrica. La única distancia que sale de este margen es Cu–S<sub>tioéter</sub> del complejo (C), sin embargo consideramos que esta interacción es débil (ver más adelante) y que puede sufrir modificaciones importantes debido a las tensiones dentro del cristal. Por estas razones consideramos que el nivel de teoría empleado es suficiente para la estimación de los parámetros geométricos de los complejos.

Continuando con la metodología para la reproducción de potencial redox, se procedió a describir la interacción de cada complejo con moléculas explícitas de disolvente. Esto



debido a que una correcta reproducción de potencial redox depende de la consideración de las especies electroquímicamente activas en solución. Las optimizaciones se llevaron a cabo con dos moléculas explícitas de THF para cada uno de los complejos (A) – (F) en ambos estados de oxidación puesto que el catión cobre presenta una máximo de dos posiciones vacantes en su primera esfera de coordinación.

De estas optimizaciones se observó que las distancias Cu–N (1), Cu–N (2) y Cu–X en cada complejo son reproducidas con valores virtualmente iguales a las estructuras optimizadas sin THF, con excepción del complejo (F) oxidado, donde la complejación de una molécula de THF con el catión de cobre elonga las distancias Cu–ligante entre 0.03-0.06 Å.

Con respecto a la distancia Cu–O<sub>THF</sub>, la mínima encontrada fue de 3.8 Å para moléculas que no complejan THF y 2.2 Å para el complejo (F) oxidado (ver figura 12). De esta manera podemos establecer que la única molécula que coordina THF es el complejo (F) oxidado.

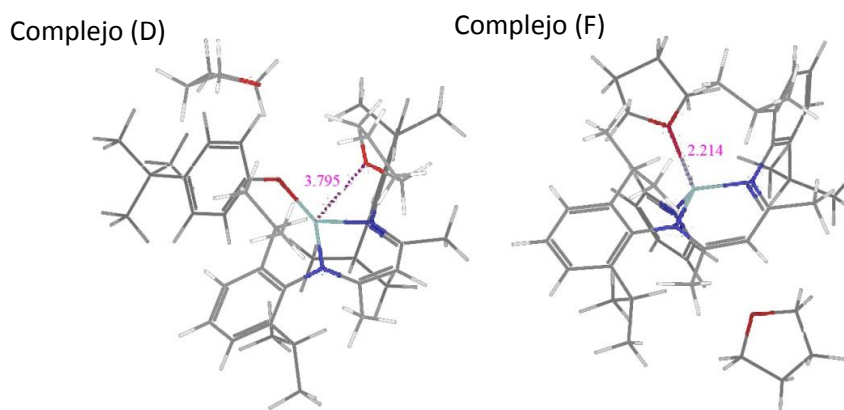


Figura 12. Dos formas de interacción complejo-THF. Izquierda: interacción sin coordinación del complejo (D) y THF. Derecha: coordinación entre complejo (F) oxidado y THF. Las distancias Cu–O<sub>THF</sub> (en Å) se muestran en rosa.

La evaluación de la A. E. de los complejos oxidados permite establecer si las interacciones entre las moléculas de THF y los diferentes complejos afectan el E°. La diferencia entre la A. E. de complejos solos y la A. E. de complejos con dos moléculas de THF es de ~ 0.4 kcal/mol. La modificación ocurre solamente en el complejo (F) ya que en su estado oxidado compleja una molécula de THF. Esto produce una disminución de la A. E. de 5 kcal/mol con respecto al complejo optimizado sin moléculas de THF.

Para completar la descripción de la interacción complejo–THF se realizaron estimaciones de la energía de interacción, con correcciones para eliminar el error de superposición de base (BSSE) mediante el protocolo counterpoise que incluye la relajación de los fragmentos [75]. Ver tabla 3.

Complejo	(A)		(B)		(C)		(D)		(E)		(F)	
	Cu I	Cu II	Cu I	Cu II	Cu I	Cu II	Cu I	Cu II	Cu I	Cu II	Cu I	Cu II
Energía de interacción	-8.0	-8.8	-5.6	-7.9	-8.6	-7.9	-9.2	-8.3	-8.4	-8.3	-10.3	-15.7
Corrección Counterpoise	5.0	5.3	3.6	4.8	4.3	4.9	6.8	6.7	6.6	6.6	6.7	8.4
Energía corregida	-3.0	-3.5	-2.0	-3.1	-4.3	-3.0	-2.4	-1.6	-1.8	-1.7	-3.6	-7.3

Tabla 3. Corrección BSSE a la energía de interacción de los complejos (A) – (F) mediante la metodología de Counterpoise. Valores en kcal/mol.

Las energías corregidas de interacción entre dos moléculas de THF y los complejos (A)–(F) en los estados oxidado y reducido (con excepción del complejo (F) oxidado) promedian una energía de interacción de -1.4 kcal/mol por molécula de THF. Con este valor podemos estimar que de las -7.3 kcal/mol de la interacción del complejo (F) oxidado con dos moléculas de THF, aproximadamente -6 kcal/mol corresponden a la energía de interacción del complejo con la molécula de THF coordinada.

Con los datos de distancias Cu-O<sub>THF</sub>, A. E. con y sin moléculas de THF y las energías de interacción corregidas podemos asumir que la interacción de las moléculas de THF con los complejos son de naturaleza dipolo-dipolo en el caso de los complejos (A)–(E) oxidados y el complejo (F) reducido; de dipolo-anión en el caso de los complejos (A) – (E) oxidados; y un enlace de coordinación con una molécula de THF en el caso del complejo (F) oxidado. Aunque DFT no es la herramienta de primera elección para la evaluación de las interacciones débiles, el análisis los parámetros antes mencionados permite hacer la discriminación entre enlaces de coordinación e interacciones dipolo-dipolo ó dipolo-anión. Por estas razones se optó por considerar a los complejos (A)–(E) sin moléculas explícitas de THF y al complejo (F) con una molécula explícita de THF para el cálculo de potenciales redox.

Con las estructuras optimizadas, se realizaron cálculos en un sólo punto y determinación de frecuencias con el nivel de teoría PBE0/LACVP\*\*++. Se comprobó que todas las estructuras calculadas de las optimizaciones son mínimos (incluyendo los dos isómeros de coordinación en el caso de los modelos (B) y (C)).

Se realizaron cálculos de estabilidad de la función de onda para las especies con electrones desapareados con el programa Gaussian 09 [76, 77]. En el caso de los complejos de cobre no se encontró ninguna inestabilidad, sin embargo para el ferricinio se encontró una inestabilidad que fue corregida con el programa Gaussian 09 para una correcta descripción de la energía del sistema.

Las energías de solvatación fueron calculadas con el modelo de Poisson-Boltzmann (P&B) [78, 79], implementado en Jaguar 7.0 ya que al realizar el cálculo de  $E^\circ$  para los complejos (A), (D) y (E) se obtuvieron menores desviaciones (0.070 V en promedio) con respecto al valor experimental utilizando este modelo. El modelo PCM [79, 80, 81, 82, 83], implementado en Gaussian 09 arrojó desviaciones mayores (0.331 V), por lo cual se decidió utilizar el método de solvatación P&B para el resto de los modelos.

Los valores obtenidos para  $\Delta G^\circ_g$  y las energías de solvatación de las especies involucradas permitieron la estimación de valores de  $E^\circ$  (ver tabla 4).

Complejo	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
$\Delta G^\circ_g$ (kcal/mol)	85.0	82.9	83.4	87.4	89.5	13.7
$\Delta G^\circ_{\text{Solv (Cu I)}} +$ $\Delta G^\circ_{\text{Solv (Ferricinio)}}$ (kcal/mol)	-74.4	-76.5	-77.2	-76.5	-79.5	-50.6
$\Delta G^\circ_{\text{Solv (Cu II)}} +$ $\Delta G^\circ_{\text{Solv (Ferroceno)}}$ (kcal/mol)	-12.2	-13.1	-13.4	-11.2	-12.2	-36.2
$\Delta G^\circ_{\text{Sol}}$ (kcal/mol)	22.9	19.4	19.6	22.1	22.3	-0.6
$E^\circ$ calculado (Volts)	-0.991	-0.843	-0.851	-0.958	-0.966	0.028
$E^\circ$ experimental (Volts)	-0.986	-0.920	-1.000	-1.080	-1.060	-0.108
Diferencia (Volts)	0.005	-0.077	-0.149	-0.122	-0.094	-0.136

Tabla 4. Estimación de potencial redox ( $E^\circ$ ) a nivel de teoría PBE0/LACVP\*\*++.  
Para los complejos (B) y (C) se utilizaron los valores de los mínimos globales.

La utilización de esta metodología permite una desviación máxima con respecto a valores redox experimentales de -0.149 V. La reproducción de  $E^\circ$  en sistemas no acuosos referenciados a  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  presenta errores tan altos como 0.16 V [70] indicando que nuestra metodología se encuentra dentro del rango de reproducción de valores  $E^\circ$ . Más allá de la desviación máxima del  $E^\circ$  experimental, la calidad de la estimación es calificada usualmente en la literatura [70] mediante dos valores: la aproximación a la unidad de la pendiente de la línea obtenida al graficar los valores experimentales de  $E^\circ$  contra valores estimados y el error promedio (calculado como la suma de las desviaciones experimental-teórica de los complejos y dividida entre el total de los complejos). Además de estos indicadores se añadió la raíz de la desviación cuadrática de la media (RMSD por sus siglas en inglés) utilizado para ponderar las desviaciones independientemente de su signo. Estos valores se reportan en la tabla 5 y la figura 13.

Para explorar la posible mejora de la estimación de  $E^\circ$  mediante otros funcionales, se realizaron cálculos en un sólo punto con la base LACVP\*\*++ y los funcionales BP86, B3LYP, M05 y el funcional híbrido propuesto por Szilagyí B(38)P86 [57]. Con propósitos comparativos se incluyó en esta serie al método semiempírico PM6, utilizado en modelos de lacasas calculados con ONIOM en este trabajo. Se utilizaron los valores

de la energía en el punto cero (ZPVE) calculados con el funcional PBE0 para obtener  $\Delta G^\circ_g$  [84] y la energía de solvatación se calculó con los diferentes funcionales mediante P&B. Los cambios en la energía de solvatación fueron inferiores a 1 kcal/mol, por lo que se utilizaron las energías de solvatación estimadas con PBE0. La calidad de la estimación de  $E^\circ$  mediante estos funcionales y el método semiempírico se encuentra condesada en la tabla 5 y la figura 13.

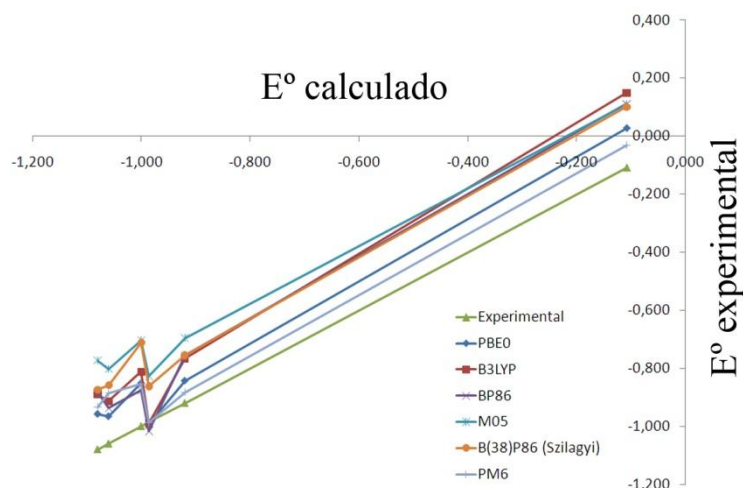


Figura 13. Reproducción de potenciales redox mediante diferentes funcionales y un método semiempírico.

Funcional	Pendiente	$R^2$	Error promedio (V)	RMSD (V)
PBE0	1.05	0.982	-0.10	0,11
B3LYP	1.12	0.970	-0.16	0,17
BP86	1.11	0.964	-0.13	0,16
M05	0.95	0.979	-0.24	0,25
B(38)P86 Szilagyi	1.01	0.979	-0.20	0,21
PM6	0.95	0.965	-0.10	0,12

Tabla 5. Pendiente, coeficiente de correlación ( $R^2$ ), error promedio y RMSD de diferentes funcionales y un método semiempírico para la estimación del potencial redox.

Como puede observarse de la tabla 5, todos los métodos probados tienen una pendiente próxima a 1 con coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de 0.96 ó superiores. Los funcionales B3LYP y BP86 se alejan más del valor ideal, seguidos por M05, PBE0 y PM6 con una desviación de 0.05 y la mejor reproducción en cuanto a precisión se obtuvo con el funcional híbrido B(38)P86 propuesto por Szilagyi. El Error promedio es un parámetro de exactitud y para este caso los funcionales M05 y B(38)P86 presentaron los mayores errores, seguidos de BP86 y B3LYP con errores promedio de 0.13 y 0.16 V. La mejor reproducción se obtuvo con PBE0 y PM6 con errores promedio de 0.1 V. Esta misma

tendencia se observó en los valores de RMSD calculados. Considerando los parámetros principales, el funcional PBE0 representa el mejor balance entre desviación de la pendiente y error promedio por lo que se decidió seleccionar a este funcional para la estimación de potenciales redox. Es importante hacer notar que PM6 y PBE0 tienen una reproducción similar de la energía electrónica cuando se utilizan geometrías optimizadas por PBE0.

Por último, es importante mencionar que el análisis de población Boltzmann de los dos isómeros de coordinación identificados en el caso del complejo (B) y los dos identificados para el complejo (C) permitieron hacer una re-interpretación de datos experimentales previamente reportados [48]. Se estableció que aunque la espectroscopia EPR y UV-visible identificaban al complejo (C) como tetracoordinado, éste se encuentra tricoordinado en las mediciones redox en THF. Esto explica por qué los potenciales redox de los complejos (A), (B) y (C) son tan similares, ya que los tres presentan tricoordinación del cobre con dos átomos de nitrógeno y un tiolato.

### *b. Distorsiones Geométricas*

Una vez establecido que el nivel de teoría PBE0/LACVP\*\* permite una buena aproximación a los parámetros geométricos y de potencial redox en complejos de cobre, este nivel fue utilizado para la evaluación del impacto de las distorsiones geométricas en el potencial redox.

Inicialmente se optimizó libremente el modelo del sitio de Cu T1 descrito en la figura 7 (ver sección 4.b.ii) mediante PBE0/LACVP\*\*, obteniéndose una estructura muy similar al sitio Cu T1 de la estructura cristalográfica 1GYC. Las desviaciones de las distancias Cu-S, Cu-N<sub>ImA</sub> y Cu-N<sub>ImB</sub> con respecto a las distancias cristalográficas fueron de 0.011, 0.032 y 0.012 Å, respectivamente. Con este resultado podemos sumarnos a la descripción del sitio de Cu T1 de las caspas como sitios de coordinación sin tensiones por parte de la proteína (ausencia de entasis).

Para la descripción de distorsiones geométricas se optó por comparar la desestabilización que sufre el modelo ante una restricción geométrica con respecto al cambio en su potencial redox. Para ello se utilizaron las aproximaciones descritas en la sección 4.b.i, donde el negativo de A. E. es equivalente  $\Delta E_{g(\text{vertical})}^{\circ}$  y esta  $\Delta E_{g(\text{vertical})}^{\circ}$  puede ser aproximada a  $\Delta G_{\text{Solv}}$ . Siguiendo el procedimiento para el cálculo de  $E^{\circ}$ , el negativo de A. E. es dividido entre  $n$  y  $F$  para obtener el valor de  $E^{\circ}$  aproximado. Así, la tendencia presentada en las subsecuentes gráficas como “A. E. verticales” indica cómo se modifica  $E^{\circ}$  debido a una distorsión geométrica particular modificada sistemáticamente.

La primera distorsión geométrica analizada fue sobre las distancias de enlace. La modificación individual de las distancias A, B, C y la modificación sincronizada de las mismas, desde -0.2 hasta +0.4 Å, se describen en la figura 14.

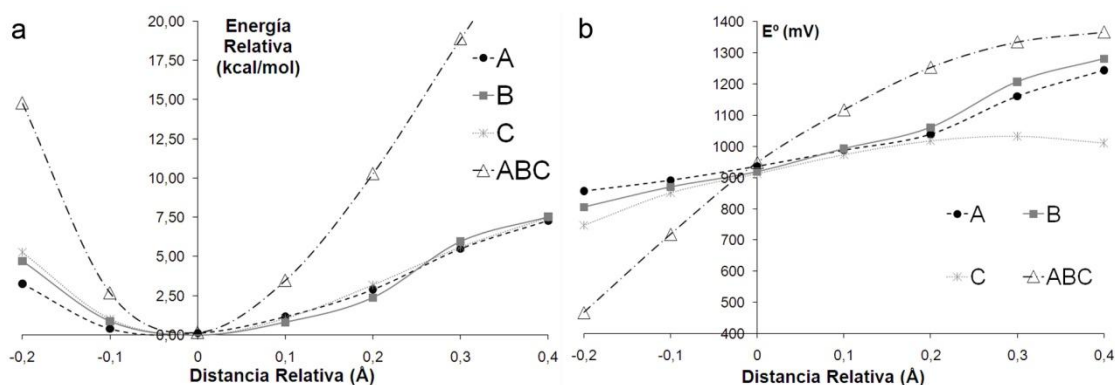


Figura 14. Modificación sistemática de las distancias A ( $\text{Cu-Im}_A$ ), B ( $\text{Cu-Im}_B$ ), C ( $\text{Cu-S}$ ) y la modificación sincronizada de las tres distancias anteriores, ABC. a: energías de desestabilización relativas vs distancias modificadas; b: A. E. verticales vs distancias modificadas. Valores relativos a la estructura optimizada libremente.

Puede observarse en la figura 14 que cualquier contracción en las distancias genera una desestabilización del complejo de cobre, así como una disminución del  $E^\circ$ . Cuando las distancias correspondientes a la interacción  $\text{Cu-imidazol}$  (A y B) son elongadas, el  $E^\circ$  aumenta, acompañado de una desestabilización moderada del complejo. La modificación de la distancia C ( $\text{Cu-S}$ ) genera una desestabilización similar a la originada por la modificación de la distancia A (ó B) pero con un menor incremento de  $E^\circ$ , mientras que la modificación sincronizada genera un gran aumento de  $E^\circ$  pero a costa de una gran desestabilización del complejo. Considerando la mejor combinación entre menor desestabilización y mayor aumento de  $E^\circ$ , la elongación de la distancia A (ó B) genera el mejor compromiso con un incremento modesto de  $E^\circ$  en  $\sim 300$  mV y una desestabilización del complejo de  $\sim 7.5$  kcal/mol.

Un parámetro usualmente utilizado para la comparación de afinidades electrónicas en el formalismo “no restringido” es la energía del orbital activo redox, que en este caso es el  $\beta$ -LUMO (siglas en ingles para el orbital molecular desocupado de más baja energía). Este orbital  $\beta$ -LUMO albergará al electrón ganado por la molécula después de un proceso de reducción. La comparación entre los valores del  $\beta$ -LUMO y la A. E. vertical indican que para los complejos estudiados la utilización de esta aproximación es válida y puede emplearse para describir el comportamiento redox de los complejos puesto que siguen las mismas tendencias (ver figura 15). Es importante mencionar que estas tendencias fueron observadas en el resto de las distorsiones geométricas, indicando una correspondencia entre orbitales  $\beta$ -LUMO con menor energía y valores mayores de  $E^\circ$ .

Pasando a la modificación sistemática de ángulos, se consideraron los ángulos  $\alpha$  ( $\text{N}_{\text{ImA}}\text{-Cu-N}_{\text{ImB}}$ ) y  $\delta$  ( $\text{S-Cu-N}_{\text{ImB}}$ ), analizando los valores de  $90^\circ$  hasta  $180^\circ$  con incrementos de  $10^\circ$ . Las tendencias de estas modificaciones quedan descritas en la figura 16. Los ángulos  $\alpha = 104^\circ$  y  $\delta = 126^\circ$  obtenidos de la estructura optimizada libremente fueron incluidos en la figura 16 para propósitos comparativos.

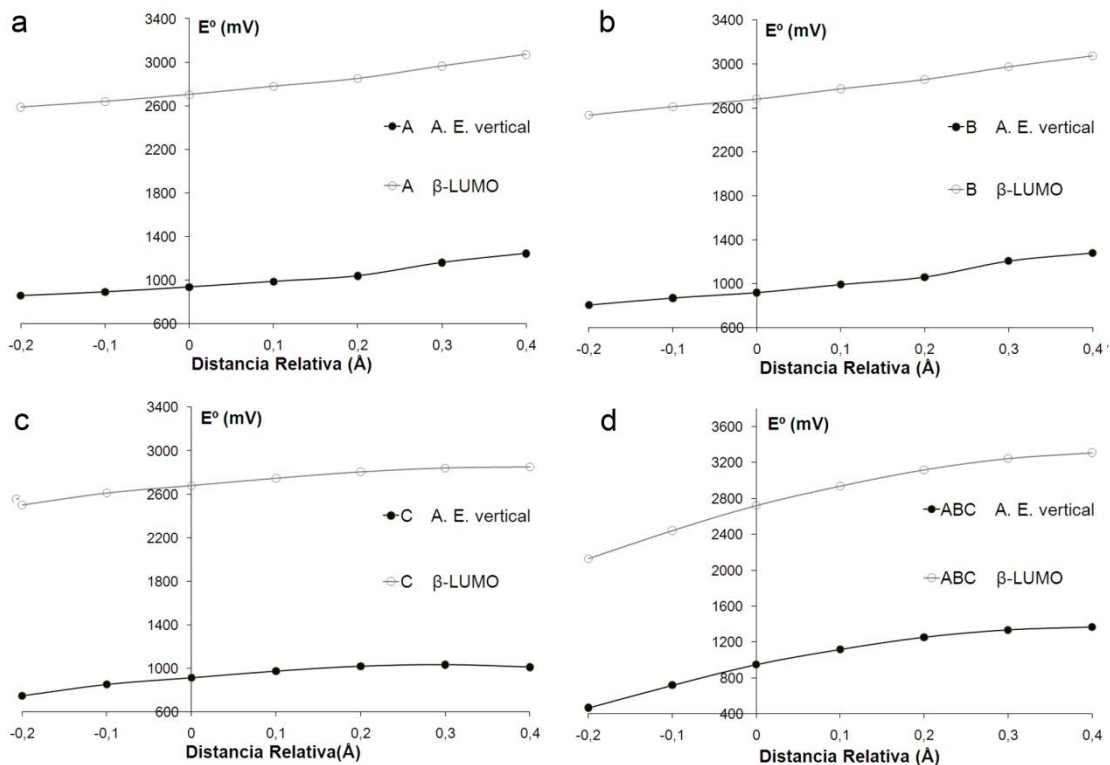


Figura 15. A. E. verticales y energías de  $\beta$ -LUMO durante la modificación sistemática de las distancias A, Cu-Im<sub>A</sub> (a); B, Cu-Im<sub>B</sub> (b); C, Cu-S (c); y la modificación sincronizada ABC (d). Valores relativos a la estructura optimizada libremente.

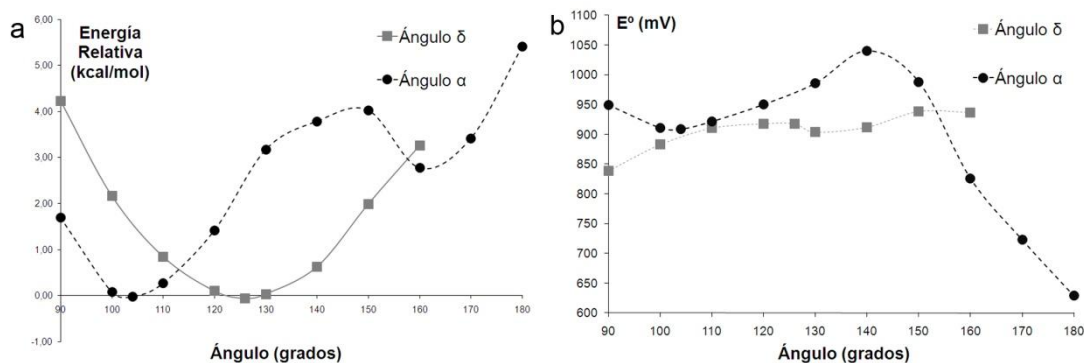


Figura 16. Modificación sistemática de los ángulos  $\alpha$  ( $N_{ImA}$ -Cu- $N_{ImA}$ ) y  $\delta$  (S-Cu- $N_{ImB}$ ). a: energías de desestabilización relativas vs ángulos modificados; b: A. E. verticales vs ángulos modificados. Valores relativos a la estructura optimizada libremente.

Los patrones de desestabilización de los ángulos  $\alpha$  y  $\delta$  pueden observarse en la figura 16. En el caso de la modificación del ángulo  $\delta$ , el impedimento estérico impidió obtener estructuras parcialmente optimizadas para los ángulos  $170^\circ$  y  $180^\circ$ . Con respecto a las tendencias obtenidas para la A. E. vertical, éstas demuestran que existe poco aumento de  $E^\circ$  con la modificación de estos ángulos, 40 mV en el caso del ángulo  $\delta$  y 120 mV en el caso de  $\alpha$ , indicando hasta el momento que la modificación de la distancia Cu-Im es mejor para el aumento de  $E^\circ$ .

La tendencia que sigue la A. E. vertical al tensionar el ángulo  $\alpha$  puede ser explicada mediante orbitales moleculares. En el caso aquí estudiado, el orbital redox activo  $\beta$ -LUMO tiene carácter de anti-enlace (ver figura 17). En el ángulo de  $\alpha = 104^\circ$ , correspondiente a la optimización sin restricciones, los lóbulos del orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre interactúan con un orbital  $p$  del azufre y dos lóbulos  $\sigma$  de cada uno de los anillos de imidazol. Cuando aumenta el ángulo  $\alpha$  hasta  $140^\circ$ , la participación de uno de los lóbulos  $\sigma$  de un anillo de imidazol y uno de los lóbulos del orbital  $p$  del azufre se ve impedida por la tensión geométrica. Como hemos mencionado, el orbital  $\beta$ -LUMO tiene carácter de anti-enlace, por lo que la disminución de los traslapes entre los lóbulos disminuye la energía de este orbital y por tanto aumenta el valor de  $E^\circ$ . Esto se puede observar esquemáticamente en la figura 17. Si se continúa con la tensión geométrica y se aumenta el valor de  $\alpha$  hasta  $180^\circ$ , los dos lóbulos de los anillos de imidazol interactúan nuevamente con el orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre, pero ahora lo hacen con lóbulos distales y no próximos como sucedía cuando  $\alpha = 104^\circ$ . Sin embargo, la interacción con el orbital  $p$  del azufre sigue siendo con uno sólo de sus lóbulos, ocasionando un aumento en el traslape orbital si se analiza el aumento del ángulo  $\alpha$  sólo desde  $140^\circ$  hasta  $180^\circ$ . Esto origina un aumento en la energía del orbital  $\beta$ -LUMO y una consecuente disminución de  $E^\circ$ , como se aprecia en la figura 16 b. En términos de las interacciones  $\pi$  o pseudo- $\sigma$  entre cobre y azufre, podemos decir que la interacción  $\pi$  domina en  $\alpha = 104^\circ$  y su participación decrece conforme  $\alpha$  aumenta, mientras que la interacción pseudo- $\sigma$  aumenta conforme aumenta el valor de  $\alpha$ , teniendo su punto máximo en  $180^\circ$ .

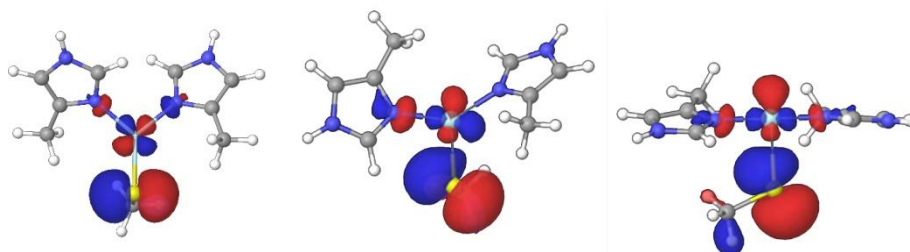


Figura 17. Representación gráfica de los orbitales  $\beta$ -LUMO. Izquierda  $\alpha = 104^\circ$ , centro  $\alpha = 140^\circ$  y derecha  $\alpha = 180^\circ$

Con respecto a la modificación sincronizada de los ángulos  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  para emular la piramidalización de los ligantes, ésta no resultó en un aumento significativo de  $E^\circ$  pero sí en una gran desestabilización del complejo, por lo que fue desestimada para el análisis.

