



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL FLUJO ELECTRÓNICO DURANTE LA INACTIVACIÓN
DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PEROXIDASA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ABRAHAM MARCELINO VIDAL LIMÓN

TUTOR PRINCIPAL

DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
DRA. LILIANA QUINTANAR VERA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

MÉXICO, D. F. agosto, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Xavi y Santi <3 <3



El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt, en el departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La realización y desarrollo del proyecto, así como las becas mixtas para estancias de investigación y la manutención, fueron financiadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT 254125.

Se agradece de igual manera al apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, UNAM) para el financiamiento en Hardware (Clúster IBT) y Software (Qsite) para el desarrollo de esta tesis doctoral (Proyecto 201612).

De manera especial, se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, el cual financió congresos internacionales y estancias de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) – México, por cubrir, tanto la manutención como el apoyo financiero para desarrollar esta tesis doctoral (CVU 254125).

Agradezco a los miembros de mi jurado por sus comentarios y votos de confianza: Dra. Nina Pastor Colón, Dr. Eduardo Torres Ramírez, Dr. Gerardo Corzo Burguete, Dr. Edmundo Catillo Rosales y Dr. Enrique Rudiño Piñera.

De igual manera, agradezco a la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas - UNAM, por los apoyos otorgados para congresos nacionales e internacionales; la orientación oportuna y el espíritu de ayuda en todo momento. Gracias Norma Trejo, Jalil Saab, Antonio Guillén y Gloria Villa.

A los diferentes laboratorios y unidades de servicio del Instituto de Biotecnología, Instituto de Química, Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Química - UNAM para la realización de este trabajo.

De manera particular, quisiera agradecer el apoyo técnico a los siguientes académicos:

Biól. Rosa Román Miranda, IBT-UNAM.
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani, IBT-UNAM.
Dra. Marcela Ayala Aceves, IBT-UNAM.
Dr. Sergio Águila Puentes, CNyN-UNAM.
Dr. Joel Alderete Triviños, U. de Concepción, Chile.
Dr. Victor Guallar Tasies, BSC, España.
Dra. Martha Elena Sosa Torres, Fac. de Química, UNAM.
Dr. Jesús Aguirre Linares, IFC-UNAM.
Biól. A. Olivia Sánchez González, IFC-UNAM.
Dr. Pablo Rangel Silva, IFC-UNAM.
M.C. Jérôme Verleyen, IBT-UNAM.
Ing. Verónica Albiter Hernández, IBT-UNAM.
T.L. Fernando González Muñoz, IBT-UNAM.
M. en C. María Elena Rodríguez Alegría, IBT-UNAM.
Biól. Mario Alberto Caro Bermúdez, IBT-UNAM.
Biól. Raunel Tinoco, IBT-UNAM.
QFB. Myriam Ortiz, IBT-UNAM.
Ing. Leticia Olvera Rodríguez, IBT-UNAM.
M.C. Alejandro Olvera Rodríguez, IBT-UNAM.
Biól. Felipe Olvera Rodríguez, IBT-UNAM.
M.B. María Luisa Tabche Barrera, IBT-UNAM.
Biól. Elda Patricia Rueda Benítez, IBT-UNAM.
Biól. Sonia Rojas Trejo, IBT-UNAM.
Biól. Filiberto Sánchez López, IBT-UNAM.
Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez, IBT-UNAM.
Dr. R. Paul Gaytán Colín, IBT-UNAM.
M.C. Jorge A. Yáñez Ponce de León, IBT-UNAM.
Héctor Cardoso Torres, IBT-UNAM.
Dr. Alejandro Solano, Fac. de Química, UNAM.
Dr. Juan Pablo Saucedo Vázquez, Fac. de Química, UNAM.

Agradezco al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis doctoral. Siempre recordaré las enseñanzas, anécdotas, ejemplos y dedicación impresos a mi formación como investigador. ¡Gracias jefe!

Agradezco respetuosamente a mis comités tutores: Dr. Enrique Rudiño y Dra. Martha Sosa Torres (Maestría); Dra. Gloria Saab y Dra. Liliana Quintanar (Doctorado) por sus comentarios y críticas, siempre con el afán de enriquecer el proyecto.

Agradezco infinitamente a l@s recalcitrantes del laboratorio 12 Sur del IBT por su amistad, enseñanzas, excelentes ratos, horas de tensión(pre-tutorales) y horas felices (post-tutorales), así como la buena vibra que siempre imperó en nuestro lab: Rouss, Lucy, Marcela, Sergio, Andrés, Memo, Mayra, Lore S, Lore H, Cris U, Cris T, Martín, Estefa, Kari, Bere, Julio, Javier, Victoria, Yusimi, Dulce, Chucho y Joako. ¡Gracias amig@s!

Agradezco de manera muy particular al Dr. Sergio A. Águila Puentes, por ser mi gran amigo, tutor, ejemplo y compañero de mil aventuras y experimentos. Houston do u copy? : Te creí chimpático weón.

A Andrés y Guillermo, mis grandes amigos científicos del mundo-mundial, que más que ciencia, siempre terminábamos filosofando. Aprendí mucho de uds y lo sigo haciendo. Lore y Nena, gracias por casi-siempre sonreír con mis tonterías, por su amistad incondicional y por querer tanto a las papitas.

Lucy, Marcela y Rouss, gracias por enseñarme tanto y brindarme estos años de amistad y camaradería. Gracias por aguantar mis olvidadas de espectro encendido, mis cultivos de *Aspegillus* y mis litros y litros de cultivos de *E. coli*.

A mi amada Lu, gracias por aumentar la entropía de nuestra vida, por apoyarme en cada paso y por seguirme siempre la corriente cuando hablo de ciencia. Te amo preciosa.

A mis hijitos Xavier y Santiago, que algún día verán esta tesis y entenderán porque su padre hace dibujos tan horrendos. Estoy loco por los tres <3 <3.

A mi amada familia: mamá, papá, ena, beto y karla ¡¿Que sería de mi sin su apoyo y amor?! Gracias por confiar en mi y apoyarme en cada instante. Gracias por alentarme siempre a ser un científico loco más, por darme la mano siempre que caía y por celebrar siempre los buenos momentos. Los amo incondicionalmente.

Agradezco a tantos amigos que hice durante mis años en Cuernavaca, siempre los tendré en mi mente y corazón: Alexis y Luisa, César J, Gaby, Paty, Oscar, Everardo y Jaz, Ramcés, Alex Torres, Jérôme, Orlando, Almita, Juan, Rober, Fer y Gina, Karlita, Wera, Pancho, AniLú, Tabita, Mars, Agus, Michín, James y Mony, Lety, David, Toño, Dr. Alfredo Martínez, MaLe y Arturo, Aleja, Bere, Cessna, Lilu, Dario, Checho, Ori, Poncho, David, Georgie, Liliana, etc, etc...

TABLA DE CONTENIDOS

Abreviaturas	I
Índice de figuras y tablas	II
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Transferencia electrónica en hemo-proteínas.	1
<i>1.1.1. Fenómenos de transferencia de electrones en peroxidasas.</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. ¿Cómo contender con la inactivación suicida de las peroxidasas?.</i>	<i>7</i>
1.2. CYP_{BM3} de <i>Bacillus megaterium</i>.	
<i>1.2.1. Hacia un modelo eficiente para las reacciones peroxidasa/poroxigenasa.</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2. Mecanismo de reacción propuesto para los citocromos P450.</i>	<i>12</i>
1.3. Química computacional aplicada al estudio de sistemas biológicos.	
<i>1.3.1. El encuentro de dos mundos: Teóricos + Experimentalistas.</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2. Estudios mecánico cuánticos para entender la transferencia de electrones en citocromos P450. Algoritmo Et-pathway.</i>	<i>20</i>
1.4. Hipótesis	22
1.5. Objetivos	22
Capítulo 2. Metodología	
<i>2.1. Estudio químico computacional en citocromo P450_{BM3}. Simulación por dinámica molecular y estudios de la transferencia electrónica a nivel DFT y HF.</i>	<i>23</i>
<i>2.2. Determinación de residuos de aminoácido oxidados de una muestra de citocromo P450_{BM3} inactivada por H₂O₂ mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.</i>	<i>27</i>
<i>2.3. Mutagénesis sitio-dirigida de citocromo P450_{BM3}.</i>	<i>27</i>
<i>2.4. Expresión y purificación de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.</i>	<i>29</i>
<i>2.5. Determinación de la actividad enzimática, actividad residual y estabilidad del grupo hemo de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.</i>	<i>30</i>

<u>Capítulo 3. Validación de las herramientas desarrolladas.</u>	33
<i>3.1. El caso de la cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>. Avances y retos en el estudio de CPO.</i>	
<i>3.2. El caso del citocromo c estable. Usando herramientas QM/MM para entender el fenómeno de estabilización.</i>	39
<u>Capítulo 4. De la teoría al experimento.</u>	
<i>4.1. Análisis conformacional de citocromo P450_{BM3} mediante dinámica molecular.</i>	43
<i>4.2. Descripción de la multiplicidad del compuesto I de P450_{BM3}.</i>	44
<i>4.3. Rutas de transferencia electrónica en citocromo P450_{BM3}.</i>	46
<i>4.4. Selección de residuos de aminoácidos trascendentes para la inactivación suicida.</i>	53
<i>4.5. Transferencia electrónica en la doble mutante W96A /F405L.</i>	55
<u>Capítulo 5. Del experimento de vuelta a la teoría.</u>	
<i>5.1. Determinación de residuos de aminoácido oxidados en citocromo P450_{BM3} 21B3 inactivado por H₂O₂.</i>	57
<i>5.2. Mutagénesis sitio-dirigida en 21B3 P450_{BM3}.</i>	59
<i>5.3. Caracterización cinética y estabilidad de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.</i>	60
<u>Capítulo 6. Conclusiones y Perspectivas.</u>	65
<u>7. Referencias</u>	68
<u>8. Anexos</u>	74

ABREVIATURAS

Å	Ångstrom (1×10^{-10} m).
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico).
B3LYP	Funcional híbrido con tres parámetros de Becke y Lee-Yang-Parr
CCP	Citocromo c Peroxidasa.
CiP	Peroxidasa versátil de <i>Coprinus cinereus</i> .
CpdI	Compuesto I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ – porfirina $\cdot+$).
CpdII	Compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ – porfirina).
CpdIII	Compuesto II ($\text{Fe}^{\text{II}}=\text{O}-\text{O}$ – porfirina).
CpdES	Compuesto I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ – aa $\cdot+$).
CPO	Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .
CYC	Citocromo c.
CYP	Citocromo P450.
DFT	Teoría del funcional de la densidad (del inglés <i>Density Functional Theory</i>).
EPR	Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (del inglés <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>).
HF	Método <i>ab initio</i> Hartree-Fock
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
kDa	Kilodalton (Unidad de masa atómica aproximadamente equivalente la masa de 1000 átomos de hidrógeno).
LACVP	Base doble zeta combinada de 6–31G* y lan12dz para calcular átomos Na–La y Hf–Bi.
<i>m-cpba</i>	Ácido meta-cloroperbenzoico.
OPLS	Campo de fuerza optimizado para simulaciones líquidas.
P450 _{BM3}	Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i> BM3.
P450 _{cam}	Citocromo P450 de oxidante de alcanfor.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
QM/MM	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics.
RMSD	Desviación cuadrada promedio de las distancias atómicas (Å).
RMSF	Fluctuación cuadrada promedio de las distancia atómica (Å).
R _z	Coefficiente de Reinheitszahl.
SPC	Tipo de modelo de agua para tres sitios con ajuste de carga (del inglés <i>Single Point Charge</i>).
TIP3P	Modelo de molécula de agua con polarización de tres sitios.
VPB	Peroxidasa versátil de <i>Bjerkandera adusta</i> .