La modificación sistemática de ángulos diedros comenzó con la restricción del ángulo  $\theta$  (S-Cu-N<sub>ImB</sub>-C<sub>ImB</sub>). Debido a que este ángulo forma parte del plano de los ligantes (definido por el átomo de azufre y los dos nitrógenos coordinados al cobre) puede concebirse a esta torsión diedral como el giro del anillo de imidazol B alrededor del plano de los ligantes utilizando como eje la distancia Cu-N<sub>ImB</sub>. La energía de desestabilización y las variaciones de A. E. vertical se reportan en la figura 18.



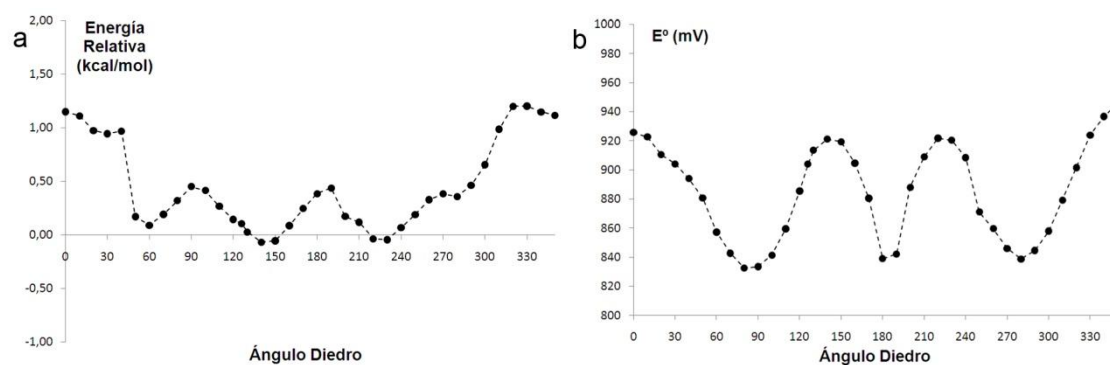


Figura 18. Modificación sistemática del ángulo diedro  $\theta$  (S-Cu-N<sub>ImB</sub>-C<sub>ImB</sub>). a: energías de desestabilización relativas vs ángulo diedro modificado; b: A. E. verticales vs ángulo diedro modificado. Valores relativos a la estructura optimizada libremente.

En este caso se observó un comportamiento simétrico en la modificación de la energía relativa y la A. E. vertical con respecto a la rotación diedral. Es decir, las tendencias de ambos parámetros se comportan de la misma manera cuando se aumenta el ángulo  $\theta$  de  $0^\circ$  a  $180^\circ$  que cuando disminuye de  $360^\circ$  a  $180^\circ$ . En cuanto a las magnitudes se observa que existen pequeñas desestabilizaciones del complejo durante la rotación que nunca rebasan las 1.5 kcal/mol y son acompañadas con pequeños decrementos de  $E^\circ$ . Esto puede ser explicado cuando se superponen las estructuras obtenidas de la rotación, como se muestra en la figura 19. En ella podemos apreciar que cada movimiento del anillo de imidazol B va acompañado por un movimiento similar del anillo de imidazol A sugiriendo que este movimiento inducido compensa el rearrreglo electrónico por la restricción del anillo de imidazol B.

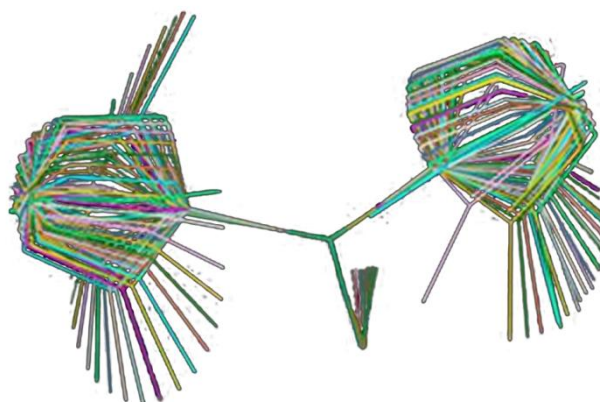


Figura 19. Superposición de las 35 estructuras generadas durante la rotación del ángulo diedro  $\theta$ . Cada estructura aparece de un color diferente.

Esta hipótesis del movimiento de compensación por parte del segundo anillo de imidazol es sostenida por los resultados de la rotación restringida de los dos anillos de imidazol con respecto al plano de los ligantes (ángulos diedros  $\theta$  y  $\phi$ ). Esta rotación sincronizada obtuvo su punto máximo de desestabilización con valores de  $\theta = 180^\circ$  y  $\phi$

= 190°, cuando los planos de los anillos de imidazol se encontraban coplanares al plano de los ligantes. La desestabilización en este punto fue de ~5 kcal/mol con un aumento de  $E^\circ$  menor a 250 mV. Aunque es un buen compromiso entre energía de desestabilización y aumento de  $E^\circ$ , la elongación de la distancia Cu–Im sigue siendo el mejor escenario.

El papel protagonista de la interacción Cu–S [18] queda reflejado en los resultados de la rotación del ángulo diedro  $\omega$  (C–S–Cu–N<sub>ImA</sub>), que representa la rotación del metilo del metil-tiolato alrededor del plano de los ligantes. Las tendencias obtenidas de esta rotación se ilustran en la figura 20.

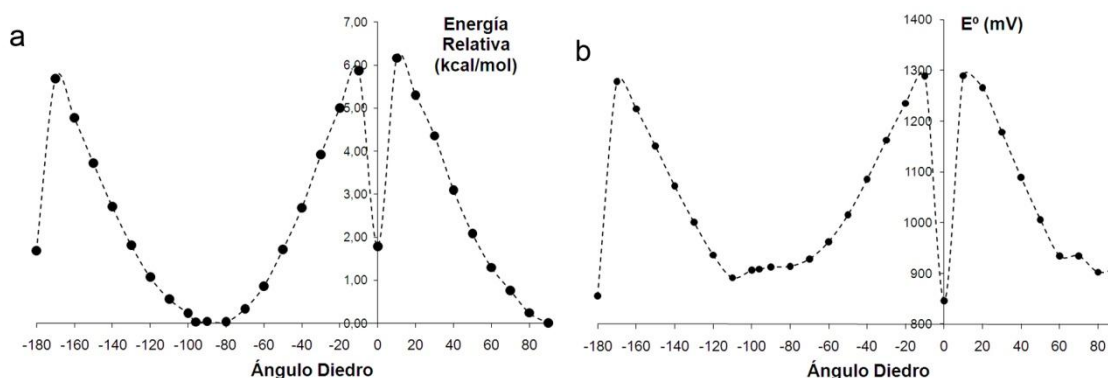


Figura 20. Modificación sistemática del ángulo diedro  $\omega$  (C–S–Cu–N<sub>ImA</sub>). a: energías de desestabilización relativas vs ángulo diedro modificado; b: A. E. verticales vs ángulo diedro modificado. Valores relativos a la estructura optimizada libremente.

El valor del ángulo diedro  $\omega$  en la estructura cristalográfica es de -90°. Este punto se encuentra muy próximo al mínimo de energía en la gráfica correspondiente a  $\omega = -96^\circ$ . Se observa también un segundo mínimo en  $\omega = 0^\circ$  con una desestabilización menor a 2 kcal/mol (ver más adelante). El punto máximo de desestabilización corresponde al punto máximo de  $E^\circ$ . En este caso podemos decir que a costa de 6 kcal/mol de desestabilización del complejo, se aumenta el  $E^\circ$  en 390 mV. Este es el mejor compromiso entre desestabilización y aumento de  $E^\circ$  encontrado con las modificaciones geométricas sistemáticas.

De particular interés son los cambios que se observan cuando el ángulo  $\omega$  pasa de 0° a 10° o -10°. Existe un cambio abrupto en la energía de desestabilización y en el valor de  $E^\circ$  que es explicado mediante la reorganización de los anillos de imidazol. Durante toda la secuencia de rotación del ángulo diedro  $\omega$ , el valor del ángulo N<sub>ImA</sub>–Cu–N<sub>ImB</sub> es próximo a 110°, sin embargo cuando el valor de  $\omega = 0^\circ$ , el ángulo N<sub>ImA</sub>–Cu–N<sub>ImB</sub> se incrementa hasta ~160°. Este comportamiento está relacionado con la modificación del ángulo  $\alpha$  descrito previamente donde se observa una disminución de la energía de desestabilización en  $\alpha = 160^\circ$ . Una explicación de cómo incide esta reorganización en el comportamiento de  $E^\circ$  se detalla a continuación mediante un análisis orbital.

En la figura 21 se presentan los orbitales  $\beta$ -LUMO de 3 conformaciones seleccionadas de la modificación sistemática de  $\omega$ . Partiendo de la estructura con  $\omega$  igual a  $-90^\circ$  puede observarse que el orbital  $\beta$ -LUMO está compuesto por el orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre, un orbital  $p$  del azufre y dos lóbulos provenientes de los dos anillos de imidazol. Estos lóbulos se encuentran orientados hacia dos de los lóbulos del orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre. Cuando modificamos el ángulo diedro  $\omega$ , el orbital  $p$  del azufre rota sobre el eje Cu-S (Figura 21, vista lateral, configuración  $-20^\circ$ ). El orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre a su vez sigue el movimiento del orbital  $p$  del azufre para dejar en el mismo plano dos de sus lóbulos con los del orbital  $p$  del azufre. Esto se realiza a expensas de la interacción del orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre con los lóbulos de los anillos de imidazol. Como se ha establecido anteriormente, esta es una interacción de anti-enlace y entre menos traslape exista mayor será el aumento de  $E^\circ$ . Este comportamiento se puede apreciar en la figura 21: conforme se rota el ángulo diedro, el orbital se estabiliza debido a una menor interacción con los orbitales del imidazol y aumenta  $E^\circ$ .

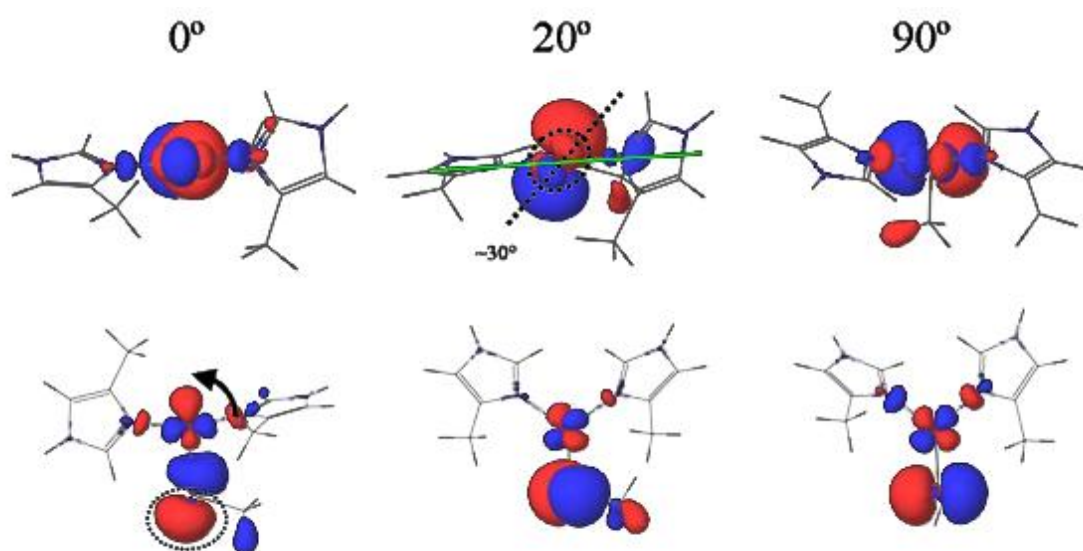


Figura 21. Representación gráfica de los orbitales  $\beta$ -LUMO de la modificación sistemática del ángulo diedro  $\omega$  en las conformaciones  $0^\circ$ ,  $-20^\circ$  y  $-90^\circ$ . Se presentan dos vistas de los orbitales: arriba, vista lateral de los orbitales; abajo, vistas superiores de los orbitales..

En la figura 21 aparecen dos planos cortando una elipse punteada en la representación lateral del orbital  $\beta$ -LUMO en la conformación de  $-20^\circ$  (centro y arriba). La elipse enmarca a los lóbulos del orbital  $d$  del cobre, la línea blanca punteada representa el plano de este orbital y la línea sólida verde representa el plano de los tres ligantes y el cobre. Como puede observarse, el orbital  $d$  del cobre queda desfasado  $30^\circ$  del plano de los ligantes.

Cuando llegamos a  $0^\circ$  existe un cambio importante en la disposición de los orbitales. El orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre gira sobre el eje  $z$   $-45^\circ$  (otra manera de decir esto es que el orbital  $d_{x^2-y^2}$  del cobre deja de participar en el  $\beta$ -LUMO y entra en acción el orbital  $d_{xy}$  del cobre (ver figura 21, esquina inferior izquierda). Justo con este movimiento aparece el

aumento del ángulo  $N_{ImA}-Cu-N_{ImB}$ , dando la posibilidad de que los lóbulos de los anillos de imidazol interactúen con lóbulos distales del orbital  $d$  del cobre (lo hacían con lóbulos próximos en la configuración de  $-90^\circ$ ). Finalmente, debido al cambio de orientación, el orbital  $p$  original del azufre queda perpendicular al plano de los ligantes, dejando que otro orbital  $p$  de azufre interactúe con el orbital  $d$  del cobre. En este caso sólo es posible hacer la interacción con uno de los lóbulos. Este cambio conformacional y de acomodo electrónico explica el cambio abrupto en energía tanto como el de  $E^\circ$  del complejo en conformación  $0^\circ$ .

Como se ha señalado anteriormente, el comportamiento de la energía de desestabilización del complejo ante la modificación de  $\omega$  sugiere la existencia de un segundo mínimo en energía en  $\omega = 0^\circ$ . Tanto la conformación de  $-90^\circ$  como la conformación de  $0^\circ$  fueron optimizadas libremente e identificadas como mínimos mediante el cálculo de frecuencias. La diferencia energética entre ellos es de 1.7 kcal/mol, siendo más estable el conformero de  $-90^\circ$  (mínimo 1) que el conformero de  $0^\circ$  (mínimo 2). Las estructuras cristalográficas de las lacasas de alto  $E^\circ$  (sólo tres residuos coordinados al Cu T1) reportadas hasta el momento presentan una estructura muy similar al mínimo 1 con valores de  $\omega$  próximos a  $-90^\circ$ . El estado de transición entre estos dos mínimos fue también optimizado y corroborado mediante cálculo de frecuencias, obteniendo sólo una frecuencia imaginaria. El estado de transición presenta una energía de 4.6 kcal/mol por encima del mínimo 1. Con estos datos podemos inferir que, de no existir restricciones por parte de la proteína, los dos mínimos serían accesibles a temperatura ambiente con una proporción aproximada de 94% en el mínimo 1 y un 6% en el mínimo 2, determinadas mediante una distribución de Boltzmann. Para hacer una correlación de esta información con datos experimentales relacionaremos los dos mínimos con diferentes formas de transferencia de carga Cu-S.

Como se estableció en la sección 2.b, estudios espectroscópicos han permitido la identificación de 2 formas de transferencia de carga Cu-S, relacionándolas con diferentes formas de participación del orbital  $p$  del azufre. En la figura 21 puede apreciarse cómo la conformación  $-90^\circ$  (relacionada con el mínimo 1) tiene un carácter principalmente de interacción  $\pi$ , mientras que la conformación de  $0^\circ$ , relacionada con el mínimo 2, tiene carácter pseudo- $\sigma$  (ver figuras 2 y 21). También se ha establecido que las diferentes formas de transferencia de carga otorgan diferentes coloraciones en las proteínas [20, 21, 22]; aquellas proteínas donde la interacción es primordialmente  $\pi$  se observa una coloración azul, mientras que aquellas donde la interacción es pseudo- $\sigma$  aparece una coloración verde. De esta manera podemos asignar al mínimo 1 con la coloración azul y al mínimo 2 con la coloración verde.

En las lacasas de alto potencial reportadas hasta el momento siempre se ha identificado una coloración azul característica de la interacción  $\pi$ , además no se ha reportado hasta el momento un cambio de coloración de las lacasas a temperaturas bajas como sucede con algunas proteínas con sitios Cu T1 poco restringidos [21, 22].

Esto indica que aunque en principio pueden ser accesibles los dos mínimos identificados, las tensiones de la proteína evitan el acceso al mínimo dos y permite reformular la idea de que el sitio de Cu T1 se encuentra libre para orientarse a placer. Al existir interacciones extra entre los tres ligantes del sitio de Cu T1 y la proteína, la superficie de potencial cambia y la pequeña diferencia obtenida para los dos mínimos aislados ya no es conservada. En cambio, nosotros proponemos que las fuerzas que mantienen al sitio Cu T1 en su posición de mínimo 1 deben hacer que tanto el estado de transición como el mínimo dos sean inaccesibles a temperatura ambiente.

Con respecto a las aproximaciones utilizadas en el ciclo termodinámico expuestas en la sección 4.b, es posible corroborar la validez de una de ellas. La eliminación de la diferencia en la energía de solvatación ( $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$ ) puede sustentarse mediante cálculos de solvatación del modelo para un pequeño número de restricciones. Para ello se incorporaron las energías de solvatación al cálculo de  $E^\circ$  y se compararon contra los valores obtenidos sin disolvente.

Se seleccionó la rotación del ángulo diedro  $\omega$ , puesto que es la que presenta el mejor compromiso entre energía de desestabilización y aumento de  $E^\circ$ . Puesto que la distorsión de  $\omega$  presenta un comportamiento periódico, se decidió realizar el análisis sólo de  $\omega = 0^\circ$  hasta  $\omega = 90^\circ$ . Se realizaron cálculos de la energía de solvatación de los conformeros con los disolventes agua, THF y ciclohexano mediante el modelo de solvatación Poisson-Boltzmann. Los valores obtenidos se presentan en la figura 22.

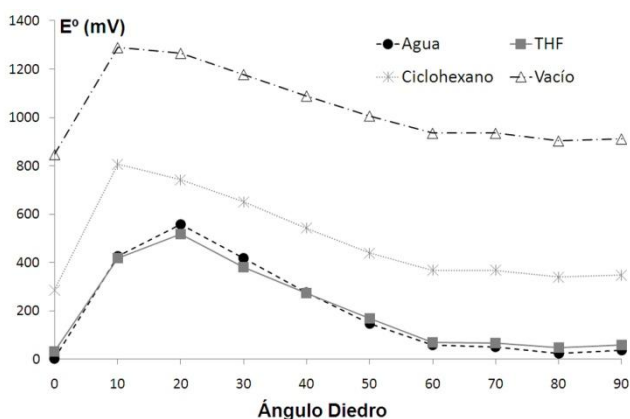


Figura 22. Comparación de  $E^\circ$  durante la rotación del ángulo diedro  $\omega$  en vacío y tres diferentes disolventes (agua, THF y ciclohexano).

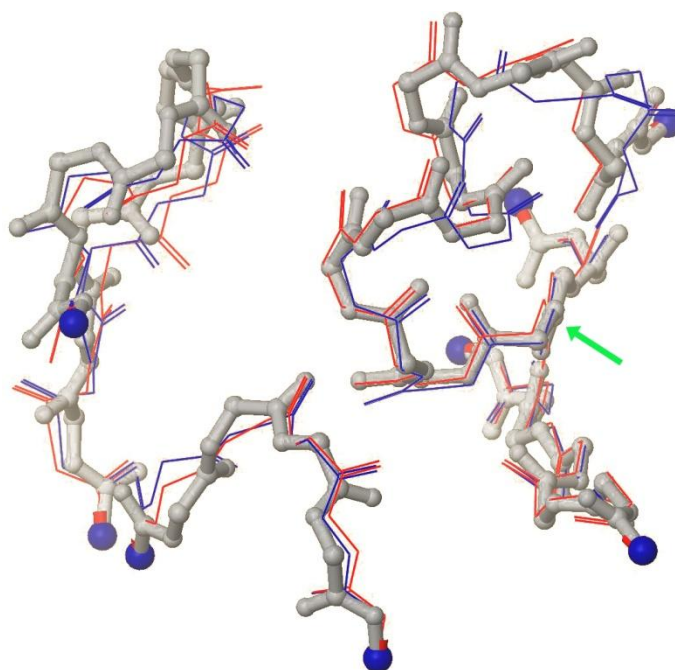
Se puede constatar que aunque el valor de  $E^\circ$  cambia en agua, THF o ciclohexano, la tendencia observada en vacío se mantiene cuando se incorporan las energías de solvatación. Estos tres disolventes fueron seleccionados para comparar diferentes valores de constantes dieléctricas (80, 7.6 y 2 respectivamente). Los valores de  $E^\circ$  obtenidos para de THF y agua son muy parecidos aunque tienen constantes dieléctricas muy diferentes. Esto puede ser explicado mediante el ciclo termodinámico empleado para el cálculo de  $E^\circ$  (ver Esquema 1, sección 4.a), donde las energías de solvatación de los compuestos oxidados y reducidos son restadas para obtener  $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$ . Aunque los

valores de energías de solvatación de las especies involucradas son diferentes en cada disolvente, la diferencia de ellos ( $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$ ) es menor a 1 kcal/mol en ambos disolventes.

El caso particular de THF presenta un valor próximo a 8, que es el estimado para la constante dieléctrica dentro de una proteína con un sitio Cu T1 [58], por lo que podemos inferir que las tendencias observadas en el vacío tendrán un impacto similar si son incorporadas en proteínas.

### *c. Puentes de hidrógeno y efectos electrostáticos*

La importancia de los puentes de hidrógeno en la regulación de procesos redox ha sido descrita en la sección 2.c encontrando una correlación entre su presencia y el aumento del potencial redox. Puesto que en el sitio de Cu T1 de las lacasas sólo existe un puente de hidrógeno entre una amida de cadena principal y el átomo de azufre del residuo de cisteína coordinado al cobre, centraremos nuestra atención en esta interacción. El modelo de la proteína Fet3 descrito en la sección 4.c.ii fue optimizado con la rutina ONIOM implementada en Gaussian 09 para cálculos QM/QM. La estructura de la cadena principal de la proteína cristalizada y la de dos modelos optimizados de la misma se muestran en la figura 23.



**Figura 23.** Estructuras sobrepuestas de las cadenas principales de la proteína Fet3 optimizada (gris), del modelo de proteína Fet3 nativa optimizado (azul) y del modelo de la proteína Fet3 mutante H483Q optimizado (rojo). La flecha verde señala la posición del residuo 483.

Como se puede apreciar en la figura 23, existe poco reacomodo de la cadena principal de la proteína en las dos optimizaciones. Como se esperaba, existe mayor reacomodo de los residuos cerca del residuo Q483 en el modelo de la mutante puesto que existe una diferencia en la naturaleza de los aminoácidos en la posición 483 entre la estructura cristalográfica nativa y el modelo mutante. También es posible apreciar la gran semejanza entre la estructura cristalográfica y el modelo de la proteína nativa, indicando



que el modelo seleccionado fue suficiente para conservar las interacciones de la proteína, permitiendo la relajación de cadenas laterales.

Centrándonos ahora en la red de puentes de hidrógeno descrita en la sección 2.c, entre el sitio de Cu T1 y el cúmulo T2-T3, podemos observar una perturbación originada por la mutación H483Q en la figura 24. En esta perturbación puede observarse que al sustituir el anillo de imidazol (proveniente del residuo de histidina 483 original) por una amida (del residuo de glutanamina sustituido) se elimina el puente de hidrógeno con el carbonilo de cadena principal del residuo de cisteína. El impacto de la ruptura de este puente de hidrógeno sobre el sitio de Cu T1 y su puente de hidrógeno amida–tiolato se evaluó mediante análisis geométricos, energías de interacción, cambios en  $E^\circ$  y análisis NBO (Natural Bond Orbitals).

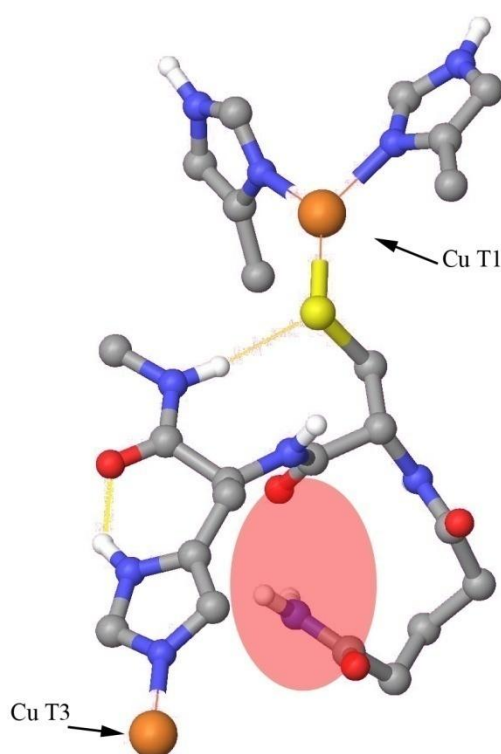


Figura 24. Interrupción de la red de puentes de hidrógeno entre el sitio de Cu T1 y el cúmulo T2-T3. En el círculo rojo se indica la ausencia de puente de hidrógeno en la mutante H483Q. En líneas amarillas las interacciones de puente de hidrógeno.

De los modelos optimizados con QM/QM se extrajeron modelos pequeños que incluyeran el sitio de Cu T1 y el puente de hidrógeno hacia azufre como se encuentra descrito en la sección 4.c.ii (figura 10); el modelo de la proteína nativa fue etiquetado como “*Nativa*” y el de la mutante H483Q, etiquetado como “*Mutante*”. Para hacer una comparación sistemática se incluyeron 3 modelos pequeños: el modelo de la figura 7, que representa al sitio de Cu T1 sin el puente de hidrógeno de amida y es etiquetado como “*T1 Cu*”; el modelo de la figura 10, que representa al sitio de Cu T1 con el puente de hidrógeno de amida optimizado libremente sin las restricciones de la proteína y es

etiquetado como “*Libre*”; y un puente de hidrógeno simple entre el metil-tiolato y la N-metil-acetamida, descrito en la figura 25 y etiquetado como “*Tiolato*”.

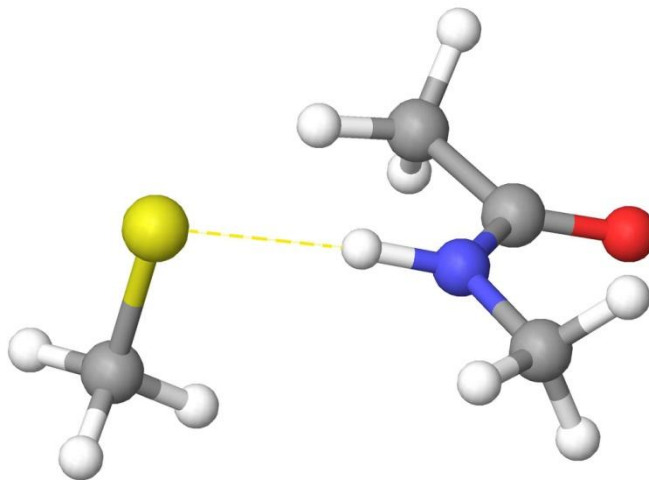


Figura 25. Esquema del modelo de puente de hidrógeno “Tiolato” integrado por el metil-tiolato y la N-metil-acetamida. En gris se encuentran los átomos de carbono, azul el nitrógeno, rojo el oxígeno y blanco los hidrógenos.

En la tabla 6 quedan resumidos los parámetros geométricos de los 3 modelos pequeños, de los dos modelos QM/QM y de la estructura cristalográfica de la proteína Fet3.

		Tiolato	T1 Cu	Libre	Cristal	Nativa	Mutante	Diferencia Nat-Mut
Distancias (Å)	Cu-S	--	2.18	2.18	2.19	2.22	2.28	-0.06
	Cu-N <sub>ImA</sub>	--	2.02	2.00	2.07	1.89	2.06	-0.17
	Cu-N <sub>ImB</sub>	--	2.01	2.01	2.08	1.87	2.05	-0.18
	S-N <sub>amida</sub>	3.19	--	3.78	3.54	3.69	3.36	0.33
	S-H	2.14	--	3.00	--	2.76	2.34	0.42
Ángulos (°)	S-Cu-N <sub>ImA</sub>	--	127	128	131	130	127	3
	N <sub>ImA</sub> -Cu-N <sub>ImB</sub>	--	103	103	103	99	102	-3
Angulo diedro (°)	C <sub>Cis</sub> -S-Cu-N <sub>ImB</sub>	--	96	95	101	102	92	10
	N <sub>amida</sub> -S-Cu-N <sub>ImB</sub>	--	--	76	149	155	150	5

Tabla 6. Parámetros geométricos del sitio de Cu T1 de la proteína Fet3 cristalizada (*Cristal*), del modelo QM/QM nativo optimizado (*Nativa*), del modelo de la mutante H483Q (*Mutante*), del modelo metil-tiolato N-metil-acetamida (*Tiolato*), el sitio de Cu T1 sin puente de hidrógeno (*T1 Cu*) y el sitio del Cu T1 con puente de hidrógeno y optimizado sin restricciones proteicas (*Libre*). La última columna contiene la diferencia entre los parámetros del modelo *Nativa* y los parámetros del modelo *Mutante*.

En términos generales puede decirse que los ángulos y el ángulo diedro C<sub>Cis</sub>-S-Cu-N<sub>ImB</sub> del sitio de Cu T1 quedan sin perturbaciones cuando se relaja la estructura cristalográfica en su forma nativa o mutada. Esto también sucede cuando se realizan



optimizaciones sin la presencia del entorno proteico. Si comparamos las distancias Cu–ligante, podemos observar variaciones mayores a 0.1 Å con respecto a la estructura cristalográfica sólo en el caso del modelo *Nativa*. Este resultado se explica al considerar que en la estructura cristalizada de Fet3 (1ZPU), los átomos de cobre se encuentran en estado reducido (Cu I). Idealmente se compararían las estructuras optimizadas con estructuras cristalográficas en el mismo estado de oxidación; sin embargo, actualmente no se encuentran reportadas estructuras de Fet3 con los átomos de cobre oxidados, por lo que es de esperarse que las distancias cristalográficas Cu–ligante resulten más grandes que las del modelo optimizado. La discrepancia de la distancia Cu–ligante del modelo *Nativa* con los modelos pequeños se explica señalando la ausencia de restricciones proteicas en los últimos, mientras que la diferencia con el modelo *Mutante* es debida a la perturbación de la red de puentes de hidrógeno alrededor del sitio de Cu T1.

La diferencia más importante de los parámetros geométricos analizados es la distancia azufre–nitrógeno de amida (S–N<sub>amida</sub>). La distancia entre estos dos heteroátomos, en un puente de hidrógeno sin perturbaciones debidas a la coordinación del azufre con cobre, es de 3.19 Å como se muestra en el modelo *Tiolato*. Esta distancia es elongada 0.6 Å en el modelo *Libre* cuando el puente de hidrógeno amida–tiolato se encuentra influenciado por la coordinación del sitio de Cu T1 optimizado libremente. Cuando se considera el modelo *Nativa*, podemos observar que la elongación se reduce a 0.5 Å. Es importante señalar que en la optimización del modelo *Libre* se generó un desplazamiento de la amida con respecto al modelo *Nativa*, evaluado mediante el ángulo diedro N<sub>Amida</sub>–S–Cu–N<sub>ImB</sub> con una diferencia de 75° e ilustrado en la figura 26.

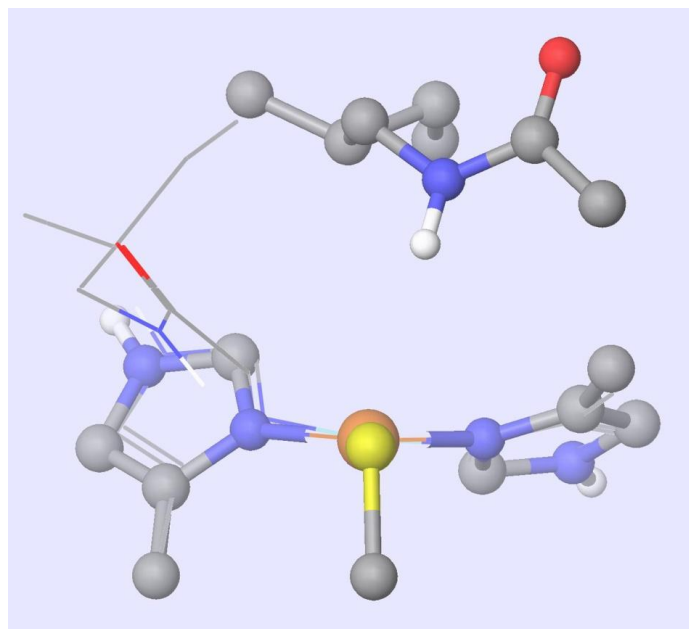


Figura 26. Sobreposición de los modelos Libre y Nativa para ilustrar las diferentes orientaciones de la amida con respecto al sitio de Cu T1. Modelo Libre representado por esferas y tubos, modelo Nativa representado por líneas.

La elongación producida en el caso del modelo *Nativa* es forzada por la red de puentes de hidrógeno alrededor del sitio de Cu T1. Cuando esta red de puentes de hidrógeno es perturbada por la mutación H483Q, la distancia S–N<sub>amida</sub> decrece de 3.69 a 3.33Å, indicando que las restricciones impuestas por la proteína disminuyen debido a la eliminación del puente de hidrógeno del residuo H483 con la cadena principal. Esto nos muestra que tanto la distancia S–N<sub>amida</sub>, como la posición relativa de la amida con respecto al sitio de Cu T1 están forzadas por la red de puentes alrededor del sitio de Cu T1.

Una vez establecidas las diferencias geométricas de los modelos, podemos hablar de las variaciones en la energía de interacción del puente de hidrógeno que presentan los modelos estudiados, dependiendo de las tensiones geométricas. Las energías de interacción calculadas fueron corregidas al considerar el error de superposición de base (BSSE), estimado mediante el protocolo de counterpoise. Los valores de energía de interacción fueron de -23.7 kcal/mol para el modelo *Tiolato*; de -0.8 kcal/mol para el modelo *Libre*; de 14.2 kcal/mol para el modelo *Nativo* y de 13.6 kcal/mol para el modelo *Mutante*. Comparativamente se puede observar que la interacción de puente de hidrógeno entre el tiolato y la amida en ausencia de cobre es bastante fuerte, superando por varias kcal/mol los valores típicos de puente de hidrógeno (entre -1 y -7 kcal/mol).

Cuando se perturba al átomo aceptor del puente de hidrógeno, que en este caso es el azufre, mediante la coordinación con cobre en el contexto del sitio de Cu T1, se observa una gran disminución de la energía de interacción. Esto deja a la interacción de puente de hidrógeno en el modelo *Libre* como una interacción extremadamente débil, menor a 1 kcal/mol.

Al analizar los valores de la interacción en los modelos *Nativa* y *Mutante*, podemos apreciar la gran cantidad de energía invertida por la proteína para colocar el sitio de Cu T1 y el puente de hidrógeno dentro de su estructura terciaria. De no ser por la red de puentes de hidrógeno alrededor del sitio de Cu T1, la amida donadora del puente de hidrógeno no tendría esa disposición en el espacio con respecto al sitio de Cu T1. Puede observarse también que ante la perturbación en la red de puentes de hidrógeno inducida por la mutación, existe un reacomodo de la interacción amida–tiolato, donde se disminuye la distancia S–N<sub>amida</sub> y decrece ligeramente la energía de interacción positiva. Aunque el cambio en la energía de interacción ante la mutación es pequeño, cambios significativos en el E° y la estructura electrónica son observados, como se muestra a continuación.

Uno de los factores para la selección de la proteína Fet3 como modelo de trabajo fue la existencia de E° determinados experimentalmente, tanto para la proteína nativa como para la mutante H483Q. Los potenciales experimentales de estas dos proteínas, así como los determinados a diferentes niveles de teoría, se muestran en la tabla 7.

		Nativa	Mutante	Nat-Mut ( $\Delta E^\circ$ )
Experimentales*		0.434	0.408	0.026
Completo	ONIOM	2.100	0.212	1.888
	PM6	2.915	0.856	2.059
Cu T1 c/amida	PM6	2.155	2.257	-0.202
	PBE0	1.339	1.713	-0.374

Tabla 7. Potenciales redox (en Volts) vs NHE de dos modelos de la proteína Fet3 a diferentes niveles de teoría. El modelo completo se detalla en la sección 4.c.ii y comprende ~700 átomos alrededor del sitio Cu T1. El modelo “Cu T1 c/amida” incluye sólo los átomos tratados con el nivel alto de teoría en las optimizaciones QM/QM. La columna “Nat-Mut” indica la resta de los valores de la columna “Nativa” menos los valores de la columna “Mutante”. \*Valores experimentales de las proteínas completas.

Estos valores de  $E^\circ$  fueron estimados mediante las energías electrónicas extraídas de los cálculos de ONIOM. En el protocolo descrito para el cálculo de  $E^\circ$  en la sección 4.c.i se señala que las simplificaciones utilizadas incluyen la eliminación de las energías de solvatación ( $\Delta\Delta G_{\text{Solv}}$ ). Esto implica que los valores absolutos de  $E^\circ$  no podrían ser obtenidos mediante esta metodología y no podrán realizarse comparaciones directas con los datos experimentales. Sin embargo, también se aclara en la misma sección que todos los valores de  $E^\circ$  calculados serían relativos y comparables entre sí permitiendo que las diferencias entre los datos calculados si puedan ser comparadas con datos experimentales. Por esta razón podemos centrar nuestra atención en la última columna de la tabla 7. En ella se realiza la substracción del  $E^\circ$  de la proteína mutante al  $E^\circ$  de la proteína nativa para obtener la diferencia de potencial entre las proteínas ( $\Delta E^\circ$ ).

En esta comparación podemos observar que ninguno de los niveles de teoría considerados se acerca en magnitud a la diferencia de los valores experimentales. Aunque este resultado indica que el modelo utilizado no es suficiente en cuanto al número de aminoácidos alrededor del sitio Cu T1 para reproducir las tendencias experimentales, podemos extraer información valiosa que explica cómo son afectados los factores que determinan el  $E^\circ$  de la proteína.

Para el caso de los modelos “Cu T1 c/amida” argumentamos que los cambios inducidos por la mutación H483Q a nivel del sitio de Cu T1 efectivamente aumentan el  $E^\circ$  debido a la disminución de la distancia S–N<sub>amida</sub>. Lo anterior está en contraposición con lo observado experimentalmente, donde existe una ligera disminución de  $E^\circ$  a causa de la mutación. Para sustentar este dato tenemos la validación redox realizada con complejos mímicos de Cu T1 realizada en la sección 5.a.ii . La validación indica que el error máximo encontrado para la serie de complejos de cobre, utilizando el nivel PBE0/LACVP\*\*, es de 0.150 V y el error promedio es de 0.100 V. Las diferencias en la columna “Nat-Mut” de la tabla 7 entre el valor experimental y el valor calculado con PBE0 es de 0.4 V, que supera ampliamente el error promedio y el error máximo estimados para la metodología utilizada. Esto nos indica que las desviaciones de 0.4 V

no son causadas por errores de la metodología sino por un factor externo que las modifica.

Para reconciliar estos datos, aparentemente contradictorios, invocaremos la naturaleza multifactorial del E° en proteínas mediante los cinco factores que lo modulan, y que fueron descritos en la sección 2.a. Uno de ellos señala a los efectos electrostáticos, entendidos como cambios en los momentos de la distribución de carga de 0 y 1<sup>er</sup> orden, como moduladores del E° de sitios activos dentro de proteínas. Existen cambios importantes en estos momentos de distribución de carga como consecuencia de la mutación H483Q de la proteína Fet3 y estos son detallados en la tabla 8 y la figura 27.

		Nativa				Mutante			
Cargas	Oxidado	+2				+1			
	Reducido	+1				0			
		X	Y	Z	<b>Total</b>	X	Y	Z	<b>Total</b>
Momento Dipolar	Oxidado	53.2	-0.2	9.1	<b>54.0</b>	57.2	30.1	3.9	<b>64.7</b>

Tabla 8. Valores de carga total y momento dipolar de los modelos Nativa y Mutante QM/QM involucrados en el cálculo de E°. Los momentos dipolares (en Debyes) se presentan con su componentes en X, Y y Z. Todas los modelos fueron centrados en el átomo de azufre del Cu T1 y orientados en la misma dirección.

El primer cambio es la variación en la carga total de los modelos (momento de distribución de carga de orden cero). Mientras que en el modelo de ~700 átomos de la proteína Nativa (**Nativa**) el proceso redox es de un dicación que se reduce a un monocación, en el modelo de la mutante H483Q (**Mutante**) es reducido de monocación a molécula neutra. Esto es debido a la variación de carga en el cúmulo T2-T3. En la proteína nativa, el cúmulo T2-T3 contiene tres cationes de Cu (II) y dos hidroxilos que los coordinan para una carga neta de +4 cerca del sitio Cu T1. En el caso de la mutante H483Q, sólo se cuenta con tres cationes de Cu (I) y ningún hidroxilo, para una carga neta de +3.

En el caso del primer momento de distribución de carga (momento dipolar,  $\mu$ ), la comparación adecuada de varios  $\mu$  debe ser entre  $\mu$  calculados en un mismo punto. En nuestro caso ese punto fue el origen, ubicado en el átomo de azufre del sitio de Cu T1 para ambos modelos. Tanto el cambio en la carga del cúmulo T2-T3 como la perturbación de la red de puentes de hidrógeno generan un cambio en  $\mu$ , principalmente en la componente Y, donde la componente del modelo **Mutante** es de 30 Debyes, disminuyendo a 0 Debyes en el modelo **Nativa**. El efecto neto en  $\mu$  total es un cambio en la orientación y un aumento de 11.5 Debyes cuando se pasa del modelo **Nativa** al modelo **Mutante**. La orientación de estos  $\mu$  sobre los planos XY y XZ queda ilustrada en la figura 27.

Estos cambios en  $\mu$  y la carga de los modelos completos están relacionados con una gran variación en el  $\Delta E^\circ$  (ver tabla 7) del orden de ~ 2 V. Puesto que ambos factores

son evaluados al mismo tiempo no es posible determinar cuál es la participación de cada uno de ellos. Sin embargo es posible dar una interpretación de cómo afectan al  $E^\circ$  de ambos modelos.

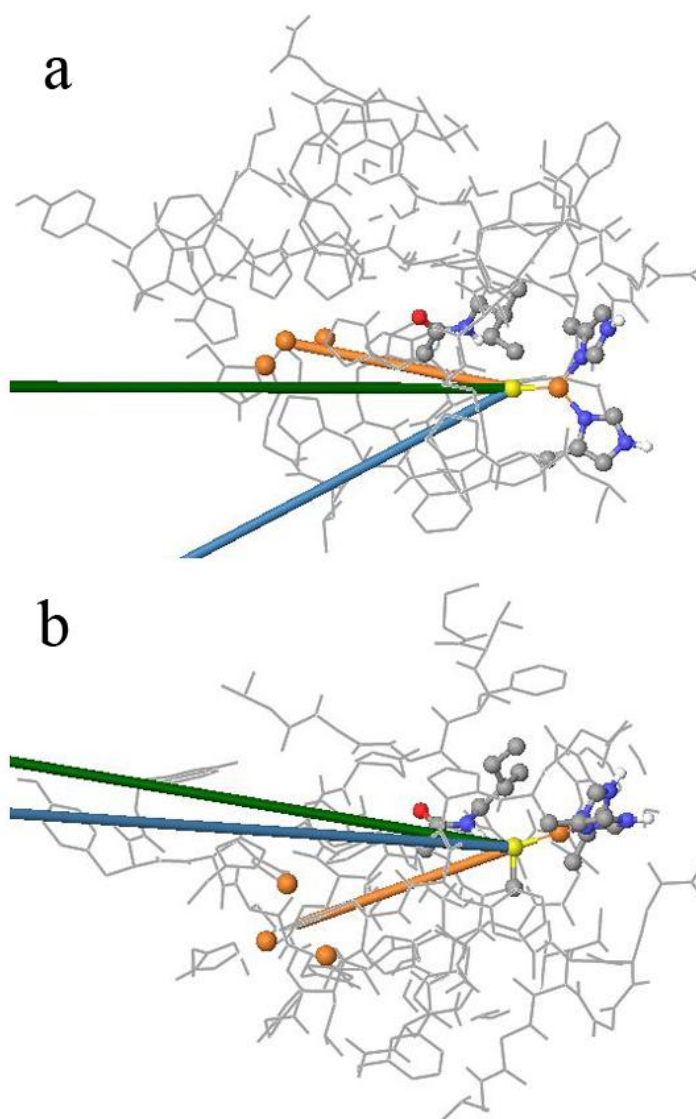


Figura 27. Proyección de los momentos dipolares de los modelos “Nativa” (en verde) y “Mutante” (en azul claro) de la proteína Fet3 en dos orientaciones, a: orientación sobre el plano XY; b: orientación sobre el plano XZ. El sitio Cu T1 aparece representado mediante esferas y tubos, los átomos de cobre del sitio T2-T3 aparecen como esferas naranjas y en líneas grises aparece el resto del modelo. El eje que conecta el centro del cúmulo T2-T3 con el origen se presenta en naranja.

En la figura 27 se presenta el eje que conecta el centro del cúmulo T2-T3 con el átomo de azufre del sitio Cu T1 (eje T1/T2-T3). La carga del cúmulo T2-T3 desestabiliza al sitio de Cu T1, y este efecto es acentuado o atenuado debido a la orientación de  $\mu$ . De esta manera, aquel  $\mu$  que tenga la orientación más cercana al eje T1/T2-T3 favorecerá la desestabilización del sitio Cu T1 en mayor medida. Para poder identificar cual  $\mu$  tiene la mejor orientación se midió el ángulo generado entre el eje T1/T2-T3 y cada  $\mu$ . Para el

modelo **Nativa** se obtuvo un valor de 31° mientras que para el modelo **Mutante** el valor fue de 45° indicando que el efecto de la polarización de la carga originada por el cúmulo T2-T3 será transmitido con menor eficiencia en el caso del modelo **Mutante**.

Con respecto a la variación en la carga de los modelos involucrados en el proceso redox (ver tabla 8), es claro que existirá una carga negativa extra en el modelo **Mutante** en comparación con el modelo **Nativa**. También es claro por los resultados presentados en la tabla 7 que esta carga extra disminuye significativamente el E° del modelo **Mutante**. Para explicar como sucede este proceso recurriremos a las cargas atómicas del sitio de Cu T1 determinadas mediante el esquema de Mulliken [85] en los cálculos QM/QM. Estas cargas serán agrupadas en 5 fragmentos que pueden identificarse como los componentes del sitio de Cu T1: catión de cobre, tiolato, dos anillos de imidazol y amida en la segunda esfera de coordinación. Para establecer una comparación adecuada se tomaron en cuenta sólo aquellos átomos del sitio Cu T1 no involucrados en la unión entre las dos capas de teoría. Por esta razón el valor total de la carga no es +1 (valor de la carga para el modelo de Cu T1). Ver tabla 9.

	Cu T1 c/amida (Capa alta)				Completo (Capa baja)	
	DFT		PM6		Completo PM6	
	Nativa	Mutante	Nativa	Mutante	Nativa	Mutante
Cobre	0.46	0.41	0.74	0.60	1.09	0.55
Tiolato	-0.07	-0.06	-0.14	0.03	-0.70	-0.75
imidazol A	0.18	0.19	0.08	0.06	0.16	0.03
Imidazol B	0.20	0.20	0.08	0.07	0.17	0.04
Amida	-0.20	-0.17	-0.17	-0.18	-0.20	-0.23
<b>Total</b>	<b>0.57</b>	<b>0.57</b>	<b>0.59</b>	<b>0.58</b>	<b>0.52</b>	<b>-0.36</b>

Tabla 9. Cargas de atómicas determinadas bajo el esquema de Mulliken para las capas alta (Cu T1 c/amida) y baja (Completo) del cálculo QM/QM de los modelos “Nativa” y “Mutante” en estado oxidado. Los valores han sido agrupados en los 5 componentes que integran el sitio Cu T1.

Puede observarse en la tabla 9 que la carga total es la misma para la capa alta de los modelos **Nativa** y **Mutante** independientemente del nivel de teoría empleado. Esto nos indica que el valor ~0.58 será nuestro valor de referencia, ya que es asociada a un sitio Cu T1 sin perturbaciones por efectos electrostáticos. Cuando analizamos las cargas de los modelos **Nativa** y **Mutante** de la capa baja, que es donde actúan los efectos electrostáticos descritos anteriormente, observamos que la carga total del modelo **Nativa** para el sitio Cu T1 es ligeramente menor, disminuida en 0.06 unidades de carga. Otro cambio importante en este modelo es la variación de carga de cada uno de los componentes. Como ejemplo tenemos el cambio en la carga del catión cobre de 0.35 unidades de carga con respecto al valor calculado con PM6 para la capa alta. Esto nos indica que aunque el valor de carga total es muy parecido, existe una mayor polarización de carga entre los fragmentos asignados en este sitio de Cu T1. En lo que respecta al modelo **Mutante**, la carga total disminuye 0.94 unidades de carga, indicando

que este sitio de Cu T1 tiene un exceso de densidad electrónica en comparación con todos los otros estimados en la tabla 9. Esta es la razón por la cual el  $E^\circ$  estimado para el modelo **Mutante** es mucho menor que los otros  $E^\circ$  estimados.

Los análisis de orientación del momento dipolar y cambio de carga total en los modelos implican que la proteína ejerce un papel preponderante en la determinación del  $E^\circ$  y que este efecto va más allá de la segunda esfera de coordinación del sitio de Cu T1. En la proteína real existen cargas negativas alrededor del cúmulo T2-T3 que estabilizan el exceso de cargas positivas en el cúmulo T2-T3. Estos y otros residuos cargados, al igual que la gran mayoría de los dipolos ordenados de la proteína, quedaron fuera de los modelos por lo que proponemos que los efectos electrostáticos no fueron evaluados de manera correcta con estos modelos. No fue posible realizar cálculos con modelos que incluyeran más átomos de la proteína debido a la limitación de recursos computacionales.

Con estos datos se puede establecer que los efectos electrostáticos generan una disminución de  $E^\circ$  en la proteína mutante y que este efecto es contrario al aumento de  $E^\circ$  generado por el puente de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación cuando disminuye la distancia S-N<sub>amida</sub>. La razón por la cual no se reprodujo la diferencia Nat-Mut de los datos experimentales en la tabla 7 fue que, de los dos factores analizados que influyen  $E^\circ$ , los efectos electrostáticos no fueron evaluados adecuadamente debido a la limitación del modelo.

Una vez establecido que el puente de hidrógeno amida-tiolato afecta sensiblemente el  $E^\circ$ , discutiremos por qué ocurre este aumento con base en un estudio de poblaciones electrónicas con el algoritmo de NBO. Para ello es necesario hacer primero un análisis geométrico de la orientación de los orbitales  $p$  de valencia del azufre en el contexto del sitio Cu T1.

La aproximación más aceptada (sustentada mediante datos espectroscópicos [19]), indica que el orbital  $p_z$  del azufre se encuentra sobre el eje descrito por el enlace C-S de la cisteína coordinada al cobre. Asumiendo que existe una interacción  $\pi$  con el catión de cobre mediante el orbital  $3d_{x^2-y^2}$  [18,19] podemos asignar la orientación del orbital  $p_y$  como ortogonal a las rectas descritas por los enlaces C-S y Cu-S. De esta manera se asigna el tercer orbital  $p_x$  como ortogonal a los dos anteriores, definiéndose un sistema de tres ejes, como se muestra en la figura 28.

La interacción del orbital  $p_x$  del azufre con el catión de cobre se denomina pseudo- $\sigma$  [19] debido a que el ángulo C-Cu-S es mayor a  $90^\circ$ , en este caso es de  $112^\circ$ . Otra forma de medir esta desviación para la interacción con el orbital  $p_x$  es mediante el ángulo formado por la recta S-Cu y el eje X definido en la figura 28, cuyo valor es de  $158^\circ$ . De esta manera, si el ángulo entre la línea de enlace y alguno de los ejes se aproxima a  $180^\circ$ , el traslape con el orbital que ocupe ese eje será mayor.

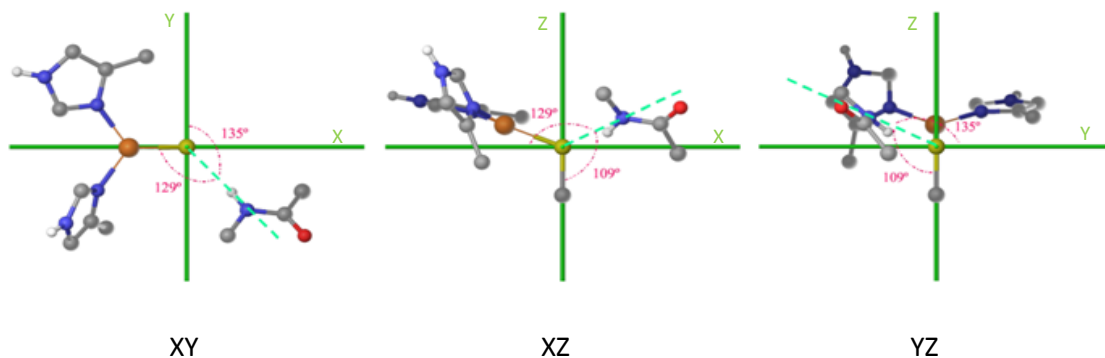


Figura 28. Orientación de los ejes X Y y Z partiendo del átomo de azufre de la cisteína coordinada al catión cobre en el sitio Cu T1 de la estructura cristalográfica de Fet3. Ejes en verde, línea descrita por la distancia S-N<sub>amida</sub> azul claro, ángulos de cada eje con la línea S-N<sub>amida</sub> en rosa. Azufre en amarillo, cobre en naranja, carbono en gris, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul.

Esta asignación nos permite analizar la interacción del puente de hidrógeno de amida con el azufre. La línea descrita por S-N<sub>amida</sub> nos indica la dirección del puente de hidrógeno, y los ángulos con cada eje indican qué tan bueno es el traslape con cada orbital  $p$  en cuestión. El ángulo con el eje X es de  $129^\circ$ , con el eje Y es de  $135^\circ$  y con el eje Z es de  $109^\circ$ . De este análisis podemos concluir dos cosas: la primera es que no hay un orbital  $p$  orientado hacia el puente de hidrógeno y, por lo tanto, no hay un par electrónico que interaccione con la amida. La segunda es que, el orbital atómico requerido para formar el puente de hidrógeno en la conformación geométrica de la proteína tiene un mayor carácter de orbital  $p_y$ , en segundo término de orbital  $p_x$  y en menor grado de orbital  $p_z$ , si consideramos solamente la geometría. Esto indica que cuando la proteína orienta el puente de hidrógeno en esa dirección, ocasiona que de los electrones en orbitales de valencia del azufre, lo orbitales  $p_x$  y  $p_y$  sean los más, mismos que realizan la interacción con el cobre, y por tanto disminuirá la transferencia de carga  $S \rightarrow Cu$ .

Con este análisis sólo hemos establecido el comportamiento esperado de los orbitales con respecto a la orientación geométrica de los grupos en la estructura cristalográfica de Fet3. La ponderación de los efectos electrónicos que tienen el cobre y el carbono sobre la densidad del azufre queda cuantificada mediante un análisis NBO, y se encuentra explicado en extenso en la sección 8. A continuación se detalla un resumen de este análisis.

Se utilizaron nuevamente los modelos *Tiolato*, *Cu T1*, *Libre*, *Nativa* y *Mutante* descritos previamente, obteniendo las poblaciones electrónicas para los orbitales naturales atómicos (NAO) de la capa de valencia del azufre. Cada uno de estos NAOs fue relacionado a un orbital natural de enlace (NBO) con base en su participación en cada uno de ellos y se muestran en la tabla 10.