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig. 1.1. Diversidad estructural en la coordinación del átomo de Fe en las hemo- proteínas.....	1
Fig. 1.2. Mecanismo de reacción de las peroxidasas o de Poulos-Kraut.....	3
Tabla 1.1. Constantes catalíticas para H ₂ O ₂ de varias hemo proteínas.....	4
Fig. 1.3. Velocidades de transferencia de electrones y propiedades de conducción determinadas en estructuras de oxidorreductasas con múltiples sitios redox.....	5
Fig. 1.4. Flujos electrónicos presentes durante las reacciones de óxido- reducción en las peroxidasas.....	6
Fig. 1.5. Representación esquemática de la variante 21B3 P450 _{BM3}	11
Fig. 1.6. Detección de CpdES en P450 _{BM3} y P450 _{cam}	13
Fig. 1.7. Mecanismos de activación en citocromos P450 _{cam} y P450 _{BM3}	14
Fig. 1.8. Esquema general de los cálculos QM/MM en proteínas.....	18
Fig. 1.9. Ruta de transferencia de electrones entre la CCP-CYC.....	21
Fig. 2.1. Representación esquemática de las zonas QM y MM definidas para la enzima 21B3 P450 _{BM3}	23
Fig. 2.2. Estrategia de mutagénesis sitio-dirigida usada para generar las variantes de CYP 21B3.....	28
Tabla 2.1. Listado de oligonucleótidos sintetizados.....	28
Fig. 2.3. Ejemplo del ajuste matemático aplicado a los datos de cinética de saturación.....	31
Fig. 2.4. Ejemplo de la señal cuantificada en los ensayos de destrucción del grupo hemo.....	32
Tabla 3.1. Densidad de spin y el porcentaje de oxidación de cada residuo estudiado mediante QM/MM <i>Et-pathway</i>	35
Fig. 3.1. Representación gráfica de la población de spin en residuos seleccionados, calculada para el Cpd I de la cloroperoxidasa.....	36
Fig. 3.2. Ensayo de competencia entre el Cpd I y los tres residuos de W contiguos en CPO.....	37
Tabla 3.2. Densidad de spin y el porcentaje de oxidación de los residuos de W de CPO.....	37
Fig. 3.3. Rutas de transferencia electrónica en las variantes de citocromo c.....	41
Tabla 3.3. Constantes catalíticas calculadas para variantes de citocromo c.....	41

Fig. 4.1. Fluctuaciones atómicas promedio en la enzima 21B3 P450 _{BM3}	43
Fig. 4.2. Distribución de las conformaciones de 21B3 P450 _{BM3} durante la simulación..	44
Fig. 4.3. Probables estados de spin en el Fe hémico de los citocromos P450.....	45
Fig. 4.4. Probables estados de spin del CpdI y su modificación al incluir residuos vecinos en la región QM.....	45
Tabla 4.1. Residuos de aminoácidos pertenecientes a rutas de transferencia electrónica.....	46
Fig. 4.5. Ruta 1 estudiada por QM/MM <i>Et-pathway</i>	47
Fig. 4.6. Ruta 2 estudiada por QM/MM <i>Et-pathway</i>	48
Fig. 4.7. Ruta 3 estudiada por QM/MM <i>Et-pathway</i>	49
Fig. 4.8. Ruta 4 estudiada por QM/MM <i>Et-pathway</i>	50
Tabla. 4.2. Ensayos de competencia entre los aminoácidos de cada ruta.....	51
Fig. 4.9. Esquema de los residuos de aminoácidos de 21B3 P450 _{BM3} seleccionados para mutagénesis sitio-dirigida.....	52
Fig. 4.10. Esquema general de la selección de los residuos de aminoácidos de 21B3 P450 _{BM3} sujetos a mutagénesis sitio-dirigida.....	54
Tabla. 4.3. Descripción electrónica del CpdI de la doble mutante W96A/F405L.....	55
Tabla. 4.11. Rutas de transferencia en la doble mutante W96A/F405L.....	56
Fig. 5.1. Determinación de residuos oxidados en una muestra inactivada por H ₂ O ₂	57
Fig. 5.2. Fragmentos de DNA usados para la mutagénesis sitio-dirigida de 21B3 P450 _{BM3}	59
Tabla 5.1. Constantes catalíticas aparentes de las mutantes puntuales de 21B3 P450 _{BM3}	60
Fig. 5.3. Cinética de inactivación de las mutantes puntuales de 21B3 P450 _{BM3} en la oxidación de cloruro de pinacianol.....	63
Fig. 6.1. Mecanismo global de las reacciones de CYP P450 _{BM3}	66

RESUMEN

Se estudiaron los flujos electrónicos durante la inactivación por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) del dominio de unión al grupo hemo de la enzima citocromo P450_{BM3} 21B3 de *Bacillus megaterium*, empleando herramientas químico-computacionales híbridas de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM). Se determinaron diferentes rutas de transferencia de electrones, desde residuos expuestos a la superficie hasta el sitio activo de la enzima (compuesto I). Se determinaron las rutas de probables y los residuos de aminoácido claves en el proceso de transferencia, correlacionando con los diversos efectos encontrados en las mutantes puntuales generadas. Los resultados se discuten en términos del papel de la ruta durante la catálisis.

Para determinar la naturaleza de los aminoácidos oxidados durante la catálisis, una muestra de P450_{BM3} 21B3 completamente inactivada por H_2O_2 , fue analizada por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (LC/MS). Se determinaron como oxidados, 4 de 6 residuos aminoácidos descritos por las rutas de transferencia de electrones. De igual manera, se encontraron 4 residuos extra, susceptibles a oxidación y que no pudieron ser descritos en ninguna ruta.

Se generó la doble mutante W96A/F405L, la cual mantuvo su actividad peroxigenasa a niveles similares a la enzima parental 21B3, mientras que su estabilidad intrínseca aumentó significativamente, (>30 min) en presencia de 3 mM de H_2O_2 .

Se discuten los alcances y las posibles estrategias para continuar estabilizando la actividad peroxidasas de las mutantes puntuales generadas, así como la validación del algoritmo computacional en otras proteínas con actividad peroxidasa.

ABSTRACT

Combined quantum mechanical and molecular mechanical (QM/MM) calculations were used to explore the electron pathway involved in the suicide inactivation of cytochrome P450_{BM3} from *Bacillus megaterium*. An extensive mapping of residues involved in electron transfer routes was obtained from density functional theory calculations on activated heme (i.e. Compound I) and selected amino acid residues. Identification of oxidizable residues (electron donors) was performed by selectively activating/deactivating different quantum regions. This method allowed a rational identification of key oxidizable targets in order to replace them for less oxidizable residues by site-directed mutagenesis. Besides, mass spectrometry confirmed the sites of oxidation and corroborates the possible routes described by QM/MM *e*-pathways.

The residues W96 and F405 were consistently predicted by the QM/MM electron pathway to donate electron spin density; single and double mutants of P450_{BM3} on these positions (W96A, F405L, W96A/F405L) resulted in a more stable variant in the presence of hydrogen peroxide, displaying a similar reaction rate than P450_{BM3} 21B3. Furthermore, current limits are discussed on the light of rational improvement of peroxidases life-time.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Transferencia electrónica en hemo-proteínas.

Las hemo-proteínas son un conjunto heterogéneo de proteínas cuyo sitio activo contiene un centro metálico de Fe coordinado por un macrociclo tetrapirrólico o protoporfirina-IX y residuos de aminoácidos conservados (H, C, M, Y, K) que funcionan como ligandos axiales (Fig. 1.1).

Estas proteínas están presentes en todos los dominios de la vida y tienen diversas funciones celulares¹, desde el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa (citocromo c, citocromo oxidasa y reductasa)², la generación de especies reactivas de oxígeno (NOS_i), sistemas antioxidantes y anti-radicales (catalasas y peroxidasas)^{3,4}, hidroxilación de carbonos tetraédricos (citocromos P450)⁵ hasta la peroxidación de lípidos de membrana durante la apoptosis (citocromo c)⁶, entre otros.

Las propiedades de óxido reducción del sitio activo, dígame del par Fe^{II}-Fe^{III}, en cada hemo-proteína depende del tipo de ambiente químico impuesto, tanto por los ligandos axiales del Fe (primera esfera de coordinación), como por los residuos vecinos al grupo prostético hemo (segunda esfera de coordinación)⁷. Esta plasticidad deriva en hemo-proteínas con potenciales redox muy diversos, (como los citocromos de la cadena respiratoria, -66 mV)² hasta proteínas muy oxidantes con potenciales redox bajos (-140 mM vs. SHE) como la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO).

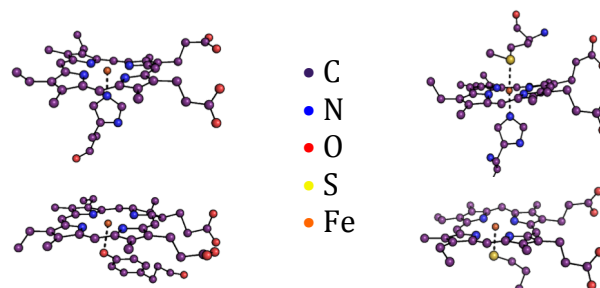


Figura. 1.1. **Diversidad estructural en la coordinación del átomo de Fe en las hemo-proteínas.** La diversidad en ligandos axiales confiere propiedades de óxido-reducción distinta a cada enzima. Se ejemplifican los residuos de aminoácidos más encontrados en hemo-proteínas.

Debido a la versatilidad de ambientes proteicos y por ende de potenciales redox, la cantidad de reacciones que involucran hemo-proteínas es muy grande, siendo su estudio un campo muy amplio y activo dentro de la enzimología. Por ejemplo, se está realizando un gran esfuerzo por obtener biocatalizadores, basados en hemo-proteínas, que medien reacciones donde se reduzca el impacto ambiental de xenobióticos liberados al ambiente por la actividad humana. Recientemente se analizaron los alcances y limitantes de la biocatálisis con hemo-proteínas, específicamente peroxidasas, para el refinamiento de combustibles fósiles⁸.

Para entender el potencial de estas enzimas en diversas áreas, se ha partido de su reacción natural, es decir, la activación del Fe por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El estudio de este tipo de reacciones es crucial para entender los aspectos más intrínsecos de este grupo de enzimas (reactividad, estabilidad, electroquímica, etc.) e incluso el primer paso para comprender su impacto en el área de la salud, donde encontramos hemo-proteínas como la hemoglobina y la mioglobina⁹. Nuestro objetivo principal es entender el mecanismo de transferencia de electrones durante la inactivación de las peroxidasas. Este proceso sólo se puede entender mediante el estudio de sus intermediarios catalíticos y los cambios conformacionales asociados, aunque sean sutiles, a la activación por H_2O_2 .

La reacción de activación de las peroxidasas por H_2O_2 , consiste en la formación de un intermediario denominado compuesto I (CpdI) del tipo oxoferrilo, que es la especie con el mayor potencial redox en el ciclo catalítico. Este CpdI contiene un Fe^{IV} con dos electrones desapareados: uno en la fracción oxoferrilo ($Fe^{IV}=O$) y otro electrón desapareado en un radical catiónico de porfirina (por \bullet^+)¹⁰ o en un aminoácido (aa \bullet)^{11,12}. En este último caso, el intermediario se ha denominado CpdES.

Los compuestos CpdI y CpdES, pueden ser reducidos por la transferencia de un electrón desde un sustrato reductor, reduciéndolos al compuesto II (CpdII)¹³, el cual ya no presenta carácter radical en la porfirina o en algún residuo de aa, pero mantiene la fracción oxoferrilo oxidante. Este intermediario regresa al estado basal (Fe^{III}) por la transferencia de un segundo electrón de otra molécula de sustrato. En síntesis, la actividad peroxidasa implica la oxidación de dos moléculas de sustrato por ciclo catalítico.

La formación de CpdI o CpdES compromete la integridad de la enzima, ya que es tan reactivo que puede extraer electrones de cualquier fuente cercana¹⁴, siendo la oxidación del grupo hemo y de aminoácidos cercanos los fenómenos más reportados.

En la figura 1.2 se muestra el mecanismo de reacción modelo de las peroxidasas, cuyos productos inmediatos son una molécula de agua y el CpdI, el cual es reducido a CpdII por una molécula de sustrato reductor, y posteriormente este CpdII es reducido al estado basal.

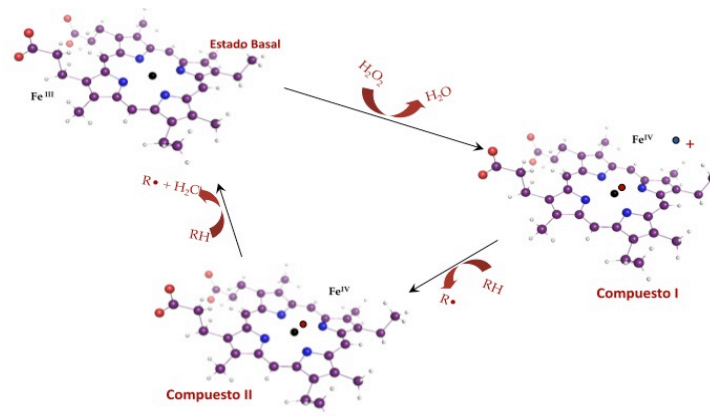


Figura. 1.2. *Mecanismo de reacción de las peroxidasas o de Poulos-Kraut.* El ciclo catalítico implica la formación del CpdI y su reducción sucesiva hasta el estado basal.

Durante la evolución, se han modulado las propiedades de óxido-reducción de estas enzimas para poder contender contra una gran variedad de sustratos desde dióxígeno, peróxidos orgánicos, largas cadenas alifáticas de fosfolípidos, grupos fenólicos libres, hasta biopolímeros como la lignina y xilenos.

Por lo tanto, puede inferirse que las hemo peroxidasas han sido sujetas durante millones de años a implementar estrategias para volver sus procesos más eficientes, fenómeno que se puede evidenciar al analizar las constantes catalíticas para el sustrato H₂O₂ (tabla 1).

A pesar de su impresionante desempeño catalítico, muchas de estas enzimas se inactivan a concentraciones catalíticas de peróxido, es decir, se enfrentan a un fenómeno denominado inactivación suicida. Este proceso se basa en la activación de la enzima por H₂O₂, la cual para volver al estado basal necesita extraer electrones de diversas fuentes (sustrato exógenos). Los electrones necesarios para la reducción

pueden provenir del esqueleto proteico o del anillo tetrapirrólico, sobre todo en ausencia de sustrato, conllevando a un desbalance electrónico y/o subsecuente inactivación¹⁵.

Enzima	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
Catalasa <i>Aspergillus niger</i> ¹⁶	3.62 x 10 ⁵	0.322	1.24 x 10 ⁶
Peroxidasa <i>Roystonea regia</i> ¹⁷	2.00 x 10 ³	0.0023	7.4 x 10 ⁵
Catalasa-peroxidasa <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ¹⁸	1.01 x 10 ⁴	0.0052	1.95 x 10 ⁶
Lignino peroxidasa <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ¹⁹	5.29 x 10 ²	0.085	45 x 10 ⁴
Cloroperoxidasa <i>Caldariomyces fumago</i> ¹⁹	2.19 x 10 ⁵	0.003	127 x 10 ³

Tabla 1.1. **Constantes catalíticas para H₂O₂ de varias hemo proteínas.** Estas enzimas se encuentran limitadas prácticamente por la difusión del sustrato al sitio activo, siendo de las enzimas más eficientes.

1.1.1. Fenómenos de transferencia de electrones en peroxidadas.

Para entender como ocurre el fenómeno de inactivación en las peroxidadas, es necesario revisar la teoría de transferencia electrónica en proteínas. Cabe mencionar que estos fenómenos se han estudiado desde hace más de 60 años, logrando acumular gran cantidad de información sobre el fenómeno.

Los flujos electrónicos en las peroxidadas pueden ser fenómenos de transferencia del tipo directa o por transferencia de carga, como entre los dobles enlaces conjugados. Sin embargo, la transferencia puede ocurrir a larga distancia, ya sea por efecto túnel o por transferencia secuencial entre aminoácidos²⁰.

De manera empírica, Moser, Dutton y colaboradores²⁰⁻²² encontraron factores que describen cómo ocurre la transferencia electrónica en las proteínas (Fig. 1.3):

- El rol de las proteínas en la evolución, es propiciar la geometría necesaria entre centros redox para transferir electrones o estabilizar radicales libres.
- La transferencia de electrones ocurre más fácilmente entre los centros redox más próximos²¹.
- La transferencia de electrones no limita la catálisis, ya que la $k_{et} \gg k_{cat}$ por varios órdenes de magnitud (Fig. 1.3 a).
- El empaquetamiento proteico modula la transferencia de electrones, es decir, no importa la naturaleza de los residuos de aminoácido en la ruta, sólo que tan laxo es el plegamiento entre los centros redox (Fig. 1.3 b), definiendo la laxitud si la estructura terciaria es globular o compuesta principalmente por asas móviles.
- La transferencia de electrones por efecto túnel en proteínas ocurre aún a distancias mayores a 14 Å. Sólo que la velocidad de transferencia decae logarítmicamente a distancias mayores (Fig.1.3 c).

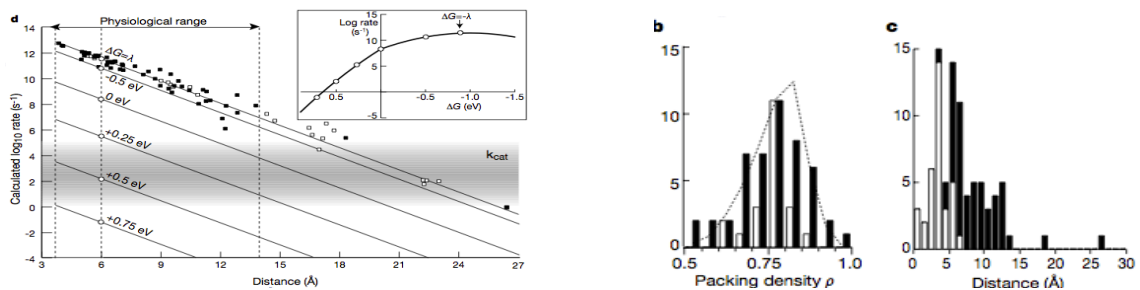


Figura. 1.3. **Velocidades de transferencia de electrones y estadísticas generales para estructuras de oxidoreductasas con múltiples sitios redox.** En a se presenta la correlación entre la distancia entre sitios redox y la velocidad de transferencia de electrones. Se puede apreciar como la $k_{et} \gg k_{cat}$ a distancias menores a 15 Å. En el recuadro en a, se muestra como la ΔG de transferencia electrónica sigue un curso de saturación similar a las constantes catalíticas y la cual dependen de la constante de reorganización de Marcus en la saturación. En b se observa cómo las proteínas redox comparten una densidad de empaquetado similar (barras negras), aun cuando tienen plegamientos diferentes y son distintos a las proteínas con actividades no redox (barras blancas) Las líneas punteadas muestran la distribución de proteínas globulares. En c observamos que las distancias de borde-a-borde entre los sitios redox de las oxidoreductasas no supera los 15 Å (en barras negras se muestran estructuras resueltas por cristalografía de rayos X y en barras blancas las estructuras resueltas por resonancia magnética nuclear de proteínas). Tomado de Page, C.C. et al. 1999²⁰.

Estos principios nos permiten entender cómo ocurre la transferencia de electrones en las peroxidasas: Residuos de aminoácidos cercanos pueden donar electrones más fácilmente al grupo hemo que otros más alejados; cambios conformacionales asociados a la deformación del grupo hemo, modulan el empaquetamiento y por tanto la transferencia entre los grupos redox; la velocidad de transferencia entre cualquier grupo

redox es mayor a la velocidad de reducción del CpdI, es decir, la velocidad de transferencia es mucho mayor que la catálisis^{21,22}.