	NBO	Tipo de orbital
<b>S</b>	BD ( 1) C - S *	$3p_z$
	LP(1) S*	$3s$
	LP(2) S*	$3p_x$
	LP(3) S	$3p_y$
<b>Cu</b>	LP(1) Cu	$3d_{z^2}$
	LP(2) Cu	$3d_{xz}$
	LP(3) Cu	$3d_{yz}$
	LP(4) Cu	$3d_{xy}$
	LP(5) Cu	$3d_{x^2-y^2}$
	LP(6) Cu	$4s$

Tabla 10. Clasificación de los de los orbitales naturales de enlace (NBO) de valencia de los átomos de azufre (S) y cobre (Cu). BD señala a un NBO de enlace entre dos átomos y LP indica pares libres asociados a un átomo. \*NBOs con participación de tres NAOs

Del análisis de NBO, en la mayoría de los casos existe una proporción mayoritaria superior al 97% de participación de un sólo NAO; es decir, no existe hibridación relevante con otros NAOs. Sólo los tres primeros casos difieren en este comportamiento y presentan una hibridación de tres NAOs en cada uno de ellos. Estos NAOs son  $3s$ ,  $3p_x$  y  $3p_z$ , y cada uno contribuye mayoritariamente a un NBO específico (como se muestra en la tabla 10). Es importante resaltar que en ninguno de los casos existe participación relevante del NAO  $3p_y$  y que esta forma de hibridación es muy similar a  $sp^2$ , independiente del puente de hidrógeno de amida-tiolato.

Los NBOs  $LP(2)S$ ,  $LP(3)S$ ,  $LP(4)Cu$  y  $LP(5)Cu$  permiten relacionar la orientación de los NBOs con las interacciones de transferencia de carga ligante-metal (LMCT)  $\pi$  y pseudo- $\sigma$  entre el cobre y el azufre (ver sección 2.b). Aquel NBO dominado por los NAO  $3p_y$  ó  $3d_{x^2-y^2}$  tienen un nodo en el eje Cu-S y, por lo tanto, cuentan con una simetría adecuada para una interacción  $\pi$ ; mientras que los NAO dominados por  $3p_x$  ó  $3d_{xy}$  tienen un lóbulo orientado sobre el eje Cu-S, por lo que son aptos para la interacción pseudo- $\sigma$ .

El argumento anterior es sustentado mediante el análisis de perturbación a segundo orden, incluido en el cálculo de NBO y resumido en la tabla 11. Este análisis estima la estabilización que puede generarse cuando un NBO ocupado interactúa con un NBO desocupado. Esta es la manera que tiene el algoritmo de NBO para representar la deslocalización de pares electrónicos, como por ejemplo en el caso de la aromaticidad.

NBO Donador	NBO Aceptor	Tiolato	Cu T1	Libre	Nativa	Mutante
BD(1) C-S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	0.2				
LP(1) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	1.2			0.6	3.7
LP(2) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	17.9		0.2	0.2	0.5
LP(3) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H			0.2	0.8	1.8
LP(5)Cu	LP(3) S		28.6		24.8	23.5
LP(4)Cu	LP(2) S			90.6		
LP(2) S	LP(6)Cu		109.0		96.7	75.8
LP(1) S	LP(6)Cu			26.6		

Tabla 11. Estabilización de orbitales naturales de enlace (NBOs) mediante el análisis de perturbación a segundo orden. “NBO Donador” representa al NBO que dona densidad de carga para estabilizar determinado NBO. “NBO Aceptor” representa al NBO que acepta la carga para ser estabilizado. Todos los valores se encuentran en kcal/mol. El símbolo \* denota carácter de antienlace del NBO.

En el caso de puentes de hidrógeno, esta deslocalización se refiere al par electrónico que dona densidad electrónica al orbital de antienlace heteroátomo-hidrógeno. Para el sistema amida-tiolato, se espera que algún LP de azufre done densidad hacia el orbital de antienlace (BD\*) N-H. Esta forma de interacción queda ejemplificada en la columna del modelo *Tiolato* de la tabla 11. De los tres pares libres del tiolato, el NBO *LP(2)S* dominado por el NAO  $3p_x$  induce la mayor estabilización hacia el NBO de antienlace *BD\* N<sub>amida</sub>-H*, con una magnitud de 18 kcal/mol. También existe una estabilización menor del NBO *BD\* N<sub>amida</sub>-H* por parte de *LP(1)S* y *BD(1)C-S*. Como hemos establecido anteriormente, los tres NBOs que donan densidad al orbital de antienlace se encuentran relacionados, debido a la hibridación tipo  $sp^2$  que ocurre en el átomo de azufre, por lo que consideraremos las contribuciones minoritarias de los NBOs *LP(1)S* y *BD(1)C-S* para obtener un valor global de 19.3 kcal/mol, correspondiente a las tres interacciones. Este valor nos indica que la componente covalente domina esta interacción en particular, puesto que de las 24 kcal/mol de la interacción 19.3 corresponden a una interacción covalente [34].

Este valor de estabilización, obtenido para un modelo donde no existe coordinación entre azufre y cobre, servirá como valor de referencia, estableciendo el máximo de estabilización que se puede alcanzar por el puente de hidrógeno amida-tiolato.

Para el caso de las transferencias de carga LMCT también es posible observar estabilizaciones determinadas por el análisis de perturbación a segundo orden. En este caso, el modelo *Cu T1* servirá como punto de referencia puesto que contiene un azufre coordinado a cobre, sin la perturbación de puentes de hidrógeno. En el modelo se presentan dos perturbaciones importantes, la primera entre el NBO *LP(5)Cu* dominado por el NAO  $3d_{x^2-y^2}$  de cobre y el NBO *LP(3)S* dominado por el NAO  $3p_y$  del azufre. Esta

interacción representa la típica interacción  $\pi$  cobre–azufre responsable de las propiedades espectroscópicas del sitio de Cu T1.

La segunda interacción LMCT identificada es entre el NBO  $LP(2)S$ , dominado por el NAO  $3p_x$  de azufre y el NBO  $LP(6)Cu$  dominado por el NAO  $4s$  del cobre. Esta interacción es significativa (109 kcal/mol) y tiene carácter pseudo- $\sigma$ . Curiosamente, el orbital del cobre involucrado en esta interacción es de carácter  $s$  y no  $d$  como varios autores han sugerido [18, 19].

Con los valores de referencia establecidos mediante los modelos *Tiolato* y *Cu T1*, procederemos al análisis de los modelos *Nativa* y *Mutante*. Puede observarse en la tabla 11 que el puente de hidrógeno amida-tiolato en el modelo *Nativa* no es estabilizado significativamente. La suma de la estabilización generada por los tres NBOs del azufre (dominados por los NAOs  $3p_x$ ,  $3s$  y  $3p_y$ ) hacia el orbital de antienlace es apenas de 1.6 kcal/mol, indicando que la contribución covalente en este puente de hidrógeno es muy pequeña. Este fenómeno es observado para los sistemas biológicos amida-tiolato-hierro acompañado por una disminución de la covalencia azufre-hierro [32]. Para el modelo *Nativa* también ocurre una disminución de los procesos LMCT  $\pi$  y pseudo- $\sigma$ . En el caso de la interacción  $\pi$ , disminuye la energía de estabilización en 3.8 kcal/mol, mientras que la interacción pseudo- $\sigma$  disminuye en 12.3 kcal/mol; lo que indica que el puente de hidrógeno amida-tiolato, aunque no es estabilizado significativamente, sí perturba la covalencia cobre-azufre.

Como habíamos establecido anteriormente, el puente de hidrógeno amida-tiolato no está orientado hacia ninguno de los pares libres del azufre. Esto se ve reflejado en el hecho de que tres NBOs ( $3p_x$ ,  $3s$  y  $3p_y$ ) estabilizan al orbital de antienlace de amida. También puede apreciarse que la interacción pseudo- $\sigma$  es la que sufre mayormente la influencia del puente de hidrógeno, originando una disminución en la covalencia cobre-azufre.

Si contrastamos estos resultados con los obtenidos para el modelo *Mutante*, podemos observar un mayor impacto del puente de hidrógeno sobre el átomo de azufre. En primer lugar existe una mayor estabilización (de 6 kcal/mol) hacia el orbital de antienlace de amida por parte de los mismos tres NBOs del azufre. Esto implica un aumento en la componente covalente de la interacción amida-tiolato, ocasionando una gran disminución en las interacciones LMCT cobre-azufre. La interacción  $\pi$  del modelo *Mutante* disminuye su estabilización por 5.1 kcal/mol en comparación con el modelo *Cu T1*, mientras que la interacción pseudo- $\sigma$  lo hace por 33 kcal/mol. Esto reduce sensiblemente la covalencia cobre-azufre, dejando un catión Cu (II) con menor población electrónica para estabilizarlo y por lo tanto es de esperarse un aumento en el  $E^\circ$  (como se observa en la tabla 7).

Resumiendo el análisis para los modelos *Nativa* y *Mutante*, podemos afirmar que la interacción amida-tiolato es poco covalente, pero aumenta su covalencia con la mutación H483Q. El puente de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación disminuye la covalencia cobre-azufre, perturbando principalmente la interacción

pseudo- $\sigma$  entre ellos, y la interacción pseudo- $\sigma$  cobre-azufre descrita en estos modelos tiene carácter  $4s$  de cobre y  $3p_x$  de azufre.

Por último analizaremos al modelo *Libre* que, como fue indicado anteriormente, sufre un rearrreglo de la densidad electrónica sobre el azufre. Una estabilización de 0.4 kcal/mol para el orbital de antienlace de amida por parte de dos NBOs indica una casi nula interacción covalente amida-tiolato. Por otro lado, las dos LMCT observadas en este modelo son diferentes a las de los modelos anteriores. La primera tiene lugar entre el NBO  $LP(4)Cu$  con carácter  $3d_{xy}$  y el  $LP(2)S$  con carácter  $3p_x$  para generar una interacción pseudo- $\sigma$ . A diferencia de la interacción pseudo- $\sigma$  descrita anteriormente, esta interacción sí cuenta con participación de un orbital  $d$  del cobre. La segunda interacción LMCT ocurre entre el NBO  $LP(1)S$ , con carácter  $3s$  y el  $LP(6)Cu$  de carácter  $4s$ , indicando que no existe interacción  $\pi$  en este complejo. Estos resultados muestran que ante la ausencia de restricciones proteicas, el puente de hidrógeno amida-tiolato orientaría la densidad electrónica del azufre de tal manera que impediría la interacción  $\pi$  cobre-azufre.

Como el fin último de este trabajo es encontrar modificaciones que aumenten el  $E^\circ$  en complejos de cobre, podemos señalar al puente de hidrógeno amida-tiolato como una variable adecuada para estos fines. Las características idóneas de este puente de hidrógeno son: una disposición que permita la interacción  $\pi$  cobre-azufre y una distancia  $S-N_{amida}$  cercana a 3.36 Å.

Los efectos electrostáticos fueron otro factor analizado en esta sección, y se estableció que la disminución de cargas positivas a  $\sim 13$  Å del sitio de Cu T1 disminuye el  $E^\circ$  por efecto de la menor carga del Cu T1 en el estado oxidado. Para rescatar este efecto a favor de un aumento de  $E^\circ$ , se propone la incorporación de cargas positivas en los complejos de cobre para aumentar la desestabilización de estado oxidado como se detalla en la siguiente sección.

#### *d. Modelos finales*

Con todos los datos recabados en las secciones anteriores, es posible proponer escenarios donde se pueda incrementar el  $E^\circ$  mediante las modificaciones estudiadas. Uno de estos escenarios es la alteración de sitios de Cu T1 de lacasas y el otro es la modificación de complejos mímicos de Cu T1.

Para la alteración de sitios de Cu T1 en lacasas se propone utilizar los resultados de las distorsiones geométricas discutidos en la sección 5.b, tomando como molde inicial a la lacasa de *T. versicolor*. De acuerdo con estos resultados, la mejor forma de aumentar el  $E^\circ$  es aproximar el ángulo diedro  $\omega$  (C-S-Cu- $N_{ImA}$ ) a  $10^\circ$ . Para trasladar íntegramente esta torsión al sitio de Cu T1, sería necesario perturbar el residuo de cisteína coordinado al Cu T1; sin embargo, este residuo participa además en la comunicación entre el Cu T1 y el cúmulo T2-T3, por lo que no es de nuestro interés perturbarlo.

Una forma equivalente para acercarse al ángulo  $\omega = 10^\circ$  es rotar los anillos de imidazol alrededor del eje Cu-S, y dejar fijo al metil-tiolato. Esto puede ser llevado a cabo en la proteína, intercambiando las posiciones de los residuos de histidina coordinados al cobre. Ver figura 29

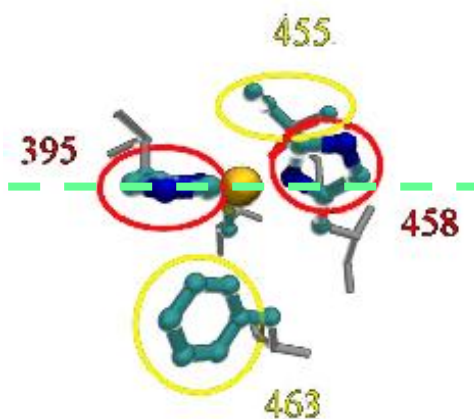


Figura 29. Sitio de Cu T1 de la lacasa de *T. versicolor*. En naranja se presenta el átomo de cobre, en círculos rojos los residuos His395 e His458 coordinados al cobre, en círculos amarillos los residuos Ile455 y Phe463, la línea punteada verde representa el plano de los ligantes del Cu T1.

Como puede observarse en la figura 29, existen cuatro residuos próximos al sitio de Cu T1: Las dos histidinas coordinadas His395 y His458; el residuo Ile455 cuya cadena lateral es alifática, por lo que no se coordina al cobre, y el residuo Phe463 cuya cadena lateral es un anillo fenilo que tampoco se coordina al cobre. El plano de los ligantes formado por los átomos S, Cu, N<sub>ImA</sub> y N<sub>ImB</sub>, está representado en la figura 29 por una línea, y nos sirve de referencia para identificar que los residuos Ile455 y Phe463 se encuentran en posición axial con respecto al plano que contiene al cobre. Estos residuos pueden ser intercambiados con los residuos de histidina coordinados al cobre para intentar obtener la torsión esperada.

De esta manera, existen 5 posibilidades para realizar estos intercambios, cuatro mutaciones dobles y una tetra-mutación:

- Ile455His y His458Ile
- Ile455His y His395Ile
- Phe463His y His458Ile
- Phe463His y His395Ile
- Ile455His, His458Ile, Phe463His y His395Ile

Se seleccionó al residuo Ile en la sustitución de todos los residuos no coordinados para evitar interacciones de apilamiento  $\pi$  de los anillos de fenilo del residuo Phe. Estas

mutaciones quedan propuestas como formas posibles de aumentar el  $E^\circ$  en la lacasa de *T. versicolor* y su exploración se realizará en trabajos posteriores.

El segundo escenario propuesto para integrar los factores estudiados es la modificación de un complejo de cobre. Se partió del modelo (**A**) descrito en la figura 6, que representa el modelo sintético más próximo al sitio de Cu T1. Se sustituyó el trifenilmetil-tiolato coordinado al cobre por difenil-metil-tiolato (**T**) como se muestra en la figura 30.

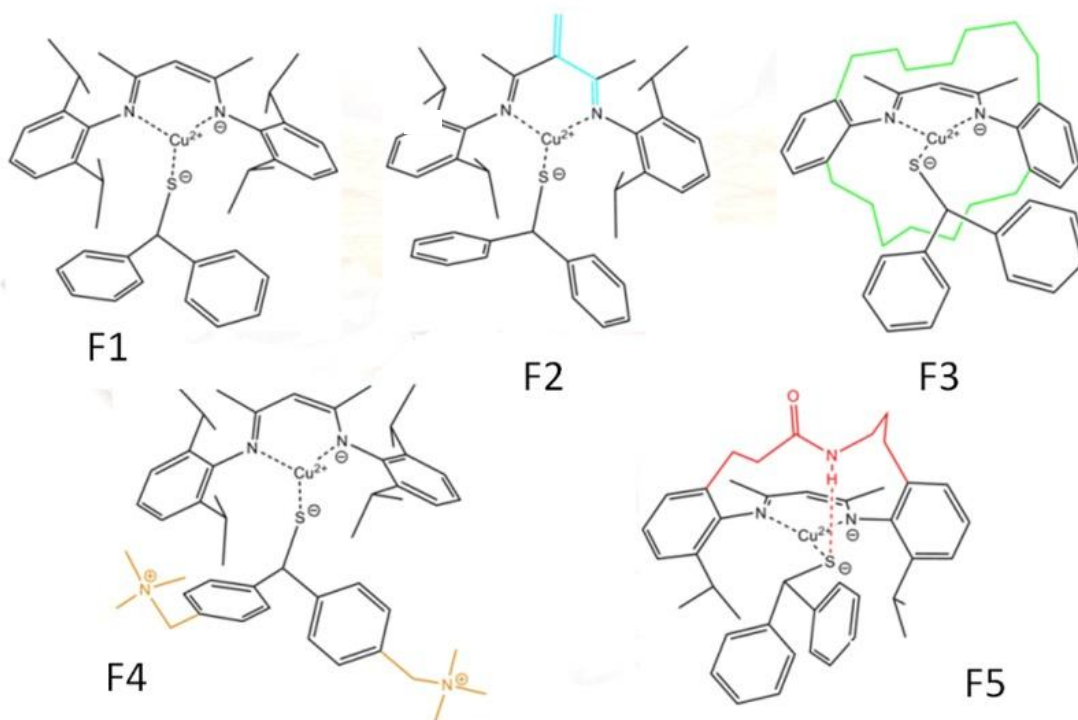


Figura 30. Modelos con modificaciones incorporadas para el aumento de  $E^\circ$ . F1-F5.

En la figura 30 quedan descritos cada uno de los modelos propuestos que modifican características del modelo original **F1**. De esta manera el modelo **F2** reduce la carga de los ligandos coordinados al cobre. Esto debido a que la carga neta que aportan los ligandos al sitio de Cu T1 es de -1 y la carga de los ligandos en el modelo **F1** es de -2. La disminución de la carga se realiza sustituyendo al ligando de carga negativa 2,4-bis(2,6-diisopropilfenilimido)pentano (**L**) por el 2-(1-(diisopropilfenilimido)-etil)-3-(diisopropilfenilimido)-1-buteno.

Para el modelo **F3** se sustituyeron los grupos isopropilos del ligando **L** por cadenas alifáticas de siete carbonos que se unen a los grupos fenilos para inducir impedimentos estéricos que impidieran al ligando **T** obtener un ángulo diedro C-S-Cu-N<sub>ImidoA</sub> cercano a  $-90^\circ$ . Este ángulo diedro es equivalente al ángulo diedro  $\omega$ , por lo que el objetivo fue acercarlo lo más posible a  $-10^\circ$ .

Para el modelo **F4** se incorporaron los grupos funcionales tetra-metil-amonio en la posición 4 de cada fenilo del ligante **L**. Esto permitió incorporar dos cargas positivas que desestabilizaran el estado oxidado del complejo. El modelo **F5** incorpora un puente de hidrógeno amida-tiolato al sustituir dos grupos isopropilos del ligante **L** por la cadena alifática -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- .

Mediante el protocolo descrito en la sección 4.a.ii, se calcularon los potenciales redox de los modelos **F1-F5**. Los valores de E° para estos complejos quedan resumidos en la tabla 12.

Modelo	Descripción	E°	Diferencia vs Original
F1	Original	-0.991	0.000
F2	Carga del ligante	0.104	1.095
F3	Ángulo diedro	-0.900	0.091
F4	Dos cationes	-0.462	0.529
F5	Puente de hidrógeno	-0.816	0.175
F6	Final	0.978	1.969

Tabla 12. Potenciales redox (E°) vs Fc/Fc<sup>+</sup> de modelos finales. La columna “Diferencia vs Original” representa la diferencia entre el E° de la fila y el E° del modelo **F1**. Valores en Volts.

Puede observarse en la tabla 12 que cada modelo propuesto aumenta el E° con respecto al E° del modelo **F1**, siendo el de menor efecto el modelo **F3** y el de mayor efecto el modelo **F2**. El poco impacto de la modificación del ángulo diedro en el modelo **F3** se debe a que en este caso el papel protagonista del tiolato como estabilizador del catión (Cu II) es disminuido por la carga del ligante **L**.

Una vez establecido que las modificaciones propuestas aumentaban el E°, se realizó la propuesta de un modelo final que incorporara todas estas modificaciones y queda descrito en la figura 31.

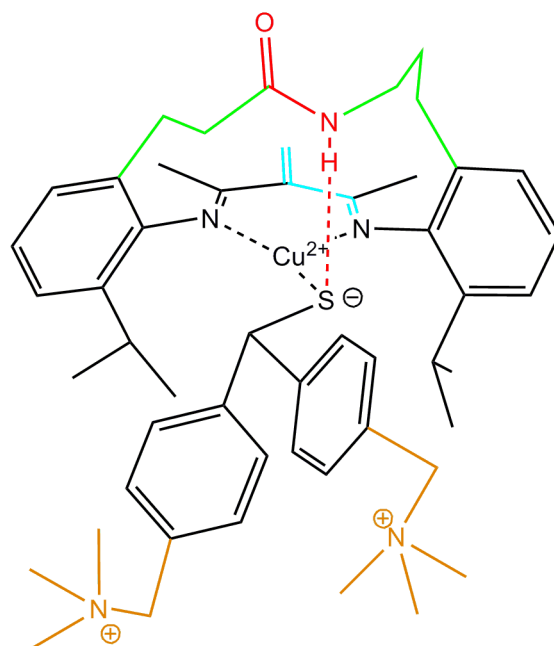


Figura 31. Modelo final **F6** para el aumento de potencial redox de complejos de cobre mímicos del sitio de Cu T1.

Este modelo tiene un  $E^\circ$  de 0.978 V y la diferencia con el modelo original es de 1.969 V. En este modelo se incorporaron distorsiones geométricas, efectos electrostáticos mediante cargas explícitas y un puente de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación para aumentar el  $E^\circ$ . Una posible ruta de síntesis está siendo explorada en estos momentos y queda como perspectiva de este trabajo.

Los anteriores resultados y su discusión nos permiten obtener las siguientes conclusiones



## 6. Conclusiones

- I. Utilizando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) se estableció que el funcional PBE0 y la base LACVP\*\*++ son adecuados y suficientes para la estimación de geometrías y de potenciales redox de complejos de cobre mímicos del sitio Cu T1.
- II. La mejor estrategia para elevar el potencial redox mediante distorsiones geométricas en la primera esfera de coordinación de sitios de Cu T1 es la restricción del ángulo diedro  $\omega$  (C-S-Cu-N<sub>ImA</sub>) ya que esta torsión genera una disminución del traslape orbital por parte de los ligantes imidazol en el orbital molecular con actividad redox.
- III. Existen dos mínimos para la primera esfera de coordinación del Cu T1, conectados por un estado de transición accesible a temperatura ambiente y asociados a interacciones de transferencia de carga ligante-metal (LMCT) diferentes:  $\pi$  o pseudo- $\sigma$ .
- IV. La identificación de una sola interacción LMCT en la lacasa de *T. versicolor* sugiere que la proteína restringe al sitio de Cu T1 para adoptar solamente la conformación uno de los mínimos.
- V. La mutación H483Q en la proteína Fet3 no perturba significativamente la primera esfera de coordinación del sitio Cu T1 pero sí lo hace en la segunda esfera mediante la modificación del puente de hidrógeno hacia el residuo de cisteína originando un aumento en el potencial redox de 0.374 Volts. Esto ocurre en contraposición con la disminución de potencial redox originada por la variación en la carga y orientación de los dipolos en la misma mutante.
- VI. Los modelos empleados para la estimación de potenciales redox de la proteína Fet3 y su mutante fueron insuficientes puesto que realizan una descripción inadecuada de los efectos electrostáticos, indicando que se requieren más de los 42 residuos alrededor del sitio de Cu T1 utilizados.
- VII. Las interacciones LMCT azufre-cobre en la proteína nativa Fet3 se efectúan entre el orbital  $3d_{x^2-y^2}$  del cobre y el orbital  $3p_y$  del azufre en el caso de la interacción  $\pi$ ; y entre el orbital  $4s$  del cobre y el orbital  $3p_x$  del azufre para la interacción pseudo- $\sigma$ .
- VIII. Ambas interacciones son perturbadas por la mutación H483Q siendo afectada principalmente la interacción pseudo- $\sigma$  y disminuyendo el grado de covalencia azufre-cobre.
- IX. La relajación de un modelo del Cu T1 con el puente de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación sin las restricciones impuestas por la proteína originan un abatimiento total de la interacción  $\pi$ , indicando que la posición del puente de hidrogeno es forzada por la proteína y es esencial para mantener esta interacción  $\pi$ .
- X. Los tres factores estudiados (electrostáticos, distorsiones geométricas en la primera esfera y puentes de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación) pueden ser modulados e incorporados en complejos de cobre o en proteínas multicobre oxidasas.
- XI. El complejo final propuesto, que incluye la manipulación de los tres factores estudiados, supera el potencial redox teórico del complejo original en ~2 Volts.

## 6. Bibliografía

1. Malkin, R.; Malmström, B. G. *Adv. Enzymol.* 1970, 33, 177-243.
2. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* 1996, 96, 2239-2314.
3. Andreini, C.; Bertini, I.; Rosato, R. *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1471-1479.
4. Palmer, A. E.; Randall, D. W.; Xu, F.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 7138-7149.
5. Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodruff, W. H.; van der Oost, J.; de Vries, S. *Biochemistry* 1994, 33, 10401-10407.
6. Malmström, B. G. *Chem. Rev.* 1990, 90, 1247-1260.
7. Farrar, J. A.; Thomson, A. J.; Cheesman, M. R.; Dooley, D. M.; Zumft, W. G. *FEBS Lett.* 1991, 294, 11-15.
8. Ghosh, S.; Gorelsky, S. I.; George, S. D.; Chan, J. M.; Cabrito, I.; Dooley, D. M.; Moura, J. J. G.; Moura, I.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 3955-3965.
9. Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin T. E. *Chem. Rev.* 1996, 96, 2563-2605.
10. Christenson, A.; Dimcheva, N.; Ferapontova, E. E.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Shleev, S.; Yaropolov, A. I.; Haltrich, D.; Thorneley, R. N. F.; Austf S. D. *Electroanalysis* 2004, 16, 1074-1088.
11. Shleev, S.V.; Morozova, O.V.; Nikitina, O.V.; Gorshina, E.S.; Rusinova, T.V.; Serezhenkov, V.A.; Burbaev, D.S.; Gazaryan, I.G.; Yaropolov A.I. *Biochimie* 2004, 86, 693-703.
12. Quintanar, L.; Stoj, C.; Taylor A. B.; Hart, P. J.; Kosman, D. J.; Solomon, E. I. *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 445-452.
13. Li, H.; Webb, S. P.; Ivanic, J.; Jensen J. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 8010-8019.
14. Malmstrom, B. G. Two forms of copper in copper-containing oxidases. In *Oxidases and related redox systems*; King, T. E., Mason, H. S., Morrison, M., Eds; Wiley: New York, 1965; Vol. 1, pp 207-216.
15. Vallee, B. I.; Williams, R. J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1968, 59,498-505.
16. Malstrom, B. G. *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 711-718.
17. Williams, R. J. P. *Eur. J. Biochem.* 1995, 234, 363-381.
18. Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; George, S. D.; Basumallick L. *Chem. Rev.* 2004, 104, 419-458.
19. Solomon, E. I.; Gorelsky, S. I.; Dey, A. *J. Comput. Chem.* 2006, 27, 1415-1428.
20. Palmer, A. E.; Szilagyi, R. K.; Cherry, J. R.; Jones, A.; Xu, F.; Solomon, E. I. *Inorg. Chem.* 2003, 42, 4006-4017.
21. Buning, C.; Canters, G.W.; Comba, P.; Dennison, C.; Jeuken, L.; Melter, M.; Sanders-Loehr, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 204-211.
22. Comba, P.; Müller, V.; Remenyi R. *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 896-902.
23. Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 37663-37669.

24. Hakulinen, N.; Kruus, K.; Koivula, A.; Rouvinen, J. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006, *350*, 929–934.
25. Rorabacher, D. B. *Chem. Rev.* 2004, *104*, 651-697.
26. Lin, J.; Gebel, E. B.; Machonkin, T. E.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 1464-1465.
27. Xia, B.; Wilkens, S. J.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, *120*, 4893-4894.
28. Okamura, T.; Iwamura, T.; Yamamoto, H.; Ueyama N. *J. Organomet. Chem.* 2007, *692*, 248–256.
29. Ueyama, N.; Nishikawa, N.; Yamada, Y.; Okamura, T.; Oka, S.; Sakurai, H.; Nakamura, A. *Inorg. Chem.* 1998, *37*, 2415-2421.
30. Ueyama, N.; Yamada, Y.; Okamura, T.; Kimura, S.; Nakamura, A. *Inorg. Chem.* 1996, *35*, 6473-6484.
31. Kato, M.; Okamura, T.; Yamamoto, H.; Ueyama N. *Inorg. Chem.* 2005, *44*, 1966-1972.
32. Dey, A.; Okamura, T.; Ueyama, N.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 12046-12053.
33. *NBO 5.0*. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, and F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison (2001)
34. Ruben, E. A.; Chapman, M. S.; Evanseck, J. D. *J. Phys. Chem. A* 2007, *111*, 10804-10814.
35. Marshall, N. M.; Garner, D. K.; Wilson, T. D.; Gao, Y.; Robinson, H.; Nilges, M. J.; Lu, Y. *Nature* 2009, *462*, 113-117.
36. Machczynski, M. C.; Gray, H. B.; Richards J. H. *J. Inorg. Biochem.* 2002, *88*, 375–380.
37. Libeu, C. A. P.; Kukimoto, M.; Nishiyama, M.; Horinouchi, S.; Adman, E. T. *Biochemistry* 1997, *36*, 13160-13179.
38. Augustine, A. J.; Kragh, M. E.; Sarangi, R.; Fujii, S.; Liboiron, B. D.; Stoj, C. S.; Kosman, D. J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon; E. I. *Biochemistry* 2008, *47*, 2036-2045.
39. Vandekamp, M.; Floris, R.; Hali, F. C.; Canters, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, *112*, 907-908.
40. Szczepaniak, K.; Wawrzyniak, U. E.; Kowalski, J.; Mames, I.; Bilewicz, R.; Kalicki, P.; Korybut-Daszkiewicz, B. *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 4491–4498.
41. Warshel, A.; Papazyan, A.; Muegge, I. *JBIC* 1997, *2*, 143–152.
42. Kamerlin, S. C. L.; Haranczyk, M.; Warshel, A. *J. Phys. Chem. B* 2009, *113*, 1253–1272.
43. Kitajima, N.; Fujisawa, K.; Tanaka, M.; Morooka, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, *114*, 9232-9233
44. Holland P. L.; Tolman, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, *121*, 7270-7271.
45. Cao, Y.; Zheng, Q.; Chen, C.; Hu, H.; Huang, Z.; *Inorg. Chim. Acta.* 2004, *357*, 316–320.

46. Karlin, K. D.; Dahlstrom, P. L.; Hyde, J. R.; Zubieta, J. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1980, 906-908.
47. Brines, L.M.; Shearer, J.; Fender, J. K.; Schweitzer, D.; Shoner, S. C.; Barnhart, D.; Kaminsky, W.; Lovell, S.; Kovacs, J. A. *Inorg. Chem.* 2007, 46, 9267-9277.
48. Holland P. L.; Tolman, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 6331-6332.
49. Jazdzewski, B. A.; Holland, P. L.; Pink, M.; Young, V. G.; Spencer, D. J. E.; Tolman, W. B.; *Inorg. Chem.* 2001, 40, 6097-6107.
50. Lee, W.; Tolman W. B. *Inorg. Chem.* 2002, 41, 5656-5658.
51. Ryde, U.; Olsson, M. H. M.; Ross, B. O.; Borin, A. C. *Theor Chem Acc* 2001, 105, 452-462.
52. Ryde, U.; Olsson, M. H. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1999, 4, 654-663.
53. Becke, A. D. *Phys. Rev. A* 1988, 38, 3098-3100.
54. Perdew, J. P.; Zunger, A. *Phys. Rev. B* 1981, 23, 5048-5079.
55. Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* 1986, 33, 8822-8824.
56. Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* (Erratum) 1986, 34, 7406.
57. Szilagy, R. K.; Metz, M.; Solomon, E. I. *J. Phys. Chem. A* 2002, 106, 2994-3007.
58. Datta, S. N.; Sudhamsu, J.; Pandey A. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 8007-8016.
59. Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* 1980, 58, 1200-1211.
60. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* 1988, 37, 785-789.
61. Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H. *Chem. Phys. Lett.* 1989, 157, 200-206.
62. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* 1996, 77, 3865-3868.
63. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.*(Erratum) 1997, 78, 1386.
64. Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* 1999, 110, 6158-6170.
65. Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Phys.* 2005, 123, 161103-161107.
66. Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. *J. Chem. Theory Comput.* 2006, 2, 364-382.
67. Hay, P.J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* 1985, 82, 299-310.
68. Jaguar, version 7.0 (2007) Schrödinger, LLC, New York, NY
69. Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D.

- Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
70. Evans, D. H. *Chem. Rev.* 2008, *108*, 2113–2144.
  71. Felton, G. A.; Vannucci, A. K.; Chen, J.; Lockett, L. T.; Okumura, N.; Petro, B. J.; Zakai, U. I.; Evans, D. H.; Glass, R. S.; Lichtenberger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 12521-12530.
  72. Dapprich, S.; Komáromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struct. (Theochem)* 1999, *462*, 1-21.
  73. Taylor, A. B.; Stoj, C. S.; Ziegler, L.; Kosman, D. J.; Hart, P. J. *PNAS* 2005, *102*, 15459–15464.
  74. Stewart, J. J. P. *J. Mol. Model.* 2007, *13*, 1173-1213
  75. Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* 1970, *19*, 553-566.
  76. Seeger, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* 1977, *66*, 3045-3050.
  77. Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* 1996, *104*, 9047-9052.
  78. Marten, B.; Kim, K.; Cortis, C.; Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Ringnalda, M. N.; Sitkoff, D.; Honig, B. *J. Phys. Chem.* 1996, *100*, 11775-11778.
  79. Tannor, D. J.; Marten, B.; Murphy, R.; Friesner, R. A.; Sitkoff, D.; Nicholls, A.; Ringnalda, M.; Goddard, W. A., III; Honig, B. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, *116*, 11875-11882.
  80. Miertuš, S.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* 1982, *65*, 239-245.
  81. Pascual-Ahuir, J. L.; Silla, E.; Tuñón, I. *J. Comp. Chem.* 1994, *15*, 1127-1138.
  82. Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. *Chem. Phys. Lett.* 1996, *255*, 327-335.
  83. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* 2005, *105*, 2999-3093.
  84. Winget, P.; Weber, E. J.; Cramer, C. J.; Truhlar D. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000, *2*, 1231-1239.
  85. Mulliken, R. S. *J. Chem. Phys.* 1955, *23*, 1833-1840.

## 8. Anexo cálculos de NBO

La ponderación de los efectos electrónicos que tienen el cobre y el carbono sobre la densidad del azufre queda cuantificada mediante un análisis NBO, y se encuentra resumida en las tablas A.1, A.2, A.3 y A.4. Se utilizaron los modelos *Tiolato*, *Cu TI*, *Libre*, *Nativa* y *Mutante* descritos en la sección 5.c, pero en esta ocasión las coordenadas cartesianas fueron reorganizadas para que todas las estructuras tengan como punto 0, 0, 0 al átomo de azufre, y los átomos de carbono del tiolato queden alineados. De esta manera todos los modelos tendrán la misma disposición en el espacio y se evitará hacer transformaciones adicionales.

NAO de valencia	Tiolato	Cu TI	Libre	Nativa	Mutante
3s	0.91	0.89	0.89	0.90	0.90
3px	0.93	0.91	0.36	0.91	0.91
3py	0.97	0.38	0.98	0.47	0.43
3pz	0.50	0.54	0.55	0.55	0.55

Tabla A.1. Ocupación de los orbitales naturales atómicos (NAO) de valencia del átomo de azufre en los modelos *Tiolato*, *Cu TI*, *Libre*, *Nativa* y *Mutante*.

Las poblaciones de los orbitales naturales atómicos (NAO) de la capa de valencia del azufre descrita en la tabla A.1 indican de donde se transfiere la densidad electrónica del azufre. Se puede apreciar que en el modelo *Tiolato*, la densidad es transferida principalmente del orbital  $p_z$  mientras que para el modelo *Libre* se transfiere de los orbitales  $p_x$  y  $p_z$ . Para el caso de los modelos *Cu TI*, *Nativa* y *Mutante*, la densidad electrónica es sustraída de los orbitales  $p_y$  y  $p_z$ . Aquí podemos señalar la primera diferencia de los modelos, y es que la densidad electrónica en el modelo *Libre* tiene una distribución diferente al resto de los modelos con cobre. Para saber hacia dónde va esa densidad electrónica es necesario revisar los orbitales naturales de enlace (NBO) y las contribuciones de segundo orden por teoría de perturbación a ellos. El análisis de perturbación a segundo orden de NBO están relacionadas con la estabilización que puede generarse cuando un NBO ocupado interactúa con un NBO desocupado. Esta es la manera que tiene el algoritmo de NBO para representar la deslocalización de pares electrónicos, como por ejemplo en el caso de la aromaticidad.

NBO	Tiolato	T1Cu	Libre	Nativa	Mutante
BD ( 1) C - S <i>3p<sub>z</sub></i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
LP(1) S <i>3s</i>	1.00	1.00	0.97	0.99	0.99
LP(2) S <i>3p<sub>x</sub></i>	0.92	0.88	0.36	0.88	0.89
LP(3) S <i>3p<sub>y</sub></i>	0.98	0.38	0.99	0.47	0.43
LP(1) Cu <i>3d<sub>z<sup>2</sup></sub></i>		1.00	1.00	1.00	1.00
LP(2) Cu <i>3d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub></i>		1.00	1.00	1.00	1.00
LP(3) Cu <i>3d<sub>yz</sub></i>		1.00	1.00	1.00	1.00
LP(4) Cu <i>3d<sub>xy</sub></i>		0.99	0.69	0.99	0.99
LP(5) Cu <i>3d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub></i>		0.71	1.00	0.66	0.71
LP(6) Cu <i>4s</i>		0.19	0.14	0.19	0.18

Tabla A.2. Ocupaciones de los orbitales naturales de enlace (NBO) de valencia de los átomos de azufre (S) y cobre (Cu). BD señala a un NBO de enlace entre dos átomos y LP indica pares libres asociados a un átomo. El orbital atómico natural (NAO) con mayor participación se señala en cursivas.

En la tabla A.2 se presentan las ocupaciones de los NBOs, relevantes para la interacción cobre–azufre. Los NBOs etiquetados como BD representan el caso idealizado donde dos átomos comparten un par de electrones, mientras que en los etiquetados LP, el par de electrones se encuentra localizado en un sólo átomo. Se presenta únicamente la parte beta, luego de aplicar el formalismo “no restringido”, por lo que la máxima ocupación es de un electrón en lugar de dos electrones.

Del análisis de NBO, en la mayoría de los casos existe una proporción mayoritaria superior al 97% de participación de un sólo NAO; es decir, no existe hibridación relevante con otros NAOs. Sólo los tres primeros casos tienen participación importante de otros NAOs, y sus porcentajes quedan descritos en la tabla A.3.

NBO			Tiolato	T1Cu	Libre	Nativa	Mutante
BD (1) C – S	Porcentajes	%s	14.9	20.2	16.6	18.5	16.8
		%p	84.5	79.2	82.8	80.9	82.6
	Coeficientes	$3s$	0.38	0.45	0.40	0.43	0.41
		$3p_x$	0.01	-0.10	0.00	-0.10	-0.08
		$3p_y$	0.00	-0.02	0.00	-0.02	-0.01
		$3p_z$	<b>-0.91</b>	<b>-0.88</b>	<b>-0.91</b>	<b>-0.89</b>	<b>-0.90</b>
LP(1) S	Porcentajes	%s	76.4	64.4	82.8	66.4	70.0
		%p	23.6	35.6	17.2	33.6	30.1
	Coeficientes	$3s$	<b>0.87</b>	<b>0.80</b>	<b>0.91</b>	<b>0.82</b>	<b>0.84</b>
		$3p_x$	0.32	0.48	0.03	0.47	0.43
		$3p_y$	0.03	0.04	0.10	0.04	0.03
		$3p_z$	0.36	0.35	0.40	0.34	0.34
LP(2) S	Porcentajes	%s	9.0	15.8	0.1	15.2	13.5
		%p	91.0	84.1	99.5	84.6	86.4
	Coeficientes	$3s$	0.30	0.39	0.03	0.39	0.37
		$3p_x$	<b>-0.95</b>	<b>-0.87</b>	<b>-1.00</b>	<b>-0.87</b>	<b>-0.90</b>
		$3p_y$	-0.05	-0.06	-0.05	-0.07	-0.07
		$3p_z$	0.11	0.29	0.01	0.28	0.24

Tabla A.3. Participación de los orbitales atómicos naturales (NAOs) en orbitales naturales de enlace (NBO). Los porcentajes indican la proporción de NAO de carácter  $s$  o  $p$  involucradas en el NBO. Los coeficientes indican los valores utilizados en la combinación lineal de NAOs para obtener el NBO determinado. En negrillas se señala el coeficiente mayor de todos los NAO involucrados.

Como puede observarse en la tabla A.3, son tres los NAOs involucrados en la hibridación de tres NBOs. Estos son  $3s$ ,  $3p_x$  y  $3p_z$ , y cada uno contribuye mayoritariamente a un NBO específico. El NBO “BD (1) C - S” tiene una participación mayoritaria del NAO  $3p_z$ ; el “LP (1) S” del  $3s$ ; y el “LP (2) S” del  $3p_x$ . Es importante resaltar que en ninguno de los casos existe participación relevante del NAO  $3p_y$ . En el caso del modelo *Libre*, la mezcla del NAO  $3p_x$  con los otros NAOs es casi nula, indicando un rearrreglo orbital, y en los modelos *Cu T1*, *Nativa* y *Mutante* tienen una forma de hibridación muy similar a  $sp^2$ , independiente del puente de hidrógeno de amida–tiolato.

Regresando a la tabla A.2, podemos observar aquí también el reacomodo electrónico del modelo *Libre* en las poblaciones de los NBOs “LP (2) S” y “LP (3) S”. Mientras que los modelos *Cu T1*, *Nativa* y *Mutante* presentan una mayor población en el NBO dominado por el NAO  $3p_x$ , el modelo *Libre* tiene una población más alta en el NBO dominado por el NAO  $3p_y$ . Este mismo fenómeno de inversión de poblaciones ocurre con los NBOs “LP (4) Cu” y “LP (5) Cu” correspondientes a  $3d_{xy}$  y  $3d_{x^2-y^2}$  respectivamente. En este caso es posible relacionar la orientación de los NBOs con las interacciones de transferencia de carga ligante-metal (LMCT)  $\pi$  y pseudo- $\sigma$  entre el cobre y el azufre.



Aquel NBO dominado por el NAO  $3d_{x^2-y^2}$  tiene un nodo en el eje Cu-S y, por lo tanto, cuenta con una simetría adecuada para una interacción  $\pi$ , mientras que el NAO dominado por  $3d_{xy}$  tiene un lóbulo orientado sobre el eje Cu-S, por lo que es apto para la interacción pseudo- $\sigma$ . Al observar un cambio en las poblaciones, se puede suponer un cambio en la naturaleza de la interacción dominante LMCT en los diferentes modelos.

El argumento anterior es corroborado mediante el análisis de perturbación a segundo orden, incluido en el cálculo de NBO y resumido en la tabla A.4.

NBO Donador	NBO Aceptor	Tiolato	Cu T1	Libre	Nativa	Mutante
BD(1) C-S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	0.2				
LP(1) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	1.2			0.6	3.7
LP(2) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H	17.9		0.2	0.2	0.5
LP(3) S	BD*(1) N <sub>amida</sub> -H			0.2	0.8	1.8
LP(5)Cu	LP(3) S		28.6		24.8	23.5
LP(4)Cu	LP(2) S			90.6		
LP(2) S	LP(6)Cu		109.0		96.7	75.8
LP(1) S	LP(6)Cu			26.6		

Tabla A.4. Estabilización de orbitales naturales de enlace (NBOs) mediante el análisis de perturbación a segundo orden. “NBO Donador” representa al NBO que dona densidad de carga para estabilizar determinado NBO. “NBO Aceptor” representa al NBO que acepta la carga para ser estabilizado. Todos los valores se encuentran en kcal/mol. El símbolo \* denota carácter de antienlace del NBO.

En el caso de puentes de hidrógeno, esta deslocalización se refiere al par electrónico que dona densidad electrónica al orbital de antienlace heteroátomo-hidrógeno. Para el sistema amida-tiolato, se espera que un LP de azufre done densidad hacia un orbital de antienlace (BD\*) N-H. Esta forma de interacción queda ejemplificada en la columna del modelo *Tiolato* de la tabla A.4. De los tres pares libres del tiolato, el NBO “LP (2) S” dominado por el NAO  $3p_x$  induce la mayor estabilización hacia el NBO de antienlace “BD\* N<sub>amida</sub>-H”, con una magnitud de 18 kcal/mol. También existe una estabilización menor del NBO “BD\* N<sub>amida</sub>-H” por parte de “LP (1) S” y “BD (1) C – S”. Como hemos establecido anteriormente, los tres NBOs que donan densidad al orbital de antienlace se encuentran relacionados, debido a la hibridación tipo  $sp^2$  que ocurre en el átomo de azufre, por lo que consideraremos las contribuciones minoritarias de los NBOs “LP (1) S” y “BD (1) C – S” para obtener un valor global de 19.3 kcal/mol, correspondiente a las tres interacciones. Este valor nos indica que la componente covalente domina esta interacción en particular, puesto que de las 24 kcal/mol de la interacción 19.3 corresponden a una interacción covalente [34].

Este valor de estabilización, obtenido para un modelo donde no existe coordinación entre azufre y cobre, servirá como valor de referencia, estableciendo el máximo de estabilización que se puede alcanzar por el puente de hidrógeno amida-tiolato.

Para el caso de las transferencias de carga LMCT también es posible observar estabilizaciones determinadas por el análisis de perturbación a segundo orden. En este caso, el modelo *Cu T1* servirá como punto de referencia puesto que contiene un azufre coordinado a cobre, sin la perturbación de puentes de hidrógeno. En el modelo se presentan dos perturbaciones importantes, la primera entre el NBO “LP (5) Cu” dominado por el NAO  $3d_{x^2-y^2}$  de cobre y el NBO “LP (3) S” dominado por el NAO  $3p_y$  del azufre. Esta interacción representa la típica interacción  $\pi$  cobre-azufre responsable de las propiedades espectroscópicas del sitio de Cu T1. Aunque en apariencia es una interacción moderada de 28.6 kcal/mol, el algoritmo ha identificado al NBO “LP (5) Cu” del cobre como el más poblado, lo cual se relaciona con una fuerte transferencia de carga del azufre hacia el cobre (ver tabla A.2).

La segunda interacción LMCT identificada es entre el NBO “LP (2) S”, dominado por el NAO  $3p_x$  de azufre y el NBO “LP (6) Cu” dominado por el NAO  $4s$  del cobre. Esta interacción es significativa (109 kcal/mol) y tiene carácter pseudo- $\sigma$ . Curiosamente, el orbital del cobre involucrado en esta interacción es de carácter  $s$  y no  $d$  como varios autores han sugerido [18, 19].

Con los valores de referencia establecidos mediante los modelos *Tiolato* y *Cu T1*, procederemos al análisis de los modelos *Nativa* y *Mutante*. Puede observarse en la tabla A.4 que el puente de hidrógeno amida-tiolato en el modelo *Nativa* no es estabilizado significativamente. La suma de la estabilización generada por los tres NBOs del azufre (dominados por los NAOs  $3p_x$ ,  $3s$  y  $3p_y$ ) hacia el orbital de antienlace es apenas de 1.6 kcal/mol, indicando que la contribución covalente en este puente de hidrógeno es muy pequeña. Este fenómeno es observado para los sistemas biológicos amida-tiolato-hierro acompañado por una disminución de la covalencia azufre-hierro [32]. Para el modelo *Nativa* también ocurre una disminución de los procesos LMCT  $\pi$  y pseudo- $\sigma$ . En el caso de la interacción  $\pi$ , disminuye la energía de estabilización en 3.8 kcal/mol, mientras que la interacción pseudo- $\sigma$  disminuye en 12.3 kcal/mol; lo que indica que el puente de hidrógeno amida-tiolato, aunque no desvía una cantidad significativa de densidad electrónica hacia el NBO de antienlace, sí perturba la covalencia cobre-azufre.

Como habíamos establecido anteriormente, el puente de hidrógeno amida-tiolato no está orientado hacia ninguno de los pares libres del azufre. Esto se ve reflejado en el hecho de que tres NBOs ( $3p_x$ ,  $3s$  y  $3p_y$ ) estabilizan al orbital de antienlace de amida. También puede apreciarse que la interacción pseudo- $\sigma$  es la que sufre mayormente la influencia del puente de hidrógeno, originando una disminución en la covalencia cobre-azufre.

Si contrastamos estos resultados con los obtenidos para el modelo *Mutante*, podemos observar un mayor impacto del puente de hidrógeno sobre el átomo de azufre. En primer lugar existe una mayor estabilización (de 6 kcal/mol) hacia el orbital de

antienlace de amida por parte de los mismos tres NBOs del azufre. Esto implica un aumento en la componente covalente de la interacción amida-tiolato, ocasionando una gran disminución en las interacciones LMCT cobre-azufre. La interacción  $\pi$  disminuye su estabilización por 5.1 kcal/mol, mientras que la interacción pseudo- $\sigma$  lo hace por 33 kcal/mol. Esto reduce sensiblemente la covalencia cobre-azufre y por lo tanto es de esperarse un aumento en el  $E^\circ$  como se observa en los datos analizados anteriormente.

Resumiendo el análisis para los modelos *Nativa* y *Mutante*, podemos afirmar que la interacción amida-tiolato es poco covalente, pero aumenta su covalencia con la mutación H483Q. El puente de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación disminuye la covalencia cobre-azufre, perturbando principalmente la interacción pseudo- $\sigma$  entre ellos, y la interacción pseudo- $\sigma$  cobre-azufre descrita en estos modelos tiene carácter  $4s$  de cobre y  $3p_x$  de azufre.

Por último analizaremos al modelo *Libre* que, como fue indicado anteriormente, sufre un rearrreglo de la densidad electrónica sobre el azufre. Una estabilización de 0.4 kcal/mol para el orbital de antienlace de amida por parte de dos NBOs indica una casi nula interacción covalente amida-tiolato. Por otro lado, las dos LMCT observadas en este modelo son diferentes a las de los modelos anteriores. La primera tiene lugar entre el NBO "LP (4) Cu" con carácter  $3d_{xy}$  y el "LP (2) S" con carácter  $3p_x$  para generar una interacción pseudo- $\sigma$ . A diferencia de la interacción pseudo- $\sigma$  descrita anteriormente, esta interacción sí cuenta con participación de un orbital  $d$  del cobre. La segunda interacción LMCT ocurre entre el NBO "LP (1) S", con carácter  $3s$  y el "LP (6) Cu" de carácter  $4s$ , indicando que no existe interacción  $\pi$  en este complejo. Estos resultados muestran que ante la ausencia de restricciones proteicas, el puente de hidrógeno amida-tiolato orientaría la densidad electrónica del azufre de tal manera que impediría la interacción  $\pi$  cobre-azufre.

# Geometric distortions on a three-coordinated T1 Cu site model as a potential strategy to modulate redox potential. A theoretical study

Hugo Vázquez-Lima · Patricia Guadarrama ·  
Claudia Martínez-Anaya

Received: 3 August 2010 / Accepted: 22 March 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** A model of the three-coordinated T1 Cu site from *Trametes versicolor* was considered to evaluate the effect on redox potential of geometrical distortions in the copper coordination sphere. Systematic modifications of geometrical parameters (distances and angles) of the coordination sphere of the T1 Cu site were carried out within a density functional theory (DFT) framework, to evaluate their effects on electron affinity directly related to redox potential. The most promising result in terms of redox potential increment was distortion of the dihedral angle  $C_{\text{methylthiolate}}\text{-S-Cu-N}_{\text{ImA}}$  ( $\omega$ ), which can be rationalized as a decrease in the overlap of imidazole orbitals in the redox-active molecular orbital ( $\beta$ -LUMO). This overlap is minimized when  $\omega$  achieves the value of  $10^\circ$ , therefore, this conformation might have the highest redox potential. From the molecular orbital viewpoint, a parallelism was found between the effect caused by the presence of a fourth ligand and the distorted three-coordination, which could be extrapolated to spectroscopic properties. It was also found that solvation effects on the redox potentials during geometrical distortions produce a very similar tendency, independently of the polarity of the solvent.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00894-011-1063-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Vázquez-Lima · P. Guadarrama (✉)  
Instituto de Investigaciones en Materiales,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70–360, CU, Coyoacán,  
Mexico DF 04510, Mexico  
e-mail: patriciagua@iim.unam.mx

C. Martínez-Anaya  
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de  
Biotecnología (IBT), Universidad Nacional Autónoma de México,  
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa,  
62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

**Keywords** Density functional theory · Laccase · Redox potential · Enzymatic model

## Introduction

Laccases are enzymes belonging to a family known as multicopper oxidases containing four copper atoms classified in three different types (T1, T2, and T3), according to their spectroscopic properties in oxidized state [Cu (II)] [1].

These enzymes have an enormous biotechnological potential in environmental remediation since they are able to catalytically oxidize several harmful substrates such as phenols and aromatic amines. The accepted mechanism involves a first stage where Cu (II) in the T1 Cu site is reduced to Cu (I), and this active site is then re-oxidized with the concomitant reduction of  $O_2$  to  $H_2O$  [2]. Nowadays, there is a growing interest in understanding the complex mechanisms involved in the activity of laccases and, at the same time, there is a constant search for new varieties of laccases with higher stability and higher redox potential to cover a wider spectrum of substrates [3].

The T1 Cu, responsible for the blue color of these enzymes when oxidized [4], has been studied extensively, and is a recurrent motif found in proteins involved in redox processes. This copper atom is surrounded by two histidine (His) and one cysteine (Cys) residues, all of which are conserved in all T1 Cu sites. A fourth residue can be methionine (Met), glutamine (Gln), leucine (Leu), isoleucine (Ile) or phenylalanine (Phe), depending on the protein.

In most proteins, the T1 Cu site is directly responsible for the redox potential, which is modulated by five factors: (1) the number of copper coordinated residues [lower coordination numbers of Cu (II) destabilized this state, resulting in higher redox potentials], (2) distortions in the

copper coordination sphere, (3) hydrophobicity around the copper atom, (4) electrostatic effects due to the charges of the protein, and (5) hydrogen bonds toward the sulfur atom of the coordinated cysteine [5]. Among these factors, our main interest lies in getting a deeper insight into the consequences of different distortions on the redox potential.

Most proteins containing the T1 Cu site have four residues coordinated to the copper atom. The effect of modifications in the bond distance of the fourth residue on their low/medium redox potentials has been studied widely [6]. A debate about the consequences of these structural distortions and their origins [7–9] was started in the 1990s, and some authors considered them as crucial to redox potential tuning. When the distance of the Cu–fourth residue (Met or Gln) is elongated, an increment in redox potential is observed [4]. It has been hypothesized, and theoretically supported [10–12], that the three remaining residues in T1 Cu remain almost unchanged.

On the other hand, it was observed that laccases where methionine was substituted by hydrophobic residues such as Phe or Leu, which are unable to act as fourth ligands, exhibit the highest redox potentials (regulation due to the decrease in coordination number) [3]. Thus, the combination of a low coordination number and further distortions on the three-coordinated T1-Cu sites presents itself as an attractive strategy to raise redox potentials.

Two minima, very close in energy, were found from density functional theory (DFT) calculations on simplified models of the fourth-coordinated T1 Cu site when the potential energy surface was analyzed [11], and were correlated with an amyacin mutant [10] where two different colorations can be observed; the color changes from blue to green when the protein is cooled below 200 K. Equilibrium between the two minima, assisted by small distortions of the protein, has been suggested and, depending on the enzyme, one or another state is favored. This phenomenon was rationalized in terms of the differences in the orbital interaction of the Cu–S<sub>Cys</sub> bond [4]. When the interaction is dominated by a  $\pi$ -overlap, the protein color is blue, whereas the color turns to green when the pseudo- $\sigma$  overlap controls the interaction. This classification of interactions has been described previously [13]. Most of the proteins exhibit both types of interactions, to some extent, depending on the orientation of the  $d_{x^2-y^2}$  copper orbital with regard to the residues of the first coordination sphere. Particularly, in the case of *Mycelioptora thermophila* laccase, the rotation of the orbital  $d_{x^2-y^2}$ , when some mutations are made, promotes a change in color of the active site from blue to green, presumably due to an increase of the pseudo- $\sigma$  interaction, with a concomitant decrease in the  $\pi$ -overlap in the Cu–S bond [14].