Teniendo en cuenta los antecedentes mostrados, en las peroxididasas es posible distinguir dos tipos de flujos electrónicos¹⁴, los cuales son procesos simultáneos, es decir, ocurren durante la reacción global con H₂O₂ (Fig. 1.4):

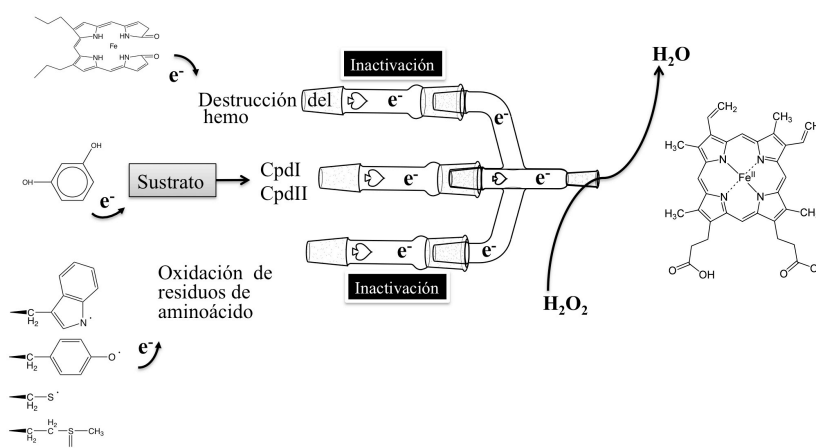


Figura. 1.4. **Flujos electrónicos presentes durante las reacciones de óxido-reducción en las peroxididasas.** El flujo productivo permite entender la oxidación de sustratos (fuente de electrones), ya que la proteína sirve como vehículo para la reacción hasta el aceptor final de electrones, que es el peróxido de hidrógeno. Sin embargo se sugiere que existe una competencia de flujos. Por ejemplo, tanto en presencia como en ausencia de sustrato donador, la extracción de electrones puede provenir de componentes de la proteína, como aminoácidos o el grupo prostético mismo, implicando que los flujos improductivos son destructivos o comprometen la integridad del sistema.

* *Flujo productivo.* Implica la transferencia de electrones desde el sustrato reductor hacia el Cpd I. Este flujo por ende puede verse como catalítico, ya que refleja la capacidad de transformación de sustrato por la enzima. Para algunas peroxididasas cuyo sustrato puede difundir hasta el sitio activo, la transferencia de electrones se realiza a distancias menores a 5 Å. Por el contrario, en aquellas peroxididasas que extraen electrones de un sustrato voluminoso o cercano a la superficie accesible al solvente, las distancias varían entre 8 y 10 Å.

* *Flujo improductivo.* Implica la transferencia de electrones desde residuos de aminoácidos o desde el mismo anillo tetrapirrólico, provocando un déficit electrónico. Se puede recuperar el equilibrio del flujo electrónico en presencia de un donador de electrones de mayor potencial redox, como un sustrato oxidable u otro aminoácido.

Este tipo de flujo deriva en la disrupción del flujo electrónico productivo, que a su vez se traduce en la pérdida de actividad catalítica; el flujo electrónico improductivo compiten contra la actividad catalítica (que en este sentido es un flujo productivo desde un sustrato reductor hasta el Cpd I). Otra consecuencia de la pérdida de electrones en residuos de aminoácidos es la acumulación de residuos oxidados o residuos con carácter radical, de naturaleza distinta a los radicales catalíticos basados en residuos de W, como los encontrados en la VPB de *Bjerkandera adusta*²³. Otro fenómeno destructivo ocurre en el grupo hemo, el cual tras la pérdida de 5-8 electrones, genera especies “abiertas” como el verdohemo o la Fe^{III}biliverdina.

1.1.2. ¿Cómo contender con la inactivación de las peroxidasas?

A pesar que el fenómeno de flujos improductivos son destructivos, se han desarrollado estrategias por reducir su impacto en las peroxidasas. A continuación se describen las dos estrategias empleadas en la estabilización de la actividad peroxidasa:

1) Evolución dirigida de la actividad peroxidasa, al seleccionar cepas que crezcan en concentraciones cada vez más elevadas de H₂O₂. Este conjunto de metodologías, permite encontrar una o varias mutantes con la característica deseada, al someter a los organismos al crecimiento en una condición limitante, es decir propiciar la selección de cepas que sobrevivan cierta presión de selección.

Estas metodologías fueron empleadas en el proceso de estabilización de la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (Cip)²⁴. Se integraron rondas de mutagénesis sitio-dirigida con rondas de mutagénesis al azar. La condición limitante fue someter a los cultivos a concentraciones de H₂O₂ y temperaturas elevadas. Tras varias rondas en medio con H₂O₂, se generó una hepta-mutante (I49S, V53A, T121A, M166F, E239G, M242I, Y272F) 100 veces más estable a concentraciones altas de H₂O₂ y 174 veces más estable a temperaturas elevadas. Tres de las mutaciones se localizaron en la segunda esfera de coordinación del grupo hemo, mientras que las otras 4 fueron mutaciones localizadas a más de 10 Å del sitio activo.

No obstante lo poderosa de esta estrategia, es difícil predecir la posición de los residuos a mutar, pudiendo acumular varias generaciones sin obtener un efecto dramático en la característica deseada. Además, separar los fenómenos de cambios conformacionales de los fenómenos electrónicos se vuelve complicado. Es decir, en un ronda de mutagénesis se podrían generar cambios que repercutieran en la flexibilidad del plegamiento, lo cual podría alejar a los centros redox, repercutiendo en la velocidad de transferencia. Es decir, no son cambios centrales en los grupos redox y por lo tanto, intransferibles a otros tipos de plegamiento.

2) Mutaciones sitio-dirigidas usando criterios redox, para sustituir residuos con mayor susceptibilidad a oxidarse por otros menos susceptibles.

Esta alternativa es más localizada, ya que toma en cuenta las propiedades redox de los aminoácidos. En esta estrategia los aminoácidos cercanos al grupo hemo y susceptibles a oxidarse son mutados por aminoácidos con menor potencial redox o aminoácidos incapaces de interactuar electrónicamente con el sitio activo. De esta manera, se genera una segunda esfera de coordinación “aislante”, la cual reduce la transferencia electrónica desde residuos oxidables más lejanos.

Esta aproximación fue utilizada en la estabilización del *iso*-citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* como peroxidasa²⁵. Se generó una hepta-mutante estable (T5A, N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G, C102T) capaz de mantener su actividad catalítica por más de 120 minutos, en comparación a la enzima silvestre cuyo tiempo de vida media fue de sólo 8.3 minutos. Esta variante estable sólo pierde ~20 % de su actividad al ser incubada con 1 mM de H₂O₂ en ausencia de sustrato reductor exógeno. Además se redujo la velocidad de destrucción del grupo hemo 10 veces, en comparación a la enzima silvestre.

Siguiendo esta aproximación se pueden generar variantes en poco tiempo, además de ensayar varias posiciones de la segunda esfera de coordinación a fin de exacerbar el efecto de estabilización. La limitante de esta aproximación es que no permite distinguir entre los flujos productivos e improductivos, pudiendo afectar la actividad catalítica a expensas de obtener una mayor estabilidad ante el H₂O₂.

No obstante, esta estrategia tampoco permite encontrar de manera precisa a los aminoácidos involucrados a mutar sin antes hacer el experimento. En este contexto, se vuelve necesaria la implementación de estrategias que permitan predecir cuáles residuos de aminoácidos estarían involucrados en la inactivación suicida.

Debido a la naturaleza electrónica del problema, en este trabajo empleamos herramientas químico-computacionales *ab initio*, como las descritas en los trabajos de Guallar y *col.* las cuales han permitido trazar las rutas de transferencia de electrones en diferentes proteínas redox²⁶⁻²⁸. En este sentido, contar con una herramienta que permita analizar el problema antes de realizar el experimento, es determinante para reducir la búsqueda de residuos importantes para la inactivación suicida.

La implementación de los algoritmos antes mencionados así como el desarrollo de un método de escrutinio energético nos permitió contar con una herramienta predictiva, y que nos permitiera entender cuales residuos de aminoácidos con bajo potencial redox eran los importantes para su sustitución por residuos con mayor potencial redox. En otras palabras, para identificar los residuos proclives a ser oxidados por los intermediarios catalíticos de los citocromos P450 y así generar enzimas más estables.

1.2. CYP_{BM3} de *Bacillus megaterium*.

1.2.1. Hacia un modelo eficiente para las reacciones peroxidasa/peroxigenasa.

El citocromo P450_{BM3} de *Bacillus megaterium*, es una enzima capaz de hidroxilar, en posiciones sub-terminales, enlaces C-H de las cadenas alifáticas de ácidos grasos de tamaño intermedio (C₁₂ – C₁₈) mediante un sistema típico de óxido-reducción acoplado entre sus dominios reductasa e hidroxilasa. El dominio reductasa está integrado por un dominio de unión a NAD(P)H, el cual asiste en la catálisis del dominio hemo, al *inyectarle* electrones y así reducir al Fe^{III} hémico por Fe^{II} (sólo el Fe^{II} es capaz de coordinar O₂ debido a las restricciones de spin). De tal manera, el O₂ es coordinado por el hemo para generar al intermediario compuesto I (CpdI) el cual es tan electrofílico (-2184 mV) que ataca carbonos sp² de los enlaces C-H de las cadenas alifáticas²⁹.

El dominio de unión a grupos hemo está conformado en su mayoría por hélices, y contiene una cisteína proximal conservada, la cual impone un enlace de coordinación con el Fe del grupo hemo. Presenta varios canales, entre ellos un canal con aminoácidos muy conservados para el acceso del sustrato, un canal lateral o acueducto, con moléculas de agua conservadas que conectan a la superficie de la enzima con el grupo hemo²⁹.

Otros citocromos ortólogos (BSβ de *Bacillus subtilis* (CYP152A1) y SPα de *Sphingomonas paucimobilis* (CYP152B1)) son capaces de realizar α-hidroxilaciones sobre ácidos grasos de manera muy eficiente (300 and 838 min⁻¹, respectivamente) en ausencia del dominio de unión a NADH^{30,31}. Estos ortólogos son peroxigenasa verdaderas ya que sólo utilizan H₂O₂ como fuente de oxígeno, lo cual les permite alcanzar recambios elevados al no depender de la reducción del Fe^{III} hémico por un dominio externo.

Para evitar el problema de la dependencia al NAD(P)H (cuyo valor comercial es muy elevado), en este trabajo empleamos una variante del citocromo P450_{BM3} de *B. megaterium*, el cual sólo contiene al dominio de unión al grupo hemo. Esta variante 21B3 fue generada mediante estrategias de evolución dirigida, usando como presión

selectiva el crecimiento en H_2O_2 ²⁹. Este dominio hemo modificado fue capaz de hidroxilar carbonos alifáticos usando como única fuente de oxígeno al H_2O_2 (Fig. 1.5).