Taking into account a model of a three-coordinated T1 Cu site (corresponding to laccases with the highest redox

potentials), and using the DFT framework, systematic modifications of geometrical parameters (distances and angles) on the coordination sphere of the active site were carried out in the present study, in order to simulate possible distortions that might result in higher redox potentials. The effect of these geometrical distortions on the electron affinity (directly related to redox potentials) was evaluated, with special emphasis on two minima characterized from the potential energy surface, linkable to an equilibrium between two states of three-coordinated copper sites.

## Methods

### Validation

In order to start with a good quality description of the T1 Cu site embedded in laccases, a prior validation of the theoretical methods was made on three different copper models with structural similarities to T1 Cu (see [Geometric validation](#) in the supporting information). The crystallographic structures of the chosen models available in the literature [15–17] were taken as a reference for geometrical comparisons. Among the functionals M05, BP86, B3LYP, and PBE0, available in the DFT framework of the Jaguar 7.0 program [18], the hybrid functional PBE0 [19, 20] produced the best results and was selected for further calculations (maximum deviation of 0.09 Å in the copper–ligand distances compared to crystallographic distances).

The basis set, LACVP\*\* [21, 22] with polarized functions on all atoms was used. This is a 6-31G basis set that takes into account effective core potentials (ECPs) generated to replace the innermost core electrons for third-row (K–Cu), incorporating in this way the relativistic effects of heavy atoms.

Since the property under study is the redox potential, the chosen functional (PBE0) was evaluated on three copper complexes, mimics of the T1 Cu site (see [Redox validation in the supporting information](#)), whose redox potentials were reported in the literature [23, 24]. The PBE0 functional gives redox potential values with an average deviation of 150 mV (3.5 kcal) from experimental data. These values are within the range of the DFT redox calculation error [25].

### T1 Cu model under study and methodology

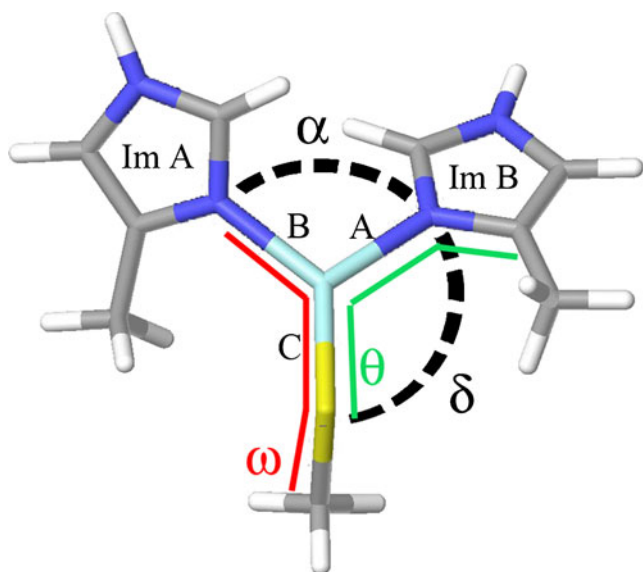
One of the laccases with higher redox potentials is that from *Trametes versicolor* [3, 26]; the crystal structure of *T. versicolor* laccase deposited in the Protein Data Bank (PDB ID: 1GYC). The T1 Cu of *T. versicolor* laccase is surrounded by two histidine and one cysteine residues. In

order to systematically explore the effect of geometrical distortions (in distances and angles) on the electron affinity of the T1 Cu site, a reduced model of *T. versicolor* laccase was chosen, including two methylimidazole groups and one methylthiolate, all directly coordinated to Cu (II) (Fig. 1).

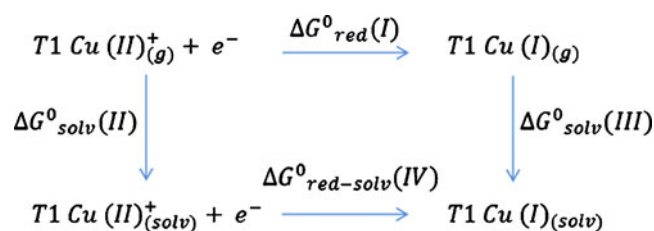
Full geometry optimization of the T1 Cu model (Cu (II), multiplicity 2) was carried out at PBE0/LACVP\*\* level (within unrestricted formalism), and the structural deviation of the active site with regard to the complete crystallographic structure was evaluated (see Results and discussion). The full optimized T1 Cu model was used as reference for further calculations.

From the fully optimized structures of T1 Cu (Cu (II), multiplicity 2), distances A, B, and C, angles  $\alpha$ ,  $\delta$ , and dihedrals  $\theta$  and  $\omega$  were systematically modified, fixing each one in turn and optimizing the rest of the molecule, obtaining total energies for each specific modification. To calculate the electron affinities, total energies of Cu (I) counterparts were obtained by single point calculations of each structure with the corresponding modification.

Since the geometrical restrictions proposed here do not allow a complete relaxation of the structures, the electron affinities are vertical ones. Taking into account the thermodynamic cycle of Fig. 2 [27] and the equations shown below, the redox potentials were estimated from vertical calculations of electron affinities. The reduction properties of the Cu (II) open-shell system under the unrestricted formalism are related to an unoccupied molecular orbital (labeled as  $\beta$ -LUMO) that was used for a qualitative description of orbitals rearrangement.



**Fig. 1** T1 Cu model. Labels correspond to distances A, B, and C; angles  $\alpha$  and  $\delta$ , and dihedral angles  $\omega$  and  $\theta$



**Fig. 2** Thermodynamic cycle

The global  $\Delta G$  in solution ( $\Delta G_{red-solv}^0(IV)$ ) can be expressed as follows:

$$\Delta G_{red-solv}^0(IV) = \Delta G_{red}^0(I) + \Delta G_{solv}^0(III) - \Delta G_{solv}^0(II) \quad (1)$$

Once the free energy change in solution is defined, the absolute redox potential  $E^0$  can be determined as:

$$E^0 = -\Delta G_{red}^0(I)/nF - \Delta G_{solv}^0(III)/nF + \Delta G_{solv}^0(II)/nF \quad (2)$$

Where  $n$  is the number of transferred electrons and  $F$  is the Faraday constant.

The redox potential might be defined through the electron affinity in gas phase by separation of terms, [ $\Delta G_{red}^0(I)$ ] and the difference in solvation energies of the involved species [ $\Delta G_{solv}^0(II) - \Delta G_{solv}^0(III)$ ]; thus, from the thermodynamic cycle, the electron affinity of T1 Cu (II)<sub>(g)</sub><sup>+</sup> is calculated as the energy of T1 Cu (II)<sub>(g)</sub><sup>+</sup> minus the energy of T1 Cu (I)<sub>(g)</sub>, both in gas phase. The  $\Delta G_{red}^0(I)$  value is estimated as the energy difference between T1 Cu (I)<sub>(g)</sub> and T1 Cu (II)<sub>(g)</sub><sup>+</sup>; therefore the electron affinity of T1 Cu (II)<sub>(g)</sub><sup>+</sup> is equal to  $-\Delta G_{red}^0(I)$ . In this way, it is possible to establish a tendency in redox potentials through electron affinity only.

In the particular case of multicopper oxidases, there is a very small geometric reorganization of the T1 Cu site upon reduction to Cu (I) [28], according to crystallographic studies. Thus, strictly speaking, in the environment of the protein the use of  $\Delta E$  values in the thermodynamic cycle would be valid (since almost no entropic contributions by reorganization are involved). Even though this approximation holds in the context of the protein and not in the small model of T1 Cu site, it can still be applied if it is considered that the geometrical distortions tested in the small model to enhance the redox potential are meant to be projected into the protein context. This approximation allows vertical electron affinities to be related to redox potentials. Therefore,  $\Delta G$  values were replaced by  $\Delta E$  values in the thermodynamic cycle.

Even though the most significant solvation energy is that of protein solvation (which is considered as constant), it is usually considered that the T1 Cu site is embedded in an environment with a certain dielectric constant of about 8 [29] (mostly hydrophobic); therefore, calculations in cyclohexane, tetrahydrofuran, and water were carried out

for distorted structures of the Cu (I)/Cu (II) model under the Poisson-Boltzmann solvation scheme [30, 31] and their redox potential was calculated with the aim of evaluating the possible effect of solvation on redox potential.

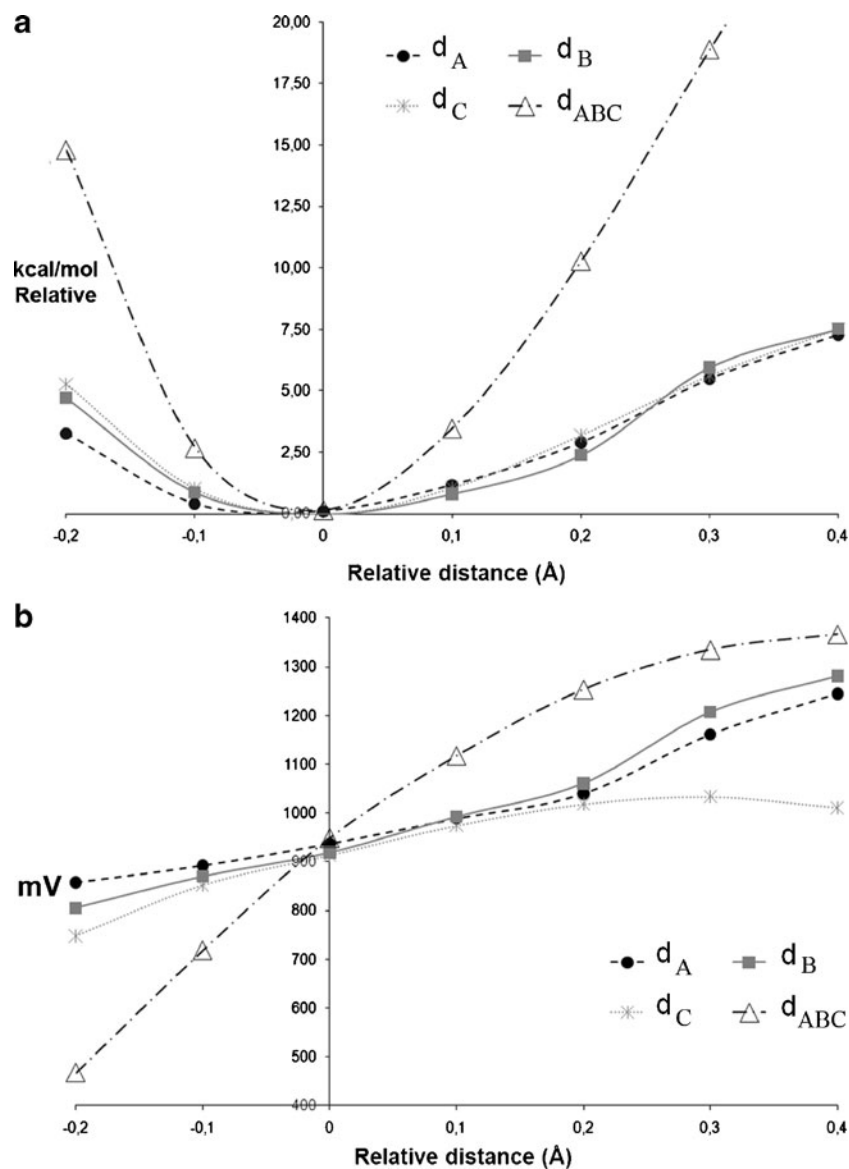
It has been pointed out that the solvation effects out of the coordination sphere of active sites play an important role in redox potential calculations. For most small complexes in solution, a reliable description can be obtained by means of solvation energy calculations using a continuum model that leaves aside parameters such as explicit charges, dipole moments and hydrogen bonds [32]. Some other approximations that include such parameters are: (1) QM/MM (quantum mechanics/ molecular mechanics) calculations, which explicitly take into account charges and hydrogen bonds from the protein at lower level of

theory [33]; and (2) PDL (protein dipoles langevin dipoles), considering dipole moments and charges [34]. Beyond the method chosen, the important issue is to be aware of the limitations of every model and the conclusions that can be drawn.

## Results and discussion

After full optimization of the T1 Cu model chosen in the present study, distances Cu–S, Cu–N<sub>His(ImA)</sub>, and Cu–N<sub>His(ImB)</sub> (Fig. 1) are generally longer than crystallographic ones, but differing only by 0.011, 0.032, and 0.012 Å, respectively. According to these results, the protein environment apparently does not exert a significant strain on the T1 Cu site.

**Fig. 3** Systematic modification of distances  $A$  ( $d_A$ ),  $B$  ( $d_B$ ), and  $C$  ( $d_C$ ).  $d_{ABC}$  corresponds to the synchronized modification of these three distances. The zero value in the  $x$ -axis corresponds to the distances of the fully optimized structure. **a** Relative energies versus distorted distances. **b** Vertical electron affinities versus distorted distances





## Systematic tension in bond distances

Distances A, B, and C (Fig. 3) were individually modified (shortened and increased) from  $-0.2$  to  $0.4$  Å in increments of  $0.1$  Å. Optimization of the structures with the corresponding fixed distance were carried out and the relative energies of the complexes, as well as their vertical electron affinities (values in mV and referenced to NHE), were computed. Another series in which distances A, B, and C were synchronically modified was also generated, computing both relative energies and vertical electron affinities.

It can be seen from Fig. 3 that any tension resulting in a contraction of the distances would imply destabilization in the energy of the complex and a decrease of electron affinities.

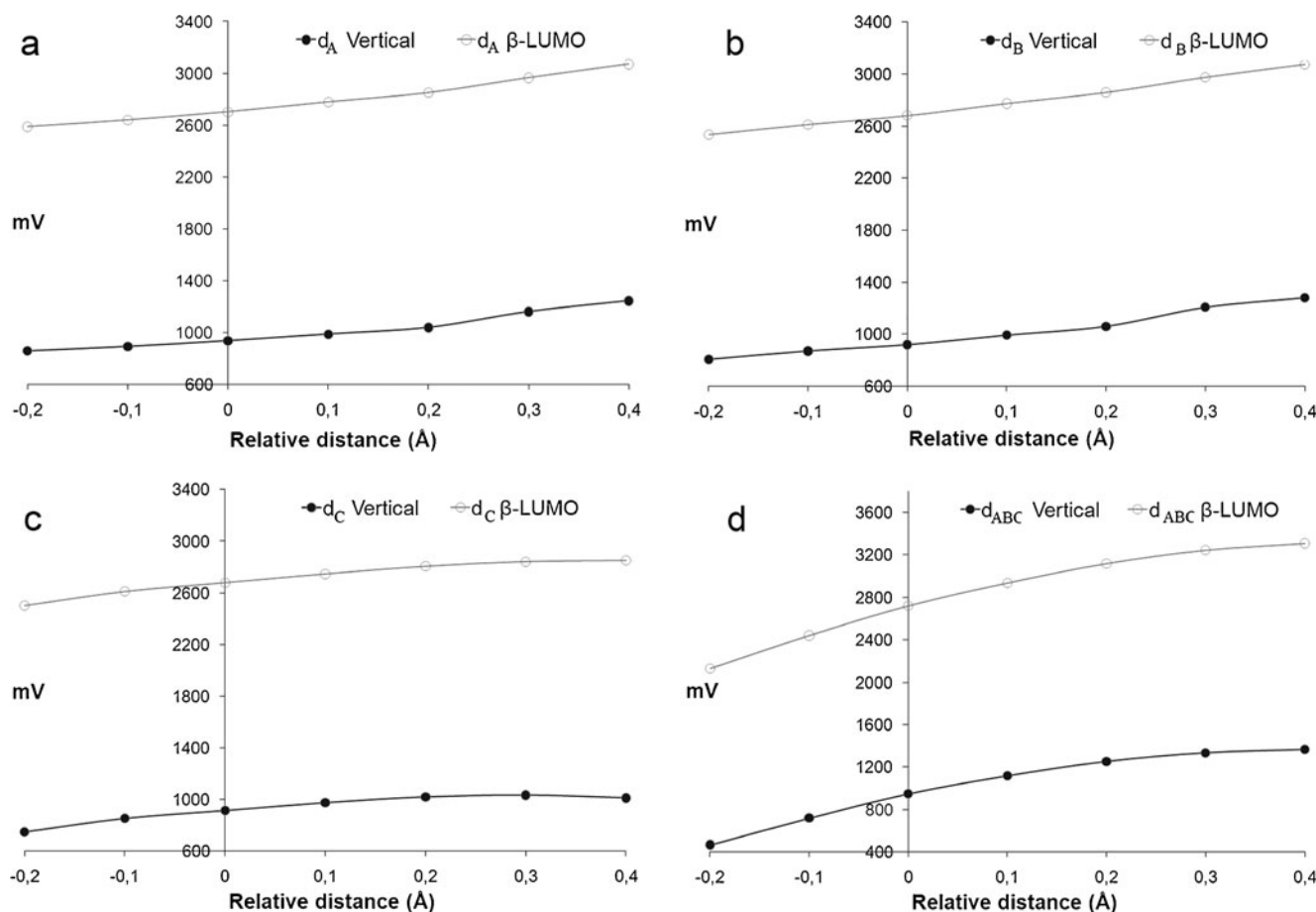
When distances A and B (involving imidazole rings) are increased, the electron affinities also increase progressively and, even though the complex loses stability, it does so to a moderate extent. Modification of the Cu–S distance (C) resulted in a marginal increment of electron affinity, and the

synchronized movement of distances ( $d_{ABC}$ ) produced the highest destabilization of the complex. However, separation of the ligands from copper, which emulates the scenario where a decrease of coordination number might occur, produces an important increment of the electron affinity. Thus, considering both effects, those tensions that increase the Cu–ligand distances might produce only a modest increment of redox potentials.

The energy of the redox active molecular orbital, labeled as  $\beta$ -LUMO, follows the same tendency as the vertical affinities (as shown in Fig. 4), since both parameters are related directly to the redox potentials of the T1 Cu site model; therefore, changes on this molecular orbital can be used to describe redox potential variations. This pattern was also observed in all the geometrical distortions discussed here.

## Systematic distortions in angles

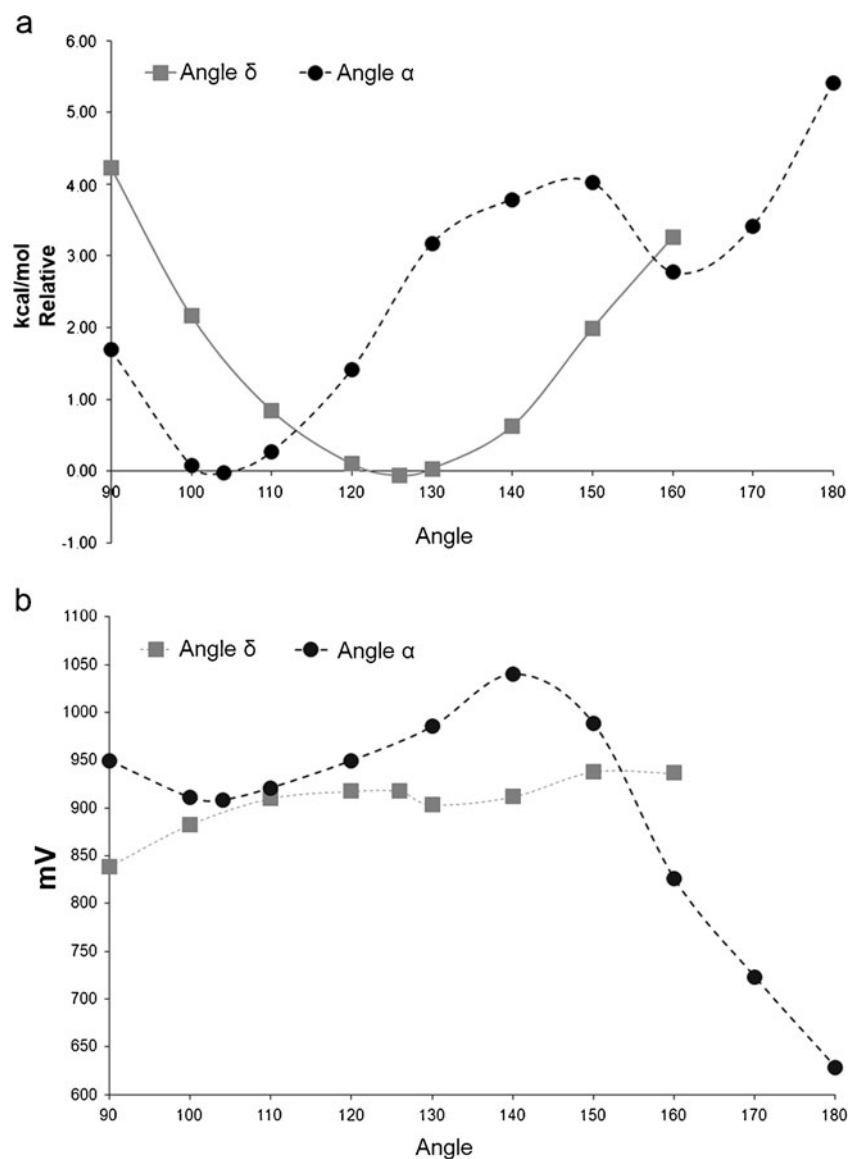
Next, the angles  $\alpha$  (N–Cu–N) and  $\delta$  (N–Cu–S) were independently modified from  $90$  to  $180^\circ$ , in increments of  $10^\circ$  and the structures were optimized with the corresponding fixed



**Fig. 4** Vertical electron affinities and  $\beta$ -LUMO energies during systematic modification of distances. **a** A,  $d_A$ ; **b** B,  $d_B$ ; **c** C,  $d_C$ ; and **d** the synchronized distances A, B, and C. The zero value in the x-axis corresponds to the distances of the fully optimized structure



**Fig. 5** Systematic modification of angles  $\alpha$  ( $N_{ImA}-Cu-N_{ImB}$ ) and  $\delta$  ( $S-Cu-N_{ImA}$ ). **a** Relative energies versus distorted angles. **b** Vertical electron affinities versus distorted angles



angle. The angles  $\alpha=104^\circ$  and  $\delta=126^\circ$  match with the crystallographic structure and were also considered (see Fig. 5).

As observed, the modification of angles gives rise to a very different energy pattern since additional effects, such as electronic repulsion and steric hindrance, are now involved. From the modification of angle  $\delta$ , the minimum energy of the complex in the curve corresponds to the crystallographic structure. Throughout the modifications, only a small increment in the vertical electron affinity (less than 40 mV) is observed, whereas the modification of angle  $\alpha$  produces an increment of around 120 mV, with similar complex destabilization. An increase in the angle  $\alpha$  from  $140^\circ$  to  $180^\circ$  prevents the  $\pi$  interaction between copper and sulfur by steric hindrance. This effect acts in favor of the anti-bonding  $\beta$ -LUMO stabilization at angles of  $140^\circ$  and  $150^\circ$ , where the participation of only one of the imidazole rings via the nitrogen, and the thiolate group via a pseudo- $\sigma$

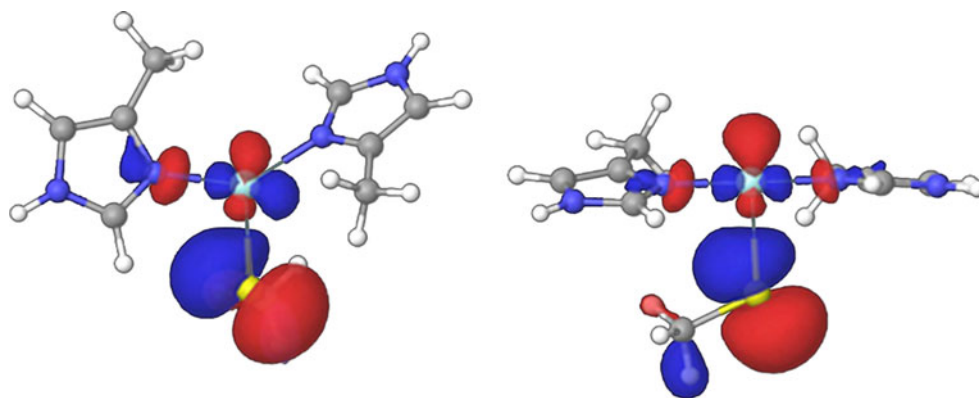
overlap is observed. This effect changes from  $160^\circ$  to  $180^\circ$  where the above scenario remains but, in addition, the overlap of the second imidazole increases, destabilizing the  $\beta$ -LUMO (Fig. 6).

So far a single modification of the Cu-N distance provides the best compromise between destabilization of the complex and the increment of the vertical electron affinity.

#### Systematic distortions in dihedral angles

The two planes involved in the dihedral angle  $S-Cu-N_{ImA}-C_{ImA}$  ( $\theta$ ) were defined by  $N_{ImA}-N_{ImB}-S-Cu$  atoms (first plane) and the atoms of imidazole A (second plane); see Fig. 1. Once the planes were defined, the dihedral  $\theta$  was modified from  $0$  to  $350^\circ$  in increments of  $10^\circ$ . In this case, as imidazole A was rotating, imidazole B compensated for

**Fig. 6** Graphical representation of  $\beta$ -LUMO. *Left* Angle  $\alpha=140^\circ$  *right* angle  $\alpha=180^\circ$



this rotation (see Fig. 7). Hence, this rotation causes a cancellation of any possible electronic rearrangement.

When the relative energies and vertical electron affinities are plotted, one can see small changes in both destabilization energy and vertical electron affinity, with a periodic behavior of both graphs (Fig. 8).

The leading role of the Cu–S interaction in the modulation of the T1 Cu redox potential has been recognized to be as a major contributor to the stabilization of the oxidized site of blue proteins [35]. To evaluate the effect of modification of the dihedral angle involving this interaction, the  $C_{\text{methylthiolate}}\text{S-Cu-N}_{\text{ImA}}$  dihedral angle ( $\omega$  in Fig. 1) was rotated from  $0^\circ$  to  $270^\circ$  in increments of  $10^\circ$ , around the plane formed by the  $\text{N}_{\text{ImA}}\text{-N}_{\text{ImB}}\text{-S-Cu}$  atoms. The relative energy of the complex and the vertical electron affinity patterns are shown in Fig. 9. It can be seen from the graph that the best trade-off between the increment of vertical electron affinity and complex destabilization is achieved with this distortion.

There is a minimum in the energy of the complex at  $0^\circ$  (or  $180^\circ$ ) that is related to a change in the imidazole ring conformations. A small increment from  $0^\circ$  to  $10^\circ$  in  $\omega$

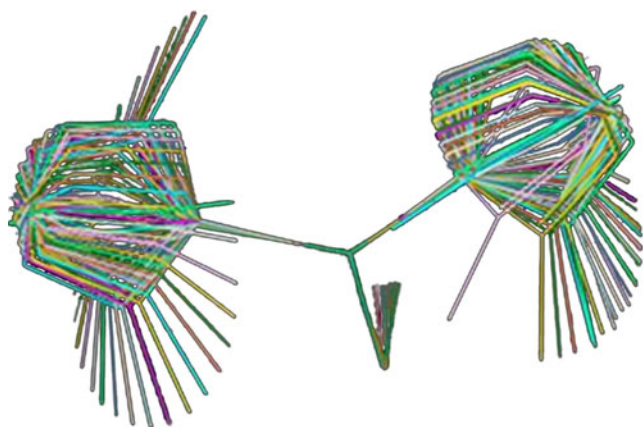
produces a change of more than  $40^\circ$  in the angle  $\text{N}_{\text{ImA}}\text{-Cu-N}_{\text{ImB}}$ . This result is rationalized below in terms of molecular orbitals.

The most significant increment in the vertical electron affinity is observed in conformations with  $\omega=10^\circ$  and  $-10^\circ$ , which would correspond to a theoretical increment in redox potential of 390 mV. It is important to mention that other kinds of modification, like the presence or absence of a fourth ligand, would modify the redox potential only by 80–120 mV [4].

To explain the singular pattern of the vertical electron affinity as the dihedral angle  $\omega$  is modified, the changes in the  $\beta$ -LUMO were represented by three key conformations selected from Fig. 9:  $\omega=0^\circ$ ,  $20^\circ$ , and  $90^\circ$  (Fig. 10).

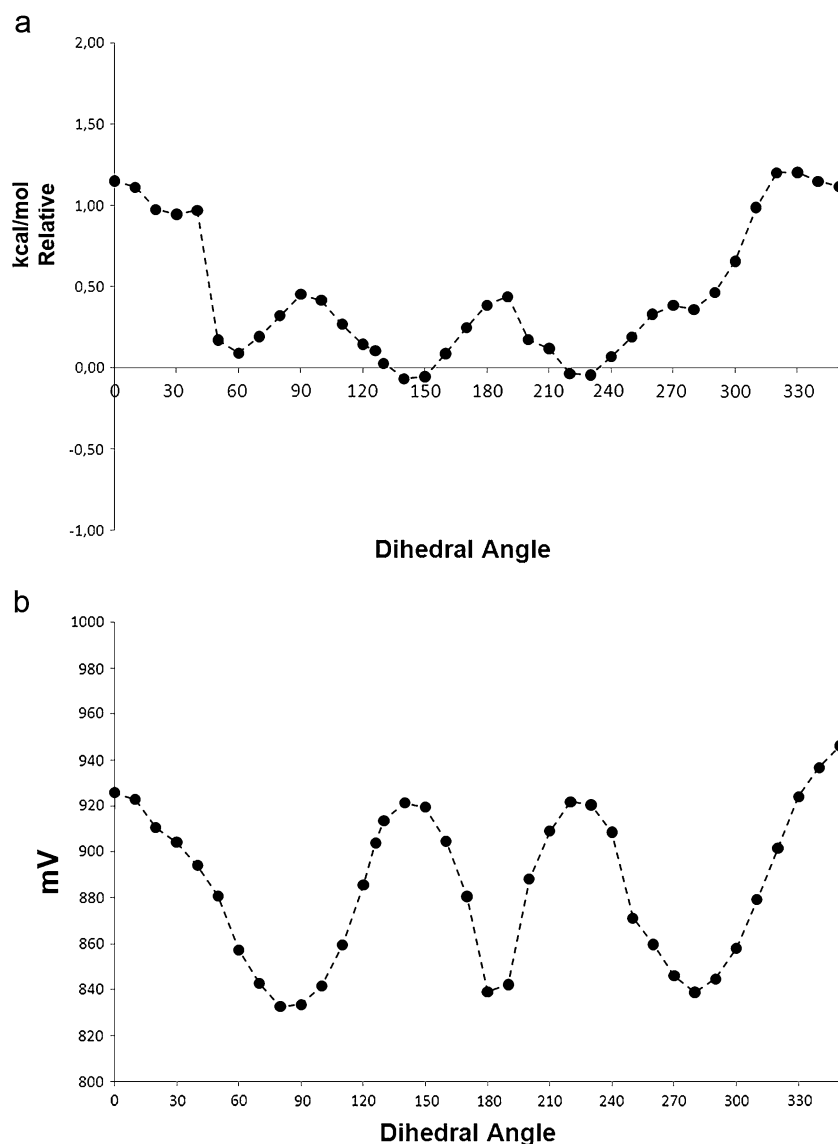
Starting with the structure where  $\omega=90^\circ$ , it is observed that the  $d_{x^2-y^2}$  orbital of copper, one p orbital of sulfur, and two  $\sigma$ -lobes from the imidazole rings contribute to  $\beta$ -LUMO. When the dihedral  $\omega$  is modified, the p orbital of sulfur is rotated around the Cu–S axis (see Fig. 10, lateral view,  $20^\circ$  configuration). The copper  $d_{x^2-y^2}$  orbital follows the movement of the p orbital of sulfur to maximize the overlap between them, sacrificing the interaction between copper and the imidazole rings. The smaller overlap results in greater stability of  $\beta$ -LUMO and, as the dihedral  $\omega$  is rotated, the  $\beta$ -LUMO is stabilized due to a smaller interaction with orbitals from the imidazole rings.

For  $\omega=20^\circ$ , the  $d_{x^2-y^2}$  orbital from copper is out of plane by  $30^\circ$ , diminishing all  $\sigma$  interactions (Fig. 10). When the rotation is  $0^\circ$ , there is a notable change in the orbital disposition; the orbital  $d_{x^2-y^2}$  does not contribute to  $\beta$ -LUMO and instead the  $d_{xy}$  orbital of copper does; this result can be interpreted also as a  $45^\circ$  rotation of the  $d_{x^2-y^2}$  orbital around the z axis. This conformation allows the imidazole rings to interact with distal lobes of the d orbital of copper. Finally, the original p orbital of sulfur remains perpendicular to the plane of ligands due to the change in orientation, leaving the other p orbital of sulfur to interact by a single lobe with copper. This conformational change with its concomitant electronic rearrangement explains the



**Fig. 7** Superposition of structures generated by rotation of the dihedral angle  $\theta$

**Fig. 8** Systematic modification of dihedral angle  $\theta$  (S–Cu–N<sub>ImA</sub>–C<sub>ImA</sub>). **a** Relative energies versus distorted dihedral angle, **b** vertical electron affinities versus distorted dihedral angle



abrupt change in energy of both the complex and the  $\beta$ -LUMO.

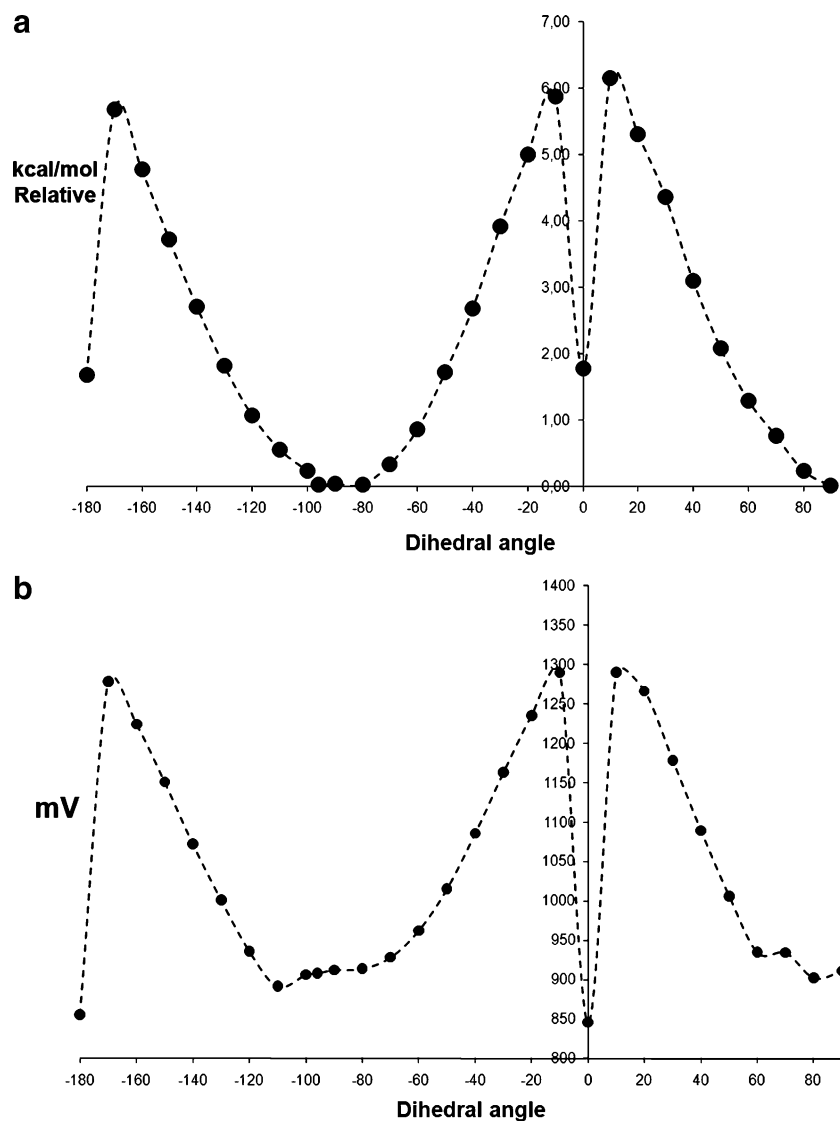
Along the modification of the dihedral angle  $\omega$ , two minima are generated, one in  $\omega=90^\circ$  (minimum 1) and the other in  $\omega=0^\circ$  (minimum 2). These conformations were fully optimized, and frequency calculations were carried out to verify the order of each saddle point. After optimization, the dihedral  $\omega$  remains almost the same ( $95.3^\circ$  and  $0^\circ$ , respectively). An energy difference of  $1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  between them was found, being more stable the minimum 1. The minimum 1 conformation virtually coincides with many of the crystallographic structures of high potential laccases with three-coordinated T1 Cu sites. The transition state between these minima was calculated as an energy barrier of 4.6 kcal. According to a Boltzmann distribution calculation, 6% of the T1 Cu site exists in state 2 at room temperature; however, the protein seems to

restrict the T1 Cu site to constantly adopt the conformation of minimum 1 over minimum 2. This is supported by the fact that no significant pseudo- $\sigma$  interaction has been identified spectroscopically in high redox potential laccases [4], suggesting that the proteins might exert restrictions over the T1 Cu site, and that these restrictions coincide with the minimum 1.

It is important to establish that the  $\beta$ -LUMO in minimum 1 possesses a  $\pi$ -character in the Cu–S interaction, whereas in minimum 2 a pseudo- $\sigma$  character prevails.

These interactions define the spectroscopic properties of the complexes. Earlier experimental studies attributed the T1 Cu site color change to an adjustment in the Cu–S interaction through the presence of a fourth ligand. According to the results obtained in the present study, the same color change can occur in the absence of a fourth ligand (see [Supporting information](#)).

**Fig. 9** Systematic modification of  $C_{\text{methylthiolate}}-S-Cu-N_{\text{ImA}}$  dihedral angle  $\omega$ . **a** Relative energies versus distorted dihedral angle, **b** vertical electron affinities versus distorted dihedral angle



#### Solvation effects during systematic distortions

To evaluate the solvation effect on the redox potential of the T1 Cu site during systematic distortions, the modification of the dihedral angle  $\omega$  (from  $0^\circ$  to  $90^\circ$ ) was considered in three different solvents (cyclohexane, tetrahydrofuran, and water), following the thermodynamic cycle from Fig. 2. Redox potential values were estimated and are shown in Fig. 11.

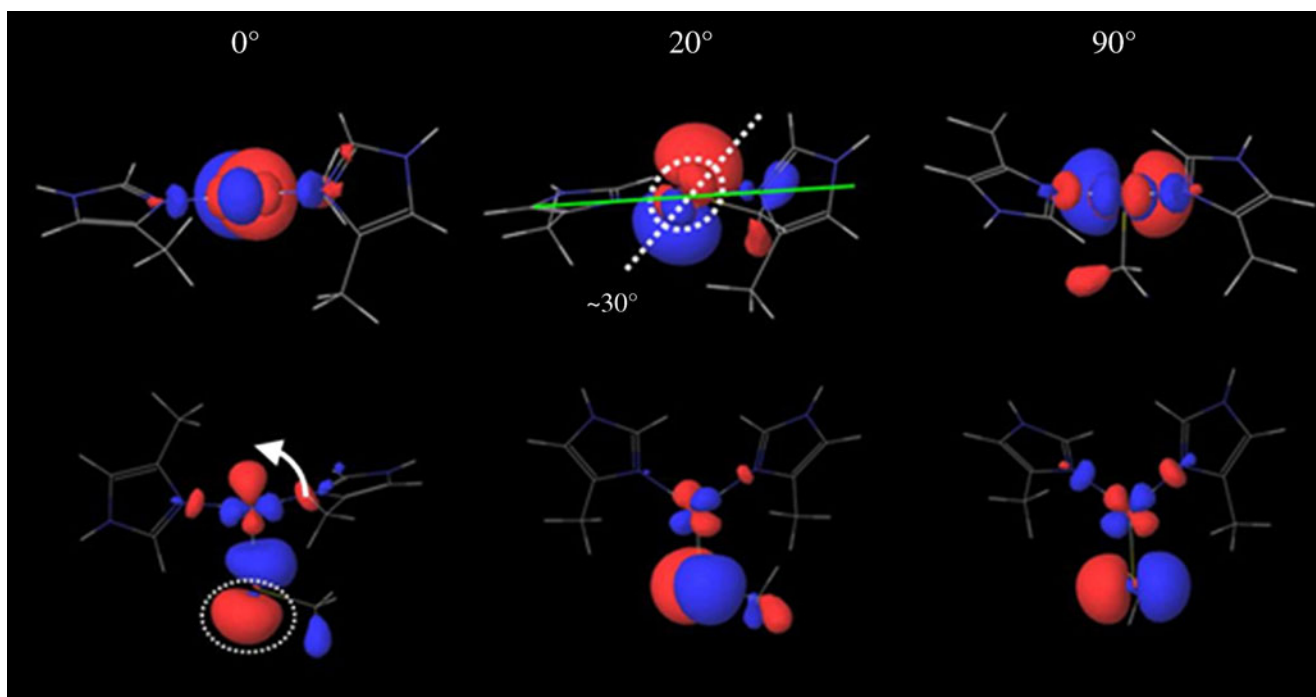
It can be seen from Fig. 11 that, even though the net values of redox potential change depend on the dielectric constant of each solvent, the tendency remains almost the same. The dielectric constant inside the protein is about 8 [28], which is closer to the dielectric constant of cyclohexane (7.6). Thus, according to these results, it can be concluded that the solvation energy has little influence

on any of the tendencies observed when geometric distortions are made.

#### Conclusions

A model of three-coordinated T1 Cu site from *T. versicolor* was used to carry out geometric distortions in a systematic fashion to evaluate their effect on redox potential modulation. Distortions in the Cu–N distance produced only a modest tuning of redox potential.

The best approach to increase redox potential was by distortion of the dihedral angle  $\omega$ , rationalized as a decrease in the overlap of imidazole orbitals in the redox-active molecular orbital ( $\beta$ -LUMO).



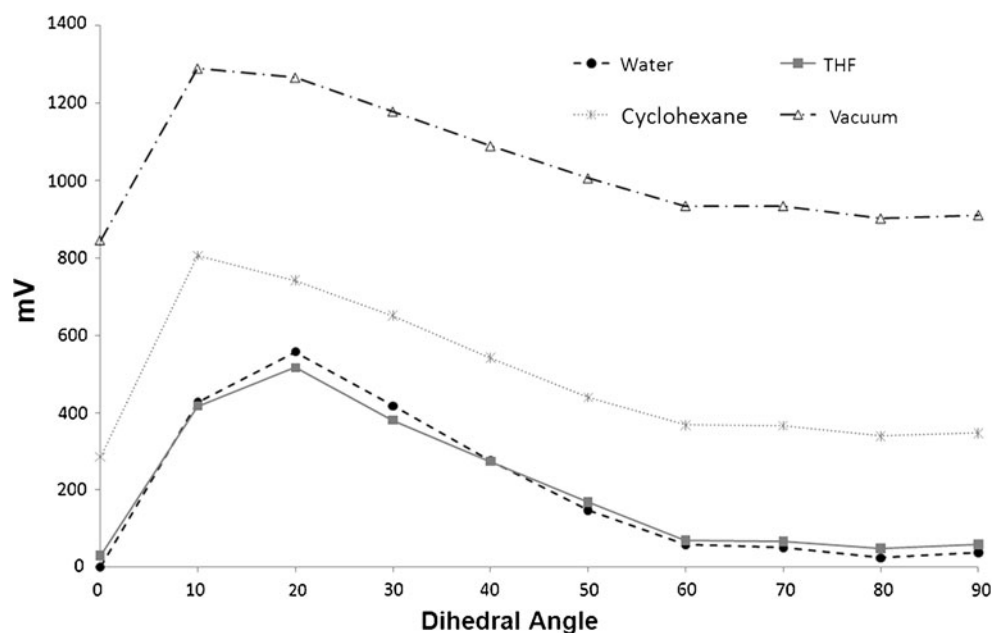
**Fig. 10**  $\beta$ -LUMO representation in conformation with  $\omega=0^\circ$ ,  $20^\circ$ , and  $90^\circ$ . *Top* Lateral view, *bottom* upper view

Another important result was the characterization of two minima, and the transition state between them for the first coordination sphere of T1 Cu site. According to the energy barrier between these two structures, they might be in equilibrium at room temperature in the absence of external restrictions (protein tensions). Hence, it is proposed that the laccase of *T. versicolor* restricts the T1 Cu site to adopt just the minimum 1 state.

The two minima described above can be distinguished clearly in terms of molecular orbitals. For minimum 1, the Cu–S interaction can be described as predominantly  $\pi$  in nature, whereas the minimum 2 is better described as a pseudo- $\sigma$  interaction.

It was shown that the T1 Cu site redox potential during distortions follows the same pattern either in vacuum or in solution.

**Fig. 11** Redox potential values of the T1 Cu model during the dihedral angle ( $\omega$ ) distortion in three different solvents (water, tetrahydrofuran and cyclohexane)



**Acknowledgments** We acknowledge the support of the Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, from Universidad Nacional Autónoma de México, for the use of the supercomputer KanBalam and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for a doctoral scholarship. We also thank L.I. Victor Manuel Gómez for his valuable technical support.

## References

- Palmer AE, Randall DW, Xu F, Solomon EI (1999) Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type I copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand. *J Am Chem Soc* 121:7138–7149. doi:10.1021/ja991087v
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96:2563–2605. doi:10.1021/cr950046o
- Shleev SV, Morozova OV, Nikitina OV, Gorshina ES, Rusinova TV, Serezhenkov VA, Burbaev DS, Gazaryan IG, Yaropolov AI (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86:693–703. doi:10.1016/j.biochi.2004.08.005
- Solomon EI, Szilagyi RK, George SD, Basumallick L (2004) Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins. *Chem Rev* 104:419–458. doi:10.1021/cr0206317
- Li H, Webb SP, Ivancic J, Jensen JH (2004) Determinants of the relative reduction potentials of type I-copper sites in proteins. *J Am Chem Soc* 126:8010–8019. doi:10.1021/ja049345y
- Christensson A, Dimcheva N, Ferapontova E, Gorton L, Ruzgas T, Stoica L, Shleev S, Haltrich YAD, Thorneley R, Aust S (2004) Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanalysis* 16:1074–1092. doi:10.1002/elan.200403004
- Ryde U, Olsson MHM, Pierloot K, Roos BO (1996) The cupric geometry of blue copper proteins is not strained. *J Mol Biol* 261:586–596. doi:10.1006/jmbi.1996.0484
- Malstrom BG (1994) Rack-induced bonding in blue-copper proteins. *Eur J Biochem* 223:711–718. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19044.x
- Williams RJP (1995) Energised (entatic) states of groups and of secondary structures in proteins and metalloproteins. *Eur J Biochem* 234:363–381. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.363\_b.x
- Comba P, Müller V, Remenyi RJ (2004) Interpretation of the temperature-dependent color of blue copper protein mutants. *Inorg Biochem* 98:896–902. doi:10.1016/j.jinorgbio.2003.12.004
- Ryde U, Olsson MHM (1999) The influence of axial ligands on the reduction potential of blue copper proteins. *J Biol Inorg Chem* 4:654–663. doi:10.1007/s007750050389
- Pavelka M, Burda JV (2008) Computational study of redox active centres of blue copper proteins: a computational DFT study. *Mol Phys* 106:2733–2748. doi:10.1080/00268970802672684
- Holm H, Kennepohl P, Solomon EI (1996) Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem Rev* 96:2239–2314. doi:10.1021/cr950039o
- Palmer AE, Szilagyi RK, Cherry JR, Jones A, Xu F, Solomon EI (2003) Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type I Cu site. *Inorg Chem* 42:4006–4017. doi:10.1021/ic026099n
- Karlin KD, Dahlstrom PL, Hyde JR, Zubieta J (1980) Structural comparison of Cu<sup>I</sup> and Cu<sup>II</sup> complexes displaying analogous N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> co-ordination; X-ray analysis of tetracoordinate [Cu(pma)]BPh<sub>4</sub> and pentaco-ordinate [Cu(pma)SO<sub>4</sub>][pma=2-pyridylmethylbis-(2-ethylthioethyl)amine]. *J Chem Soc Chem Commun* 1980:906–908. doi:10.1039/C39800000906
- Brines LM, Shearer J, Fender JK, Schweitzer D, Shoner SC, Barnhart D, Kaminsky W, Lovell S, Kovacs JA (2007) Periodic trends within a series of five-coordinate thiolate-ligated [MII (SMe<sub>2</sub>N<sub>4</sub>(tren))]<sup>+</sup>(M = Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) complexes, including a rare example of a stable Cu<sup>I</sup>-thiolate. *Inorg Chem* 46:9267–9277. doi:10.1021/ic701433p
- Cao Y, Zheng Q, Chen C, Hu H, Huang Z (2004) Synthesis of a novel three-coordinate copper(I) complex: a structural mimic of the reduced form of type I site in copper protein. *Inorg Chim Acta* 357:316–320. doi:10.1016/S0020-1693(03)00469-9
- Jaguar, version 7.0 (2007) Schrödinger, New York
- Adamo C, Barone V (1999) Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *J Chem Phys* 110:6158–6170. doi:10.1063/1.3454734
- Vetere V, Adamo C, Maldivi P (2000) Performance of the ‘parameter free’ PBE0 functional for the modeling of molecular properties of heavy metals. *Chem Phys Lett* 325:99–105. doi:10.1016/S0009-2614(00)00657-6
- Hay PJ, Wadt WR (1985) Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J Chem Phys* 82:270–283. doi:10.1063/1.448799
- Hay PJ, Wadt WR (1985) Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J Chem Phys* 82:299–310. doi:10.1063/1.448975
- Holland PL, Tolman WB (1999) Three-coordinate Cu (II) complexes: structural models of trigonal-planar type I copper protein active sites. *J Am Chem Soc* 121:7270–7271. doi:10.1021/ja991533e
- Holland PL, Tolman WB (2000) A structural model of the type I copper protein active site: N<sub>2</sub>S(thiolate)S(thioether) ligation in a Cu (II) complex. *J Am Chem Soc* 122:6331–6332. doi:10.1021/ja001328v
- Uudsema M, Tamm T (2003) Density-functional theory calculations of aqueous redox potentials of fourth-period transition metals. *J Phys Chem A* 107:9997–10003. doi:10.1021/jp0362741
- Piontek K, Antorini M, Choinowski TJ (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Biol Chem* 277:37663–37669. doi:10.1074/jbc.M204571200
- Namazian M, Coote ML (2007) Accurate calculation of absolute one-electron redox potentials of some *para*-quinone derivatives in acetonitrile. *J Phys Chem A* 111:7227–7232. doi:10.1021/jp0725883
- Hakulinen N, Kruus K, Koivula A, Rouvinen J (2006) A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochim Biophys Acta* 350:929–934. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.144
- Datta SN, Sudhamsu J, Pandey A (2004) Theoretical determination of the standard reduction potential of plastocyanin in vitro. *J Phys Chem B* 108:8007–8016. doi:10.1021/jp0307452
- Tannor DJ, Marten B, Murphy R, Friesner RA, Sitkoff D, Nicholls A, Ringnalda M, Goddard WA, Honig B (1994) Accurate first principles calculation of molecular charge distributions and solvation energies from ab initio quantum mechanics and continuum dielectric theory. *J Am Chem Soc* 116:11875–11882. doi:10.1021/ja00105a030
- Marten B, Kim K, Cortis C, Friesner RA, Murphy RB, Ringnalda MN, Sitkoff D, Honig B (1996) New model for calculation of



- solvation free energies: correction of self-consistent reaction field continuum dielectric theory for short-range hydrogen-bonding effects. *J Phys Chem* 100:11775–11788. doi:[10.1021/jp953087x](https://doi.org/10.1021/jp953087x)
32. Evans D (2008) One-electron and two-electron transfer in electrochemistry and homogeneous solution reactions. *Chem Rev* 108:2113–2144. doi:[10.1021/cr068066l](https://doi.org/10.1021/cr068066l)
33. Olsson M, Hong G, Warshel A (2003) Frozen density functional free energy simulations of redox proteins: computational studies of the reduction potential of plastocyanin and rusticyanin. *J Am Chem Soc* 125:5025–5039. doi:[10.1021/ja0212157](https://doi.org/10.1021/ja0212157)
34. Stephens PJ, Jollie DR, Warshel A (1996) Protein control of redox potentials of iron sulfur proteins. *Chem Rev* 96:2491–2513. doi:[10.1021/cr950045w](https://doi.org/10.1021/cr950045w)
35. Kitajima N (1992) Synthetic approach to the structure and function of copper proteins. *Adv Inorg Chem* 39:1–77. doi:[10.1016/S0898-8838\(08\)60258-5](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60258-5)

---

# Analysis of Structural Factors Related to Spectroscopic Data and Redox Potentials of CuT1 Models Through DFT Tools

---

HUGO VÁZQUEZ-LIMA, PATRICIA GUADARRAMA

*Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-360, CU, Coyoacán, México DF 04510, México*

*Received 6 January 2011; accepted 24 March 2011*

*Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).*

*DOI 10.1002/qua.23130*

---

**ABSTRACT:** Six complexes, mimics of T1 Cu active site, were studied under the density functional theory framework and their redox potentials were theoretically estimated with an average error of 0.095 V. Among different functionals, the hybrid functional PBE0 gave the best results to reproduce geometric parameters and to estimate redox potentials. The use of computational methods allowed the identification of relevant structural factors to rationalize spectroscopic and redox potential measurements. The inclusion of explicit molecules of solvent (tetrahydrofurane) showed that only those complexes with net positive charge exhibit coordination with the solvent. The consideration of such interaction permits the correct estimation of redox potentials. When the equilibrium between possible coordination isomers of T1 Cu models is taken into account, a reinterpretation of spectroscopic data (EPR and UV-vis) is possible. These equilibria are governed mainly by entropic contributions and the solvation energy. ©2011 Wiley Periodicals, Inc. *Int J Quantum Chem* 000: 000–000, 2011

**Key words:** DFT; redox potentials; T1 Cu site; coordination isomers; laccases

---

## Introduction

Laccases, a family of multicopper oxidases found in bacteria, fungi, plants, and insects,

*Correspondence to:* P. Guadarrama; e-mail: patriciagua@iim.unam.mx

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

have three types of copper sites, according to their spectroscopic features [1]. Particularly, the T1 Cu site, responsible for the blue color of these enzymes when oxidized, has been extensively studied, and is a recurrent motif found in proteins involved in redox processes [2]. The copper atom in this site is coordinated to two residues of histidine (His) and one of cysteine (Cys), in an unusual trigonal geometry. In some cases a fourth



ligand (typically methionine thioether) is present at long distances (2.6–2.9 Å).

Many efforts have been made, from different angles, to try to understand the action mechanisms of active sites of copper. A strategy has been the inclusion of those main features of active sites in synthetic models to achieve a deeper understanding from the structural and electronic standpoint.

In this regard, Holland and Tolman have made significant contributions with the synthesis of the first  $\text{Cu}^{2+}$ -complex with trigonal-planar structure, including a thiolate moiety that mimics the trigonal T1 Cu site present in laccases of high redox potential [3, 4]. After spectroscopic characterization, the trigonal planar geometry, similar to that observed for the proteinic three-coordinate T1 Cu site, was confirmed.

Despite the structural similarity, the redox potential of the synthetic models measured in tetrahydrofuran (THF) is much lower ( $E_{1/2} = -0.18$  V vs. NHE), when compared with the tricoordinated fungal laccase ( $> +0.7$  V), presumably due to the charge donation by the anionic ligands. Later on, another tricoordinated copper model, including a histidine-cysteine bridged dicopper array, was prepared, characterized, and its redox potential was measured by cyclic voltammetry [5]. Low values are reported:  $-0.986$  and  $-0.108$  V (vs.  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ). One of the most important contributions of the synthetic models described so far is the generation of experimental electrochemical data, directly related with the most important application of this kind of systems: the catalytic oxidation of several harmful substrates [6] with the concomitant reduction of  $\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$ . Cyclic voltammetry provides an experimental means for the measurement of redox potentials when the electron-transfer process is reversible. In this sense, additional data were obtained from voltammetry experiments on novel three-coordinated  $\text{Cu}^{2+}$ -phenolates, isolated and characterized [7]. The observed negative potentials are consistent with the expected electron donating effect of the ligands, stabilizing preferably the oxidized state of the metal.

From the theoretical point of view, the experimental information is a valuable source of feedback to validate methods. Using quantum chemistry tools is possible to reproduce redox potentials and get further information regarding structural characteristics that can be missed by spectroscopic common tests. Ultimately, the theoretical calculations can acquire a predictive character on other new active molecular systems.