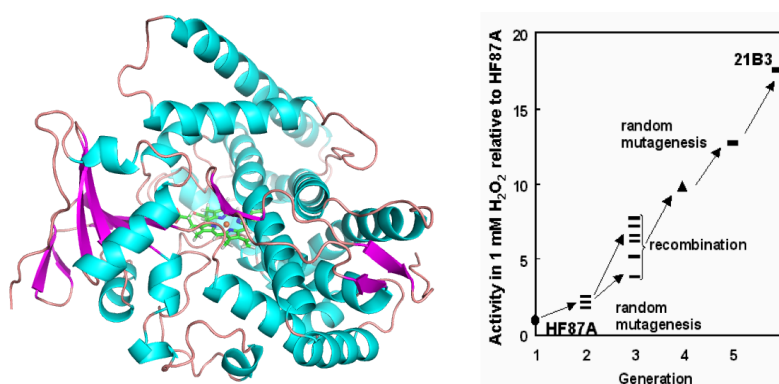


Figura. 1.5. **Representación esquemática de la variante 21B3 P450_{BM3}**. A. Modelo tridimensional de CYP BM3 usado en este trabajo. B. Generación de la variante 21B3 mediante mutagénesis al azar. En el esquema se da cuenta del aumento en la actividad peroxidasa de la variante 21B3 con respecto a la enzima parental F87A. Tomado de Cirino P. et.al.2003²⁹.

La disponibilidad de estructuras tridimensionales de este dominio, así como el contar con un sistema de expresión optimizado para *Escherichia coli* (que permite purificar aproximadamente 20 mg de enzima por litro de cultivo^{29,32}), hace de esta proteína un eficiente modelo enzimático. Además, la modificación de aminoácidos por mutación sitio-dirigida para obtener enzimas recombinantes es de rápido acceso, ya que el gen que codifica para el citocromo está secuenciado y contenido en sistemas de sobre-expresión. De tal manera que la generación de variantes se facilita al usar pocas rondas de PCR.

Por otro lado y con respecto a su ciclo catalítico, no se ha establecido la naturaleza exacta del intermediario catalítico oxidante durante la activación de este citocromo bacteriano. Se presume que es similar al CpdI de la enzima cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO)³³ y al CpdI de un citocromo P450 proveniente de un organismo extremófilo³⁴. Contar con herramientas que nos permitan entender la naturaleza de los intermediarios catalíticos de estos citocromos nos permitirán manipular las propiedades de óxido-reducción de estas proteínas.

En ese sentido, la evidencia derivada de ensayos de espectroscópica de alta velocidad (*stopped-flow*) sugiere intermediarios catalíticos que comparten características similares al CpdI de CPO (bandas de absorción similares durante la reducción con CO determinadas por espectroscopia UV/Vis)³⁵ así como el efecto de *push-pull* impuesto por el ambiente alrededor de la cisteína axial responsable de la coordinación Fe hémico. Este fenómeno describe un intrincado mecanismo, primeramente descrito en peroxidasas, el cual aumenta la nucleofilia del H₂O₂ en el complejo Fe-HOOH. Un residuo catiónico, como H o R, genera un efecto de jalar un protón del H₂O₂, promoviendo el rompimiento del enlace O-O. Por otro lado, el mantener una cisteína con carácter aniónico, es decir como tiolato, promueve un efecto de empujar o lanzar electrones hacia O-O, desestabilizándolo hasta el rompimiento del enlace^{34,36,37}.

Evidencias adicionales acerca de la similitud entre los intermediarios proviene de ensayos de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR), los cuales sugieren que las especies paramagnéticas detectadas en CPO, tras reaccionar con varios peróxidos orgánicos, son los mismos que los detectados en la reacción de estos citocromos con H₂O₂, u otras fuentes alternativas de oxígeno^{13,34,35,41}.

Tomando en cuentas las características anteriores, la selección de la variante 21B3 P450_{BM3} de *B. megaterium* como modelo de estudio de la inactivación suicida en citocromos P450, nos permitió elucidar propiedades de sus intermediarios durante las reacciones tipo peroxidasa.

1.2.2. Mecanismo de inactivación propuesto para los citocromos P450.

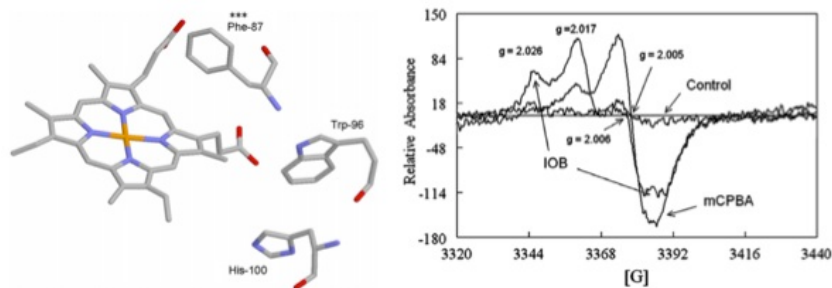
Existe un gran acervo sobre las especies intermediarias existentes en citocromo P450, debido a que son enzimas con un papel central en la destoxificación³⁷, transformación y generación de nuevos metabolitos³⁸⁻⁴¹. En estos trabajos se identifican varios intermediarios en el ciclo de reacción natural con O₂ y con H₂O₂ o “*shunt-pathway*”⁴¹.

Los casos más relevantes, para este trabajo, son la identificación de especies intermediarias tipo CpdI: especies Fe^{IV}=O – porfirina •⁺ o Fe^{IV}=O – aa• o CpdES. La formación de este tipo de especies, con radicales transitorios basados en residuos de aminoácido, depende enteramente del ambiente o la naturaleza de la matriz proteica. Es decir, la formación de CpdES se facilita por la presencia de residuos de bajo potencial

redox en la vecindad del grupo hemo. Además, la estabilización de estas especies depende de la presencia de grupos aniónicos capaces de estabilizar la nascente deficiencia electrónica de un radical¹³.

En los trabajos de Raner y cols. en P450_{BM3}⁴² y de Spolitak y cols. en P450_{cam}^{13,43,44} se demostró, mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) que tras reaccionar con H₂O₂ u otras fuentes donadoras de oxígeno (cómo perácidos o peróxidos orgánicos) se generan especies de radicales basados en aminoácidos (Fe^{IV}=O – W* y Fe^{IV}=O – Y*, respectivamente)⁴⁵ (Fig. 1.6).

A



B

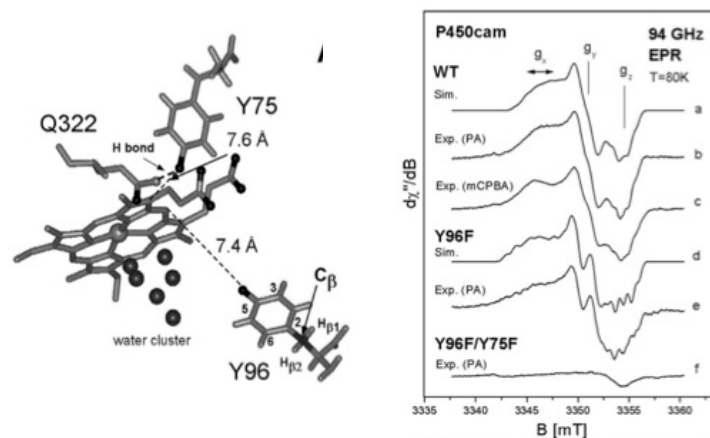


Figura. 1.6. **Detección de CpdES en P450_{BM3} y P450_{cam}.** **A.** En el panel izquierdo, residuos oxidables cercanos al grupo hemo en el citocromo P450_{BM3} silvestre. En bastones se muestran los residuos F87, W96 y H100, los cuales se encuentran a distancia de borde a borde entre 4 y 9 Å. En el panel derecho se muestra el espectro de la especie radical basada en triptófano encontrada al reaccionar con ácido iodobenzoico o ácido m-cloroperbenzoico así como sus constantes de acoplamiento hiperfino. Tomado de Raner, G. et.al. 2006⁴².

B. En el panel izquierdo, residuos oxidables cercanos al grupo hemo del citocromo P450_{cam}. En bastones se muestran las únicas tirosinas inmediatas. En el panel derecho se muestra el espectro de EPR de las especies radicales basadas en tirosina para las variantes con tirosinas cercanas, así como la ausencia de radicales en una doble mutante carente de tirosinas Y75F/Y96F. Tomado de Spolitak, T. et.al.2008¹³.

De igual manera se determinó, mediante de espectroscopia UV/Vis de alta velocidad de mezclado (del inglés *stopped-flow*), que el CpdES es capaz de oxidar sustratos como polifenoles y ABTS, sin presentar decaimiento de la actividad. Es decir, el CpdES puede reducirse hacia CpdII¹³.

En citocromos bacterianos como P450_{cam} y P450_{BM3}, la detección de especies radicales basadas en residuos de tirosina y triptófano, respectivamente, generó controversia sobre el rol de estas especies en la catálisis, es decir: ¿Es el CpdES catalíticamente activo o es un paso hacia la inactivación? La respuesta es ambas^{13,44,45}.

En la figura 1.7 se observa como la reducción de CpdI por un electrón proveniente de una tirosina genera al CpdII, el cual es capaz de oxidar una molécula de sustrato y así restituir al estado basal. Sin embargo, en estos estudios no se esclarece lo que prosigue si es que no hay sustrato que reduzca al CpdII, lo cual ya se sabe, derivado de estudios en peroxidasas, que puede derivar en múltiples situaciones detrimentales para la enzima⁴³:

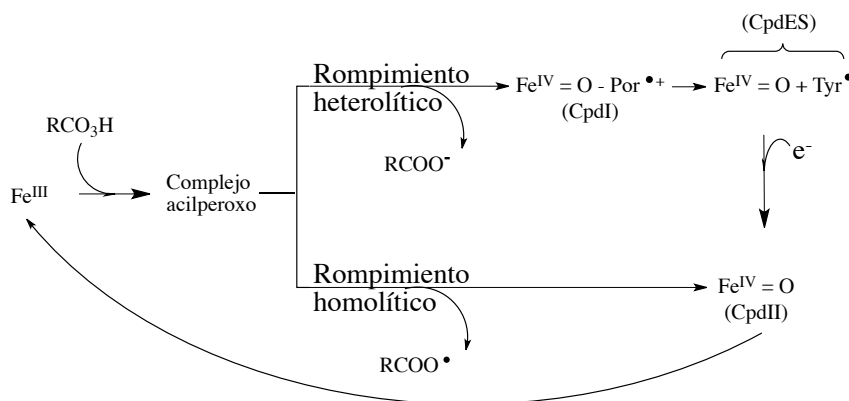


Figura. 1.7. **Mecanismos de activación en citocromos P450_{cam} y P450_{BM3}**. El Fe^{III} reacciona con un donador de oxígeno y prosigue la formación del CpdI, el cual se reduce por la nueva transferencia desde un residuo de tirosina o triptófano, generando al CpdES. Este intermediario es catalíticamente activo y capaz de oxidar sustratos como ABTS y así reducirse a CpdII. Modificado de Spolitak, T. et.al 2010⁴⁴.