Different theoretical approximations based on LUMO energies, electron affinities in gas phase or free energies in solution have been employed to estimate redox potentials. Also the inclusion of available experimental data (solvation energies or ionization potentials in gas phase) to the calculations has been used [8]. Whatever the approximation chosen, the values obtained are generally validated by plotting the experimental data versus the calculations. An acceptable methodology will generate a slope close to 1; the closest to 1 is this value, the higher the quality of the methodology to estimate redox potentials.

If a good quality of the methodology to calculate redox potentials is assured, other issues like the role played by the surroundings of T1 Cu site on the redox potential of the protein can be addressed with greater certainty to ultimately try to answer intriguing questions [9] like: Why several proteins containing active sites like T1 Cu, having the same spectroscopic patterns, have different redox potentials?

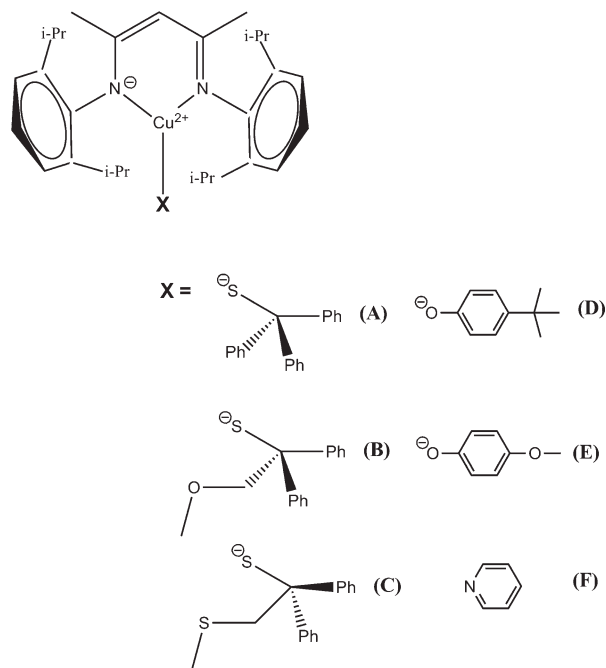
In this study, based on the DFT level of theory, the experimental redox potentials of six complexes mimics of the T1 Cu active site were reproduced in solution, following a methodology that allows an average error of 0.095 V. Taking advantage of quantum chemistry tools, a deeper insight into some structural characteristics was also addressed, underlining some peculiarities not explained spectroscopically, that might have impact on the experimental interpretation as well as on the redox potentials measurements.

---

## Methods

Six copper models previously synthesized (A-F, Fig. 1) were taken into account in the present study [3–5, 7].

Among the DFT functionals M05, B3LYP, BP86, and PBE0 [10], it was previously determined that PBE0 reproduces quite well the most important crystallographic distances in copper complexes, in combination with LACVP\*\* basis set [11, 12]; thus all the copper models (A to F) in both copper oxidation states,  $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , were fully optimized at PBE0/LACVP\*\* level included in Jaguar program version 7.0 [13]. As the experimental determinations of redox potentials were made in THF as solvent, the optimizations were also carried out in the presence of explicit molecules of THF to



**FIGURE 1.** Synthetic models reported by Tolman.

discard or confirm a possible complexation of solvent molecules to copper. The redox potential calculations were carried out according to the thermodynamic cycle shown later [14], where the ferrocene/ferrocenium ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) redox pair was taken as reference system.

The solvation energies were calculated with the Poisson-Boltzmann model [15, 16] to obtain the free energies in solution as:

$$\Delta G_{\text{Sol}}^{\circ} = \Delta G_{\text{g}}^{\circ} + \Delta G_{\text{Solv}}^{\circ}(\text{Cu}^{+}) + \Delta G_{\text{Solv}}^{\circ}(\text{Ferrocenium}) - \Delta G_{\text{Solv}}^{\circ}(\text{Cu}^{2+}) - \Delta G_{\text{Solv}}^{\circ}(\text{Ferrocene}) \quad (1)$$

**TABLE I**

**Deviation of distances (in Å) of fully optimized structures of complexes A-F at PBE0/LACVP\*\* level versus crystallographic data.**

X	Cu-N (1)			Cu-N (2)			Cu-X ; X = S, O or N			Cu-S from tioether		
	Crystal	PBE0	Difference	Crystal	PBE0	Difference	Crystal	PBE0	Difference	Crystal	PBE0	Difference
(A) S(CPh <sub>3</sub> )	1.921	1.950	-0.029	1.923	1.964	-0.041	2.124	2.190	-0.066			
(B) S(CPh <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> )	1.900	1.950	-0.050	1.908	1.962	-0.054	2.119	2.190	-0.071			
(C) S(CPh <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub> )	1.952	1.992	-0.040	1.987	2.024	-0.037	2.242	2.295	-0.053	2.403	2.554	-0.151
(D) OPh- <i>t</i> -Butyl	1.869	1.906	-0.037	1.896	1.950	-0.054	1.817	1.835	-0.018			
(E) OPh-OMethyl	1.864	1.911	-0.047	1.888	1.957	-0.069	1.806	1.838	-0.032			
(F) Pyridine <sup>a</sup>	1.947	1.970	-0.023	1.947	1.993	-0.046	1.947	1.993	-0.046			

<sup>a</sup> Complex **F** is the only one whose crystallographic structure corresponds to  $\text{Cu}^+$ .

To eventually calculate the redox potentials as:

$$E^{\circ} = \Delta G_{\text{Sol}}^{\circ} / nF \quad (2)$$

where  $n$  is the number of transferred electron and  $F$  is the Faraday constant. As the reference value of  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  is included in Eq. (1), there is no need to add any other reference in Eq. (2).

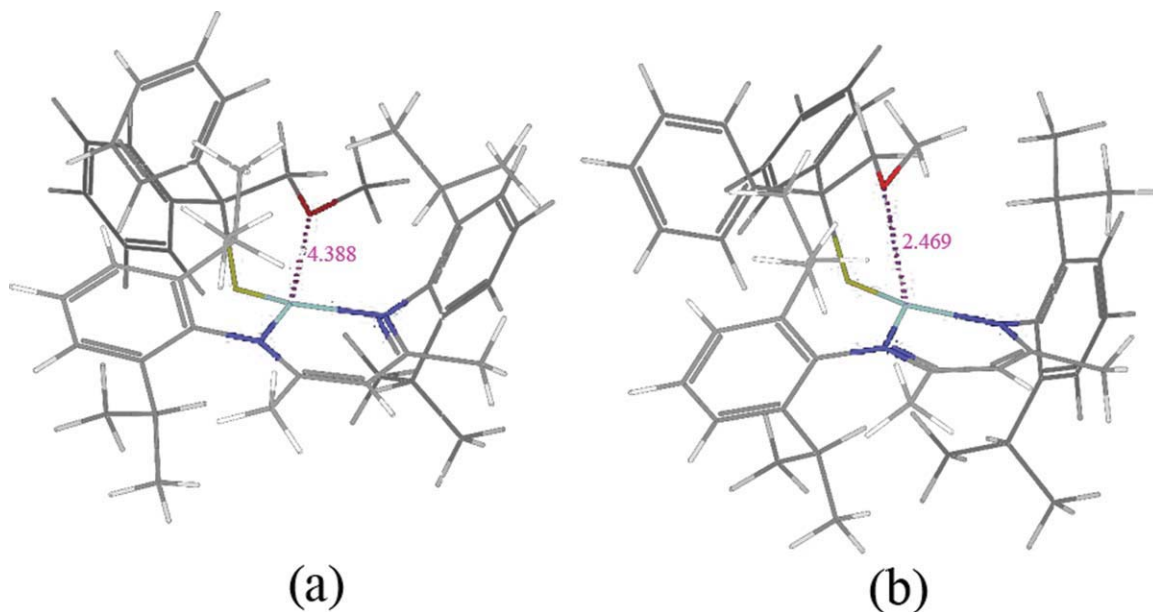
## Results and Discussion

Table I shows the geometric deviations between fully optimized structures and the crystallographic ones.

From Table I, DFT gives a rather good description, within the acceptable error for metallic complexes [17]. In general,  $\text{Cu}-\text{N}$  distances from the ligand are better reproduced than  $\text{Cu}-\text{X}$  distances from the substituents. In case of complex **B**, after full optimization are observed two minima energetically separated by 2 kcal/mol [(a) and (b) in Fig. 2], whose main difference is the distance between the copper and the oxygen of the pendant substituent.

Even though the structure of minor energy corresponds to the complex where the pendant ether is coordinated to the  $\text{Cu}^{2+}$  ion [structure (b) in the figure], the structure (a) and the crystallographic structure coincide better. Thus, the geometric validation in this case was made taking into account not the global minimum structure but the other minimum [structure (a)] most related with the crystallographic structure.

The optimization of the complexes in the presence of explicit molecules of solvent (THF)



**FIGURE 2.** Two minima obtained for complex **B**. (a) tricoordinated complex, (b) tetracoordinated complex. Cu—O<sub>ether</sub> distances (Å) are shown in pink. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

suggests that the coordination between the oxygen of the THF and the copper turns out to be poorly favored, except for oxidized complex **F** with X = pyridine, where the Cu—O<sub>THF</sub> distance is 2.21 Å, which could affect the redox potential. Figure 3 shows the Cu<sup>2+</sup> coordination with one molecule of THF on complex **F**, in contrast with that observed for other complexes (for example complex **D**) where the molecules of THF interact in a very weak way, only at dipole–dipole level, similar to what might happen between molecules of THF themselves.

To quantify the interaction Cu—O<sub>THF</sub>, the interaction energies for all complexes were calculated and corrected due to the basis set superposition error (BSSE) by the Counterpoise protocol [18] (see Supporting Information).

For complexes **A–E**, the corrected interaction energies are equivalent to dipole–dipole and ion–dipole interactions (around 1–3 kcal) but in case of complex **F**, a sum of coordination and ion–dipole interactions for Cu<sup>2+</sup> is observed ( $E_{\text{interaction}} = -7.29$  kcal/mol), where ~6 kcal/mol can be attributed to a coordination interaction (only with one molecule of THF) and the rest to ion–dipole and dipole–dipole interactions.

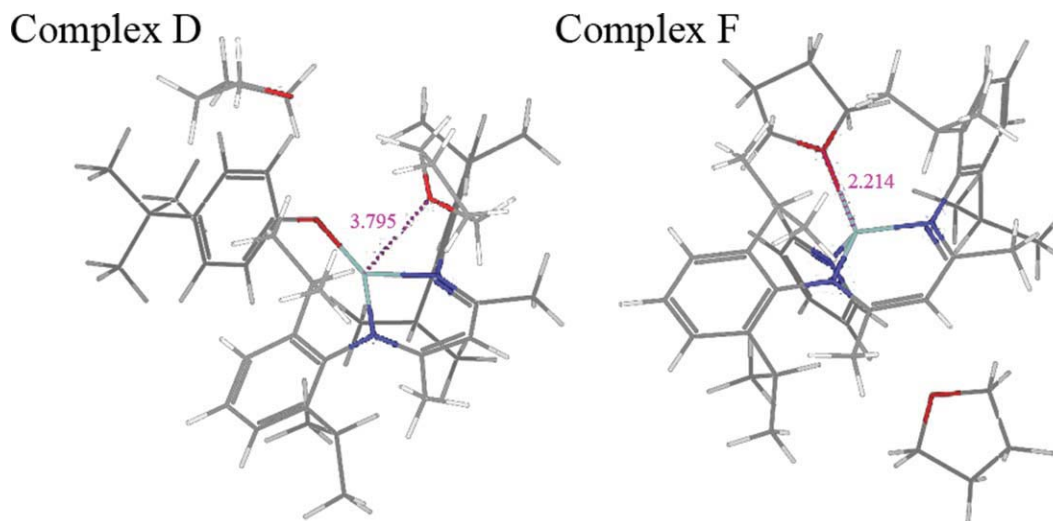
Therefore, the solvation energies and the subsequent calculation of redox potentials were done in

absence of explicit molecules of solvent, except for complex **F**.

### Redox Potential Calculations

Following the thermodynamic cycle from Scheme 1, and starting with the optimized geometries, single point frequency calculations at PBE0/LACVP\*\*++ level were carried out to obtain  $\Delta G_g^0$  values. Optimization calculations in solution (Poisson–Boltzmann model) were carried out to obtain  $\Delta G_{\text{Sol}}^0$  values. It should be mentioned that in these calculations are included diffuse basis (++) for better energy estimation. According to the equations 1 and 2 mentioned before, the redox potentials ( $E^0$ ) were calculated (see Table II).

The followed methodology allows obtaining a maximum deviation of 0.149 V from experimental data. The reproduction of redox potentials versus ferrocene in different nonaqueous solvents can have errors as high as 0.16 V [8]; the highest error from Table II is below this value. Other parameters such as average error and the slope of the curve obtained by plotting calculated versus experimental data indicate a good correlation between experiment and calculations (see later).



**FIGURE 3.** Two forms of THF interaction with the studied complexes. Left: no coordination interaction between complex **D** and THF. Right: coordination interaction between complex **F** and THF. Cu–OTHF distances (Å) are shown in pink. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

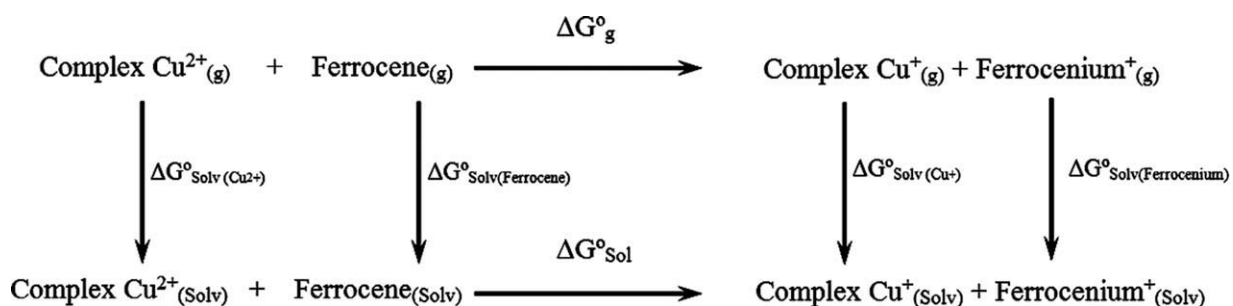
To explore a possible improvement of the calculated redox potential, besides PBE0, other functionals like BP86, M05, B3LYP and a hybrid functional proposed by Szilagy et al. [19] were tested with the basis set LACVP\*\*++ to carry out single point calculations to obtain the electronic energies in gas phase. The solvation energies were also calculated with several functionals but practically the same results are obtained.

Thus, taking into account the zero point energies previously calculated with PBE0 (according to the procedure followed by Cramer-Truhlar [20]) to obtain  $\Delta G_{\text{g}}^{\circ}$ , and the solvation energies also calculated with PBE0, the redox potentials were estimated with different functionals and the values were graphed against experimental data to use the slopes as criterion of good correlation [8] (see Fig. 4).

The calculated slope on each case, as well as the average error (obtained as the average of the difference between experimental and calculated redox potential of each complex) are shown in Table III.

According to Table III, the best correlation is obtained by the functional proposed by Szilagy. M05 and PBE0 provide a slight deviation from the ideal behavior (slope = 1); B3LYP and BP86 have the largest deviation among the functionals tested but still provide a good reproduction. Regarding the average error, PBE0 offers the minimum value. Taking into account both parameters, PBE0 was selected as the more suitable functional for redox potentials estimation for the series of complexes under study.

Taking advantage of the simulations, different coordination isomers can be recognized for the same complex, as will be shown later, varying



**SCHEME 1.** Thermodynamic cycle;  $\Delta G_{\text{g}}^{\circ}$  = free energy variation in gas phase;  $\Delta G_{\text{Solv}}^{\circ}$  = Solvation energy of gas phase species;  $\Delta G_{\text{Sol}}^{\circ}$  = free energy variation in solution.

**TABLE II**  
Redox potential calculations at PBE0/LACVP\*\*++ level.

Complex	A	B	C	D	E	F
$\Delta G_g^\circ$ (kcal/mol)	85.0	82.9	83.4	87.4	89.5	13.7
$\Delta G_{\text{Solv}(\text{CuI})}^\circ + \Delta G_{\text{Solv}(\text{Ferrocenium})}^\circ$ (kcal/mol)	-74.4	-76.5	-77.2	-76.5	-79.5	-50.6
$\Delta G_{\text{Solv}(\text{CuII})}^\circ + \Delta G_{\text{Solv}(\text{Ferrocene})}^\circ$ (kcal/mol)	-12.2	-13.1	-13.4	-11.2	-12.2	-36.2
$\Delta G_{\text{Sol}}^\circ$ (kcal/mol)	22.9	19.4	19.6	22.1	22.3	-0.6
$E^\circ$ calculated (Volts)	-0.991	-0.843	-0.851	-0.958	-0.966	0.028
$E^\circ$ experimental (Volts)	-0.986	-0.920	-1.000	-1.080	-1.060	-0.108
Difference (Volts)	0.005	-0.077	-0.149	-0.122	-0.094	-0.136

only by a few kcal/mol in energy, and interestingly, these coordination isomers can be correlated with experimental observations.

From Figure 1, complexes **B** and **C** exhibit two possible coordination isomers in both copper oxidation states, I and II (see Supporting Information), corresponding to the occurrence or not of a complexation between copper and the flexible moieties of methylether (complex **B**) or methylthioether (complex **C**) to achieve either a tricoordinated or a tetracoordinated arrangement. The predominance of one of the arrangements can be related with spectroscopic properties and redox potentials. The energy of each coordination isomer may be influenced by several factors including: (i) steric hindrance (the voluminous main ligand was intended to favor the tricoordination, thus the tetracoordination should be marginal); (ii) number of ligands (in case of  $\text{Cu}^{2+}$ , the tetracoordination increases the cation stability); (iii) entropic contribution (the tetracoordination diminishes the degrees of freedom of the complex and therefore the entropic contribution to the free

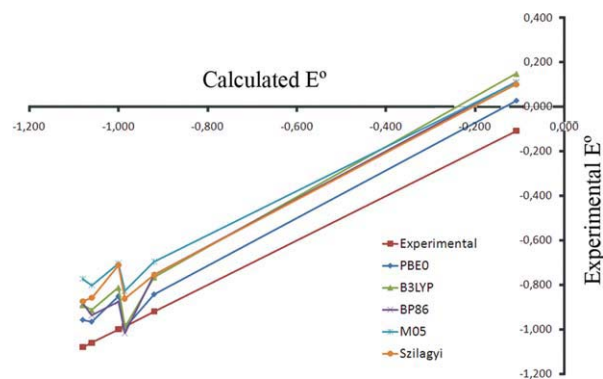
energy; and (iv) solvent polarization (the complex that achieves a better polarization of the medium will turn out to be benefited by the solvation energy).

The coexistence of the tri and tetracoordination was evaluated by Boltzmann distributions in three different scenarios: (1) at low temperature (20 K) since experiments like EPR takes place at these temperatures; (2) at room temperatures to correlate with UV-vis experiments; and (3) at room temperature in solution (THF) to correlate with redox potential measurements. The calculated distributions are shown in Table IV.

As expected for complexes **B** and **C** with  $\text{Cu}^+$  (net charge of  $-1$ ), additional electron pairs from extra ligands are naturally repelled, thus the tetracoordination is not favored; nevertheless, in the presence of a polarizable medium like the continuum solvent, a small percentage of tetracoordination appears since the charges repulsion can, in some way, be assimilated by the distortion of such medium.

In case of  $\text{Cu}^{2+}$  complexes, when the solvation is involved, the tricoordination is favored presumably because the tetracoordination reduces the cation exposition to the solvent, decreasing its polarization, in contrast to what happen in the tricoordinated complexes.

When the Boltzmann distributions are estimated at different temperatures, the populations



**FIGURE 4.** Redox potentials reproduction by different DFT functionals. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

**TABLE III**  
Slops and average error (V) for each functional in the calculation of redox potentials.

Funcional	Slop	Average error
PBE0	1.05	-0.10
B3LYP	1.12	-0.16
BP86	1.11	-0.13
M05	0.95	-0.24
Szilagy	1.01	-0.20



**TABLE IV**  
**Boltzmann distributions<sup>a</sup> for complexes B and C in vacuum at 20 K, 298 K and in solution (THF) at 298 K.**

	Oxidation state	Coordination number	% in vacuum at 20 K	% in vacuum at 298 K	% in THF at 298 K
Complex B	Cu I	4	0.000	0.002	12.060
		3	100.000	99.998	87.940
	Cu II	4	0.000	7.718	1.991
Complex C	Cu I	3	100.000	92.282	98.009
		4	0.000	0.010	0.001
	Cu II	3	100.000	99.990	99.999
		4	100.000	48.807	27.067
		3	0.000	51.193	72.933

<sup>a</sup> Boltzmann distribution were calculated with the formula:  $\frac{N_i}{N} = \frac{g_i \exp(-E_i/kT)}{\sum_j g_j \exp(-E_j/kT)}$

$g_i$ : degeneration state of the  $i$ th state;  $g = 1$  in the studied cases.

$E_i$ : Energy of the  $i$ th state; substituted by  $G_{\text{THF}}$  (298°K),  $G_{\text{Vacuum}}$  (298°K) or  $G_{\text{Vacuum}}$  (20°K) in each case.

$k$ : Boltzmann constant.

$T$ : Temperature.

depend on the variation of the entropic term  $-TS$  of the Gibbs free energy. In case of complex **C** with  $\text{Cu}^{2+}$ , a decrement in temperature favors the tetracoordination. In terms of energy, the free energy difference between tetra and tricoordinated complex ( $\Delta G_{\text{tetracoordination-tricoordination}}$ ) is 0.3 kcal/mol at 298 K and  $-1.5$  kcal/mol at 20 K, denoting a major stabilization of tetracoordinated complex at lower temperatures. Thus, even though the tetracoordination stabilizes the  $\text{Cu}^{2+}$  cation, the entropic contribution at 298 K of the tricoordinated complex is enough to equal the populations in vacuum.

For complex **B**  $\text{Cu}^{2+}$ , although the  $\Delta G_{\text{tetracoordination-tricoordination}}$  difference decreases at lower temperatures (from 1.5 kcal/mol at 298 K to 0.8 kcal/mol at 20 K), the population of tetracoordination goes down and the tricoordination prevails. When two states with different energy are present, the probability that the most destabilized state contributes to the total Boltzmann population decreases as the temperature descends; thus, in this case the probability to find the complex in a local minimum with energy higher than a global minimum decreases as the temperature falls down.

It is important to underline that the tricoordinated species are always the predominant ones in solution (THF), thus the possible equilibrium with the tetracoordinated complexes might not be relevant for redox potential calculations; however, is of interest to explain some spectroscopic aspects of complexes **B** and **C** [4]. The UV-vis

absorption spectra for the complexes **A**, **B**, and **C** show maxima in  $\lambda_{\text{max}} = 749$  nm ( $\epsilon = 5,800$ ),  $\lambda_{\text{max}} = 738$  nm ( $\epsilon = 5,600$ ), and  $\lambda_{\text{max}} = 538$  nm ( $\epsilon = 2,100$ ) and  $\lambda_{\text{max}} = 691$  nm ( $\epsilon = 2,300$ ), respectively. The experiments were carried out at room temperature in nonpolar solvents (heptanes, pentane and toluene), which might be related with the Boltzmann distributions in vacuum at 298 K from Table IV. From the experiment is discussed that the maxima for complexes **A** and **B** are very similar as the tricoordinated structure of both complexes is comparable. In the estimated Boltzmann distribution for complex **B**, there is a patent dominance of the tricoordinated specie (more than 90%) which agrees quite well with the experimental observation. On the other hand, in case of complex **C** two absorption maxima of similar intensity in the UV-vis spectrum were observed. In general this kind of absorptions is attributed to the ligand-metal charge transfer ( $\text{S} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ ). Experimentally these absorption bands were explained as the Cu-S distance elongation, with the concomitant decrement of charge transfer, due to the tetracoordination. From the calculations, this complex exhibited equivalent Boltzmann weighting for tri and tetracoordination at room temperature (see Table IV). Since the surroundings of the sulfur atom from thiolate groups are different in each case, the two maxima experimentally observed might be explained by the occurrence of both coordination isomers.

Regarding the EPR experiments carried out at low temperatures, as was mentioned before, they can be related with calculations at 20 K showed in Table IV. In these conditions, complex **B** is found exclusively as tricoordinated while complex **C** as tetracoordinated, which is in excellent agreement with that observed experimentally [4] where only appear signals for one specie: the tricoordinated for complex **B** and tetracoordinated for complex **C**.

These theoretical precisions about the predominant coordination number allow us to state that even though the spectroscopies assign the tetra-coordination for complex **C**, the redox potential in THF actually was determined for the tricoordinated specie.

---

## Conclusions

Redox potentials of synthetic mimics of T1 Cu site were theoretically reproduced with an average error of 0.095V. Within DFT framework, different functionals were tested and the best results in both, geometric description and redox potentials estimation was the hybrid functional PBE0.

The use of computational methods allows the incorporation of solvent explicit molecules (THF) and, as a result, it was possible to identify that only those complexes with net positive charge exhibit coordination with the solvent. This is the case of oxidized complex **F**.

The interpretation of spectroscopic data must be complemented with the analysis of possible coordination isomers, as was corroborated for complexes **B** and **C**. In these two cases, the entropic contributions and the solvation energy modify the equilibrium of the coordination isomers when different conditions are used as occur in different spectroscopies (EPR and UV-vis) or redox potentials determinations. Thus, the coexistence of coordination isomers seems to be responsible of the appearance of UV-vis spectra, and not the Cu-S distance elongation, as was established before.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of DGSCA, UNAM, for the use of the supercomputer KanBalam and CONACYT for doctoral scholarship.

---

## References

- Palmer, A. E.; Randall, D. W.; Xu, F.; Solomon E. I. *J Am Chem Soc* 1999, 121, 7138.
- Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; George, S. D.; Basumallick, L. *Chem Rev* 2004, 104, 419.
- Holland, P. L.; Tolman, W. B. *J Am Chem Soc* 1999, 121, 7270.
- Holland, P. L.; Tolman, W. B. *J Am Chem Soc* 2000, 122, 6331.
- Lee, W.-Z.; Tolman, W. B. *Inorg Chem* 2002, 41, 5656.
- Shleev, S. V.; Morozova, O. V.; Nikitina, O. V.; Gorshina, E. S.; Rusinova, T. V.; Serezhenkov, V. A.; Burbaev, D. S.; Gazaryan, I. G.; Yaropolov, A. I. *Biochimie* 2004, 86, 693.
- Jazdzewski, B. A.; Holland, P. L.; Pink, M.; Young, V. G.; Spencer, D. J.; Tolman, W. B. *Inorg Chem* 2001, 40, 6097.
- Evans, D. H. *Chem Rev* 2008, 108, 2113.
- Quintanar, L.; Stoj, C.; Taylor, A. B.; Hart, P. J.; Kosman, D. J.; Solomon, E. I. *Acc Chem Res* 2007, 40, 445.
- Adamo, C.; Barone, V. *J Chem Phys* 1999, 110, 6158.
- Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J Chem Phys* 1985, 82, 270.
- Vázquez-Lima, H.; Guadarrama, P.; Martínez-Anaya, C. *J Mol Model* (in press).
- Jaguar, version 7.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007.
- Felton, G. A.; Vannucci, A. K.; Chen, J.; Lockett, L. T.; Okumura, N.; Petro, B. J.; Zakai, U. I.; Evans, D. H.; Glass, R. S.; Lichtenberger, D. L. *J Am Chem Soc* 2007, 129, 12521.
- Marten, B.; Kim, K.; Cortis, C.; Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Ringnalda, M. N.; Sitkoff, D.; Honig, B. *J Phys Chem* 1996, 100, 11775.
- Tannor, D. J.; Marten, B.; Murphy, R.; Friesner, R. A.; Sitkoff, D.; Nicholls, A.; Ringnalda, M.; Goddard, W. A., III; Honig, B. *J Am Chem Soc* 1994, 116, 11875.
- Solomon, E. I.; Gorelsky, S. I.; Dey A. *J Comput Chem* 2006, 27, 1415.
- Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol Phys* 1970, 19, 553.
- Szilagyi, R. K.; Metz, M.; Solomon, E. I. *J Phys Chem A* 2002, 106, 2994.
- Winget, P.; Weber, E. J.; Cramer, C. J.; Truhlar D. G. *Phys Chem Chem Phys* 2000, 2, 1231.