1.3. Química computacional aplicada al estudio de sistemas biológicos.

1.3.1. El encuentro de dos mundos: Teóricos + Experimentalistas.

La confrontación simultánea de la información experimental con aquella predicha según modelos químico-computacionales conduce a un proceso muy potente y creativo de intercambio entre la información experimental y los datos teóricos calculados⁴⁶. Esta metodología asegura la confiabilidad de los resultados experimentales y se convierte en no sólo un complemento a los datos experimentales, sino que también es una fuente independiente de información acerca de estructuras moleculares, información vibracional y propiedades experimentales del estado basal electrónico y de los estados excitados. El constante desarrollo de las herramientas computacionales (relación software-hardware) ha permitido que los cálculos mecánico cuánticos se realicen en moléculas de gran tamaño, incluido el medio que las rodea. Tal avance se ha conseguido gracias al desarrollo de modelos y algoritmos matemáticos altamente eficientes destinados a super-computadoras o servidores multi-procesador.

Sin embargo, el incremento en el número de partículas y por ende, de información generada, ha planteado el problema de cómo manejar, comprender y analizar la gran cantidad de datos resultantes. Esto sigue siendo un reto, no sólo en este campo sino en la investigación científica en general.

El uso de herramientas computacionales como la mecánica molecular y la mecánica cuántica, para el estudio de reacciones químicas y biológicas un elevado número de átomos, se vuelve una herramienta fundamental en la investigación bioquímica moderna. De manera general, se pretende extraer información, tal como propiedades químicas y físicas, a partir de modelos moleculares tridimensionales. Para conseguir este nexo es necesario correlacionar estas propiedades conformacionales con sus correspondientes funciones químicas, catalíticas o biológicas, incluso racionalizar el diseño de moléculas con funciones determinadas⁴⁷.

Por su lado, los estudios de mecánica molecular (*MM*, *molecular mechanics* por sus siglas en inglés) representan un conjunto de metodologías fundamentales con aplicación en el estudio teórico de las moléculas de interés biológico. Esta serie de métodos computacionales, basados en la solución de la segunda ley de Newton para todos los átomos del sistema, permiten predecir el comportamiento de una biomolécula durante determinado tiempo. La integración de las ecuaciones de movimiento permite analizar las trayectorias correspondientes a la posición, velocidad y aceleración de cada partícula del sistema en cualquier fracción de tiempo. Por desgracia, la simplificación existente en estas metodologías, es decir, el tratamiento de los átomos como esferas y los enlaces como resortes o tensores con distintos parámetros dependiendo del tipo de enlace, no permite estudiar el rompimiento y formación de enlaces. Debido a las simplificaciones y aproximaciones que evitan el tratamiento explícito de los electrones, la MM está imposibilitada a estudiar mecanismos de reacción⁴⁷.

La mecánica cuántica (*QM*, *quantum mechanics*, por sus siglas en inglés) es la aplicación de la mecánica cuántica a problemas de química, entre otros, al estudio del comportamiento de átomos y moléculas, en cuanto a su geometría y a sus propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y mecánicas, y también a su reactividad química. Describe matemáticamente el comportamiento fundamental de la materia a escala electrónica mediante la solución de la ecuación de Schrödinger para cada átomo del sistema⁴⁶.

Los programas usados en química computacional se basan en diferentes métodos mecanico-cuánticos para resolver la ecuación de Schrödinger. Los métodos que no incluyen parámetros empíricos ni semi-empíricos en sus ecuaciones se denominan métodos *ab initio* ("a partir de primeros principios") ya que sólo asumen leyes básicas y bien establecidas, excluyendo parámetros externos o modelos simplificadores. Las clases más populares de métodos *ab initio* son: Hartree-Fock, teoría de perturbaciones de Möller-Plesset, interacción de configuraciones, *coupled cluster*, matrices de densidad reducidas y, aunque de manera controversial, la teoría del funcional de la densidad (DFT). Cada método contiene diferentes variantes de la teoría, orientadas a una propiedad molecular concreta, o a un conjunto especial de moléculas. La abundancia de estos métodos es una prueba de que no hay un método único que sea adecuado para todos los propósitos⁴⁶.

En principio, sería posible usar un método “exacto” (interacción completa de configuraciones con una base lo suficientemente completa) y aplicarlo a todas las moléculas. Sin embargo, el costo computacional crece exponencialmente con el número de electrones de la molécula. Por este motivo, hay un gran número de métodos aproximados que buscan el mejor compromiso en cada caso entre exactitud y costo computacional^{46,47}.

Para el estudio de las reacciones que ocurren en el sitio activo de las enzimas, intervienen sólo unos pocos átomos y es posible aplicar la mecánica cuántica para explicar la dinámica de formación y rompimiento de enlaces y la reactividad asociada a la descripción de los orbitales atómicos. Sin embargo, para entender como las demás regiones de la enzima modulan la entrada de sustratos, la descripción QM de tantos átomos es imposible con el poder de cálculo actual⁴⁷.

Por lo tanto, la integración de metodologías QM/MM o metodologías híbridas surge como una necesidad para estudiar sistemas biológicos, para entender las reacciones químicas del sitio activo así como los fenómenos de difusión de sustrato, acceso del solvente y cambios conformacionales, es decir, el papel que el ambiente proteico durante la catálisis⁴⁶. Este nuevo tipo de cálculos implica la delimitación de una zona específica de la proteína, aquella donde se lleva a cabo la catálisis y que comprende pocas decenas hasta cientos de átomos, y que es denominada zona o región cuántica. Los demás átomos de la proteína, así como el solvente y los iones son tratados en la región de mecánica clásica, donde no se estudian de manera explícita los electrones. Esta región está sujeta a cambios conformacionales asociados a la catálisis, ya que entre las dos regiones se intercambia información de cargas y rompimiento de enlaces (Fig. 1.8).

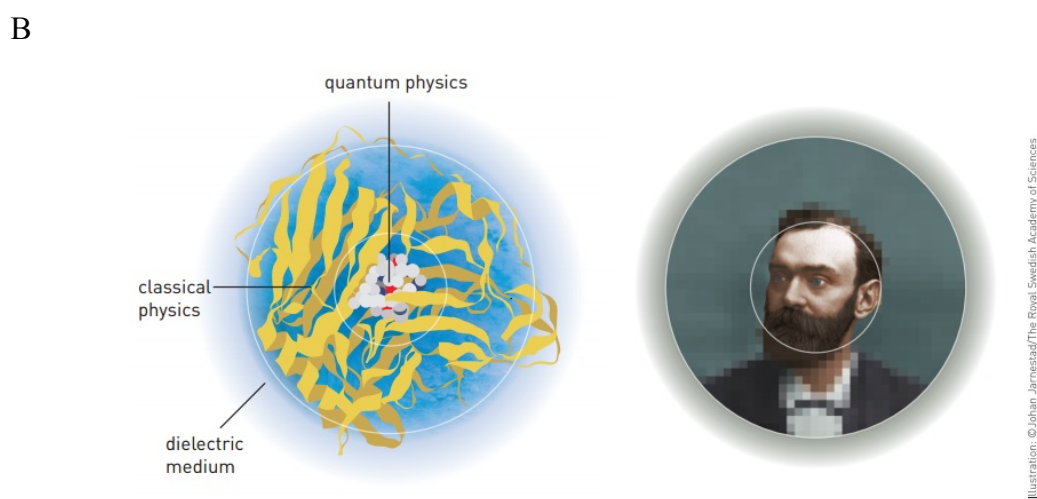
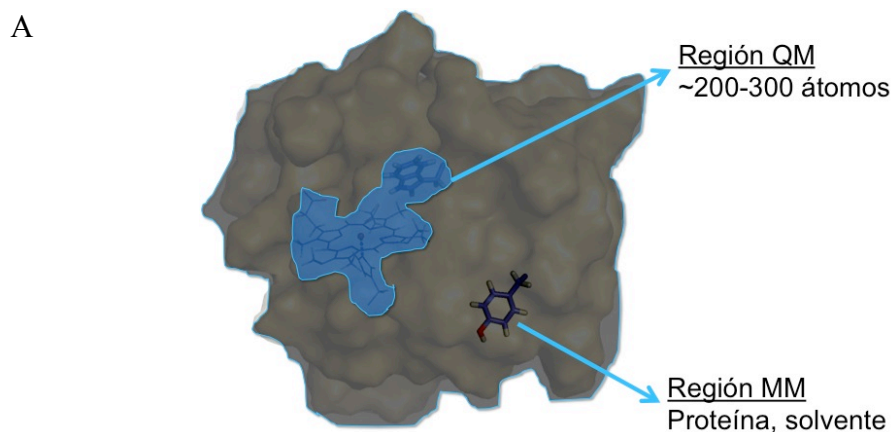


Figura. 1.8. **Esquema general de los cálculos QM/MM en proteínas.** A. En los cálculos QM/MM dos regiones de la enzima se distinguen por el nivel de teoría usado para la solución del movimiento y electrostática de los átomos. En la región QM, se resuelve la función de onda para todos los electrones de cada átomo, tratando de manera explícita a los electrones. En la región MM se resuelve la ecuación del movimiento de Newton para cada átomo, usando un tratamiento implícito de los electrones. B. Concepción generalizada de los cálculos QM/MM modernos, en los cuales se emplean los modelos de Van der Waals y Coulomb para describir, de una manera físicamente correcta, el continuo entre las regiones tratadas por física clásica y física cuántica. Tomado del Reporte de la Real Academia Sueca de Ciencias para el premio Nobel de Química 2013.

La importancia de tales metodologías y la creciente implementación de estrategias QM/MM ha sido laureada con la designación del Premio Nobel de Química 2013 a los desarrolladores de las metodologías QM/MM (Karplus, Lewitt y Warshell), por su trabajo en el desarrollo de modelos multi-escala para tratar sistemas químicos complejos, demostrando lo trascendente que este tipo de herramientas se han vuelto para la ciencias experimentales.

Para el particular caso del estudio de proteínas con actividad peroxidasa, se requiere de entender la naturaleza cuántica de la transferencia de electrones durante la catálisis y el efecto del medio circundante (residuos de aminoácidos vecinos, iones y solvente) durante las reacciones mismas. Sin embargo, los métodos mecánico-cuánticos puros se limitan a decenas de átomos, por lo cual se vuelve necesario implementar diferentes algoritmos para tratar cientos de átomos y su medio circundante²⁸.

Para este estudio, se analizaron aminoácidos, que por su ubicación entre la primera y segunda esfera de coordinación del átomo central de Fe (sitio activo) podrían ser capaces de transferir electrones e incluso, formar radicales basados en aminoácidos. Se implementó el algoritmo *QM/MM* de las vías de transferencia de electrones (*Et-pathway*) para tal efecto^{26-29,47,48}. Las regiones de transferencia de electrones consistieron de residuos de aminoácidos alrededor de 14 Å (distancia al borde del grupo hemo) que podían mantener alguna clase interacción directa con la porfirina o el ligando axial, como enlaces de hidrógeno, interacción electrostática o interacción de orbitales π - π (*phi stacking*). Además dentro de esa distancia, los electrones son capaces de ser transferidos mediante efecto túnel, el cual es un fenómeno que depende de la naturaleza ondulatoria de la materia y que se interpreta como una transferencia por debajo de la barrera energética. Este fenómeno, siendo cuántico por definición, permite explicar las altas velocidades de reducción observadas en los fotosistemas de plantas o en complejos organometálicos.

Para sustentar los resultados derivados de las herramientas teóricas, se necesitan analizar múltiples variantes o mutantes puntuales en los residuos de aminoácidos predichos computacionalmente, a manera de identificar los de mayor relevancia para la transferencia electrónica. En este sentido, empleamos diversas aproximaciones experimentales, como espectrometría de masas y espectroscopia UV/Vis, para identificar residuos clave y así poder determinar su papel en la transferencia de electrones.

1.3.1. Estudios mecánico cuánticos para entender la transferencia de electrones en citocromos P450. Algoritmo Et-pathway.

El estudio realizado por Guallar y col.²⁷, donde se estudia la transferencia de la densidad de spin del electrón en hemo proteínas, fue la base de nuestro estudio. La densidad de spin es la densidad electrónica en compuestos con electrones desapareados o radicales. Se calcula a través de la diferencia entre la densidad de spin en un sentido, menos la densidad de spin en el sentido opuesto. En este trabajo, se estudió la transferencia electrónica usando herramientas químico-computacionales como las descritas entre la citocromo c peroxidasa (CCP) y el citocromo c (CYC), utilizando el complejo cristalográfico publicado por Guo et. al. (2004)⁵⁰. En este trabajo se buscaron los residuos de aminoácidos, en la frontera entre las regiones cuánticas y clásicas de la proteína, que deslocalizaran mayor densidad de spin hacia el compuesto oxidante. Es decir, la densidad de spin se vuelve fundamental para determinar en que átomo se encuentra la mayor diferencia en la densidad electrónica (para un sistema de capa abierta o radicalario) y por tanto, cual residuo se puede estar oxidando. Para tal efecto, fue necesario determinar el potencial electrostático y las cargas parciales derivadas de los átomos tratados explícitamente por mecánica cuántica, para posteriormente incluir nuevos residuos y buscar como proseguía o migraba la densidad de spin por los residuos.

La idea fundamental de esta metodología radica en que la región de mecánica molecular no puede albergar electrones. Por tanto, si un electrón desapareado está presente, este debe estar en la región cuántica. Entonces el algoritmo general consiste en expandir paulatinamente la región cuántica, dando pauta a que el electrón sea capaz de encontrar el residuo más proclive a donar densidad de spin. Al expandir las regiones cuánticas, se trazan rutas por las cuales la densidad de spin viaja más fácilmente, de ahí su nombre: *QM/MM et-pathway*^{26-28,48,49,51}.

En ese trabajo, se encontró una ruta que incluía al grupo hemo y los residuos C81, F82 del citocromo c y los residuos N196, A176, H175 y el grupo hemo de la citocromo c peroxidasa.

Los resultados del algoritmo arrojaron que posterior a la formación del CpdI en la CCP, los residuos W191, G192 y A194 también participan en la transferencia de electrones⁴⁸, completando la ruta completa entre las proteínas, lo cual alivió las regiones con posibles agujeros, es decir, donde se desconocía la residuos involucrados en la transferencia y que se interpretaba como transferencia por efecto túnel⁴⁹.

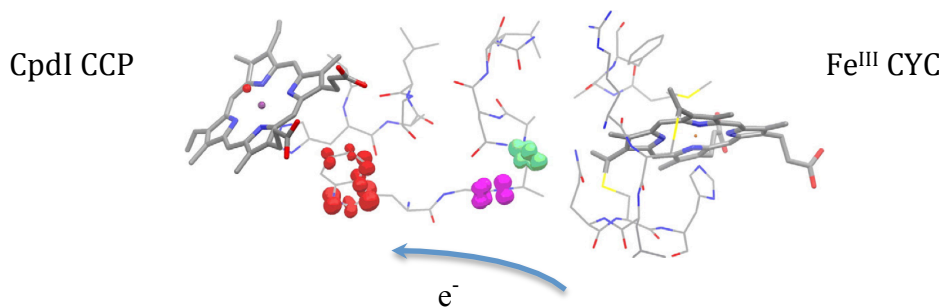


Figura. 1.9. **Ruta de transferencia de electrones entre la CCP-CYC.** Ruta principal entre la CCP y CYC descrita por el algoritmo QM/MM et-pathway. La naciente deficiencia electrónica en el CpdI de CCP es reducida por la transferencia de 1 e- proveniente del FeIII del citocromo c. Se localiza un radical basado en triptofano en las inmediaciones del hemo del CCP. Tomado de Guallar et.al. 2006²⁷.

El uso de estas nuevas herramientas para trazar rutas de transferencia de electrones en proteínas tan grandes como los citocromos P450 es hoy en día un reto importante. Si bien las computadoras actuales son tan potentes como para resolver rápidamente la función de onda de decenas de aminoácidos, el problema de la transferencia en hemo proteínas es que se tratan decenas de posibles residuos donadores en cada esfera de coordinación que se explora. Este tratamiento masivo de cientos de átomos, complican el cálculo y aumenta el tiempo del estudio de manera no lineal, generando semanas de uso intensivo de cómputo⁴⁷⁻⁵¹.

1.4. Hipótesis.

Mediante el algoritmo QM/MM de transferencia de electrones se pueden predecir las rutas de transferencia de electrones que causan la inactivación por peróxido de hidrógeno del CYP. Una vez seleccionados los aminoácidos proclives a oxidarse, mutaciones sitio-dirigidas generarán enzimas más estables a H₂O₂.

1.5. Objetivos.

1.5.1. Objetivo general.

Estudiar la transferencia de electrones entre el CpdI y residuos vecinos por métodos QM/MM y seleccionar residuos proclives a la oxidación durante la auto-inactivación del CYP. Generar mutantes más estables del CYP por mutaciones sitio-dirigidas.

1.5.2. Objetivos particulares.

- Estudiar las rutas de transferencia de electrones (*Et-pathway*) entre el CpdI y residuos oxidables en la variante P450_{BM3} 21B3, usando algoritmos QM/MM.
- Determinar los residuos de aminoácidos más proclives a ser oxidados por el CpdI.
- Construir y expresar heterológamente mutantes puntuales de P450_{BM3} 21B3, en las posiciones más proclives a oxidación por el CpdI.
- Determinar las constantes catalíticas en la oxidación de 2,6-dimetoxifenol de las mutantes generadas.
- Determinar constantes de inactivación y destrucción del grupo hemo en las mutantes generadas de P450_{BM3}.
- Generar combinaciones de las mutantes que resulten más estables a H₂O₂.

2. METODOLOGÍA.

2.1. Estudio químico computacional en citocromo P450_{BM3}. Simulación por dinámica molecular y estudios de la transferencia electrónica a nivel DFT y HF.

El método híbrido QM/MM aprovecha el intercambio de información entre una región de la proteína simulada con mecánica clásica y el sitio activo tratado con mecánica cuántica. En la región de mecánica clásica (MM *molecular mechanics*, por sus siglas en inglés) se calculan las velocidades, cargas puntuales y trayectorias de los átomos de la enzima, sin tratar explícitamente sus electrones. Por otra parte, en la región cuántica (QM, *quantum mechanics*, por sus siglas en inglés) se calculan las propiedades electrónicas de los átomos explícitamente, es decir, se calculan los orbitales moleculares a partir de la combinación lineal de los orbitales atómicos. Todos estos cálculos implican resolver la función de onda para cada uno de los átomos de la región QM⁵².

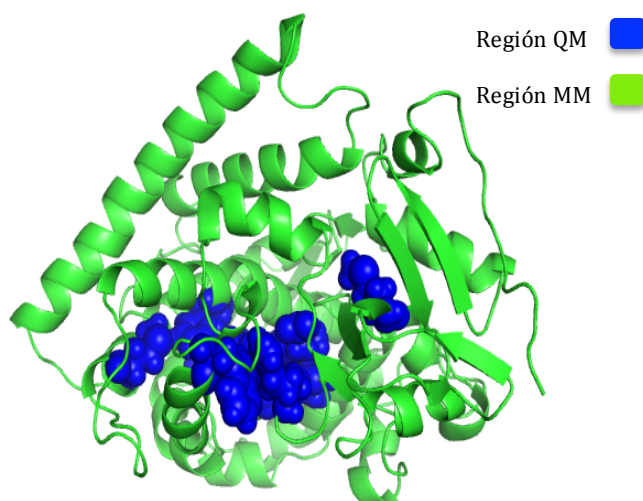


Figura 2.1. Representación esquemática de las regiones QM y MM definidas para la enzima 21B3 P450_{BM3}.

Las coordenadas iniciales fueron obtenidas de la estructura cristalina de una variante cercana de 21B3 P450_{BM3} (código PDB 3QI8), debido a que la estructura de la variante 21B3 no se encuentra disponible. Las 9 mutaciones adicionales de esta variante fueron revertidas previo a la optimización conformacional. La estructura fue preparada con la subrutina “*protein preparation wizard*” incluida en el paquete Maestro v. 9.2. Esta subrutina se encarga de buscar defectos en la estructura, es decir, busca cadenas laterales incompletas, impedimento estérico, átomos no reportados, y de manera particular, ayuda en la asignación de pKa con la implementación del algoritmo de *propKa*. Posteriormente, la proteína se incluyó en un cubo de moléculas de agua tipo

SPC, cuyas dimensiones fueron de 15 Å por lado (8373 aguas tipo SPC) y se neutralizó el sistema al añadir 15 iones Na⁺ (para un total de ~ 45000 átomos). La simulación fue realizada con el paquete Desmond y los análisis realizados con Maestro (Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 3.0, Schrödinger, NY).

El campo de fuerza usado para todas las construcciones fue OPLS_2005, especialmente diseñado para simulaciones en líquido o solvente explícito. Se emplearon condiciones periódicas a la frontera (93 x 93 x 93 Å³) bajo un ensamble de sistemas termodinámicos o colectivos tipo NpT, a presión constante (1 atm). La temperatura fue aplicada mediante un termostato externo.

El cálculo de las interacciones de corto alcance emplearon un radio de corte de 10 Å, mientras que las interacciones de largo alcance (electrostáticas y de van der Waals) se empleó la aproximación de Ewald con una tolerancia de 1x10⁻⁹. El protocolo de *simulated annealing* fue ejecutado en 6 pasos: el sistema completo se calentó secuencialmente, a 10 K durante 30 ps, 100 K durante 100 ps, 300 K durante 200 ps, 400 K durante 300 ps, 400 K durante 500 ps y finalmente temperado a 300 K durante 1000 ps. Se usó el método de interpolación lineal entre dos periodos de tiempo adyacentes. Posterior al paso 6, se produjeron 10 ns de simulación con tiempos de integración de 2 fs. Todos los análisis fueron realizados usando las trayectorias y energías calculadas cada 1 ps.

La energía total de cada paso fue calculada y ajustada a la distribución de probabilidad de Maxwell-Boltzmann (Ec. 2.1), esto con la intención de recuperar las conformaciones más representadas o pobladas, las medianamente representadas y las menos representadas bajo un criterio energético.

$$f = \sqrt{\frac{m}{2 \pi k_{\beta} T}} e^{\frac{-E}{k_{\beta} T}} \quad (2.1)$$

Donde f es la función de probabilidad, m es la masa de la partícula (uma), E es la diferencia en la energía total entre un estado y otro (en J/mol), k_{β} representa la constante de Boltzmann y T es temperatura en grados Kelvin.

Con la diferencia entre estados calculada, se construyó un histograma del cual se seleccionaron 3 conformaciones: alta, media y bajamente pobladas, es decir, desde conformaciones muy representadas hasta conformaciones escasamente encontradas.

La región QM para la enzima 21B3 (enzima parental) incluyó al grupo hemo coordinando al oxígeno (CpdI), 5 aminoácidos alrededor del ligando axial (R398, A399, C400, I401, G402), así como los residuos D68, K69 y N70, ya que se determinaron como cruciales para la estabilización del ambiente electrostático de los propionatos del hemo⁵³. De esta manera, la región QM “básica” comprendió 163 átomos. Para cada ensayo de transferencia electrónica, se seleccionó al residuo candidato y dos residuos a su alrededor, para dar cuenta del ambiente alrededor de esa posición. Es así como la región QM básica incrementó su tamaño entre 189 a 204 átomos, dependiendo del residuo tratado.

La región cuántica fue tratada con el método UDFT con spin no restringido, ya que el sistema es de capa abierta (por la presencia de electrones desapareados o radicales). Este método híbrido DFT emplea funciones base tipo B3LYP (Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) y HF/6-311G (*d,f,p*)^{54,55}. Estas funciones base resuelven la función de onda tomando en cuenta electrones en orbitales *d*, *p* y *f*, así como la polarización que ejercen estos electrones. No obstante las limitaciones del método DFT, éste es empleado ampliamente en sistema bio-inorgánicos por describir propiedades electrónicas y atómicas como energías potenciales, distancia de enlace y frecuencias vibracionales con alta precisión. Los átomos de C, N, O, S e H fueron tratados con la función base antes descrita, mientras que para el átomo de Fe, se usó el *pseudo*-potencial LACVP (lanl2dz) con funciones de polarización en orbitales *d*, empleado ampliamente en los metales de transición⁵⁶. Todos los cálculos se realizaron para determinar la densidad de spin alrededor de los átomos a través del análisis de poblaciones de Mülliken, el cual es resuelto mediante la diferencia de la matriz de datos de la densidad de los electrones alfa y la densidad de los electrones beta.

La región MM incluyó todos los residuos alrededor de la región QM, usando la aproximación de *link atom* (hydrogen cap)⁵⁷ que permite el intercambio de la información entre las regiones QM y MM sin afectar la distribución de cargas de los aminoácidos. La región MM se trató con los parámetros del campo de fuerza OPLS-2005.

Los cálculos híbridos QM fueron resueltos empleando la aproximación de campo autoconsistentes (SCF, *Self Consistent Field* por sus siglas en inglés) para resolver la función de onda por métodos *ab initio*. El cálculo de campo autoconsistente utilizó el método de gradiente conjugado, el cual es un método numérico que opera en sistemas con múltiples variables y de dimensiones muy grandes, si y sólo si son sistemas de ecuaciones lineales, como las combinaciones lineales de orbitales atómicos utilizadas en la teoría del funcional de la densidad (DFT).

El método computacional consiste en dos fases continuas de cálculo: a) Primero se optimiza y minimiza energéticamente al CpdI (región QM). En este primer proceso, se obtiene la distribución de cargas, así como la densidad de spin en la región QM. De igual manera, se obtiene la contribución del CpdI a las cargas totales (efecto muy importante para los siguientes cálculos ya que definen la polarización del sitio activo). b) Posteriormente a la optimización, se calcula la distribución de spin en el primer donador al incluirlo en la región QM y se excluye a CpdI de la misma región para permitir la exploración de una nueva región que denominaremos intermedia. Esta nueva región QM ya no contiene al intermediario, por lo cual el electrón necesita encontrar otro lugar donde “residir”. De esta manera, se van incluyendo residuos cercanos hasta completar la ruta desde la superficie⁴⁸.

Todos los cálculos se realizaron con el programa *Qsite* de *Schrödinger* en 8 procesadores AMD Athlon® cada uno, en el cluster Sputnik II del Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.2. Determinación de residuos de aminoácidos oxidados de una muestra de citocromo P450_{BM3} inactivada por H₂O₂, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

Una muestra (15 µg) de 21B3 P450_{BM3} completamente inactivada (expuesta a 3mM H₂O₂ durante 20 minutos) en ausencia de sustrato reductor, fue analizada por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución. Se digirió la muestra con tripsina y los péptidos resultantes fueron secuenciados (Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM). El proceso de secuenciación se realizó mediante la determinación de la masa promedio de cada péptido inactivado con H₂O₂ y se comparó contra el control de la enzima sin H₂O₂, resultando en un coeficiente de oxidación, el cual representa el cambio en la masa del péptido debido a la introducción de oxígeno.

2.3. Mutagénesis sitio-dirigida de citocromo 21B3 P450_{BM3}.

Se generaron varias mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3} con la técnica descrita por Tseng y cols.⁵⁸. Esta metodología es una combinación de dos técnicas clásicas de mutagénesis sitio-dirigida: extensión de megaprimers y digestiones con la endonucleasa *DpnI*, derivada del estuche comercial QuikChange (Stratagene). Se usó como templado al plásmido pCWori metilado, el cual codificaba para la enzima 21B3 (enzima parental).

Inicialmente, se generaron los fragmentos parciales que contenían las mutaciones en el gen de interés. Es decir, con un par de oligonucleótidos se amplificó la región 5' y con otro par la región 3', de manera independiente. Para aumentar la probabilidad de mutación de cada evento, cada par de oligonucleótidos usados contenía la mutación deseada y se solapaba para poder hibridar. Para finalizar, se usaron los dos fragmentos 5' y 3' como templados para la amplificación del gen completo con oligonucleótidos más externos (Fig. 4.2).

Este nuevo gen completo contiene la mutación deseada y sirve a la vez, como nuevo templado para la amplificación del plásmido completo. Este método ofrece la ventaja de partir de fragmentos con alta probabilidad de mutación y la eliminación de DNA parental metilado por la digestión con la endonucleasa *DpnI* (Fig. 2.2).

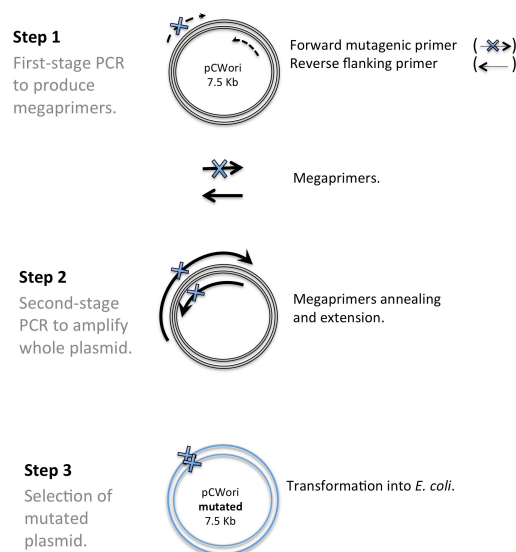


Figura 2.2. *Estrategia de mutagénesis sitio-dirigida usada para generar las variantes de CYP 21B3. La estrategia consiste en la combinación de la extensión por mega primers con el uso de la endonucleasa DpnI que fragmenta al DNA parental metilado y no ataca al DNA mutado no metilado.*

Los oligonucleótidos sintetizados para este trabajo se encuentran en la tabla 2.1.

Oligo	Secuencia	Longitud (pb)
W96A		
Fwd	5'-TGGACGCATGAAAAAATGCCAAAAAAGCGC-3'	31
Rev	5'-GCGCTTTTTTGGCATTTTTTTCATGCGTCCA-3'	31
M237V		
Fwd	5'-ATTAACGCACGTGCTAAACGGAAAAGATCC-3'	30
Rev	5'-GGATCTTTTCCGTTTAGCACGTGCGTTAAT-3'	30
M354V		
Fwd	5'-GGCGACGAACTAGTGGTTCTGATTCCTCA-3'	29
Rev	5'-TGAGGAATCAGAACCCTAGTTCGTCGCC-3'	29
F393A		
Fwd	5'-TAAACCGGCTGGAAACGGTCAGCGTG-3'	26
Rev	5'-CACGCTGACCGTTTCCAGCCGGTTTA-3'	26
F405L		
Fwd	5'-GGTCAGCAGCTAGCTCTTCATGAAGC-3'	26
Rev	5'-GCTTCATGAAGAGCTAGCTGCTGACC-3'	26
pCWori		
Fwd	5'-GAAACAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGT-3'	29
Rev	5'-GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGC-3'	30

Tabla 2.1. *Listado de oligonucleótidos sintetizados. La secuencia se especifica en 5'→3' para todas las secuencias.*

Para corroborar la inserción de las mutaciones, todos los plásmidos fueron secuenciados en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.4. Expresión y purificación de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.

Los plásmidos que contenían las mutaciones puntuales W96A, M237V, M354V, F393A y F450L fueron transformados en la cepa DH5 α y cultivados en medio semi-sólido LB^{AMP} para la selección de colonia aislada.

Se recuperó una colonia crecida en medio sólido LB^{amp} y se inoculó el volumen deseado de medio Terrific broth (1L de Tb contiene: 12 g tripton, 24 g extracto de levadura, 4 mL de glicerol y 100 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 7.4, el cual se esteriliza por filtración y se añade posterior a esterilizar los primeros compuestos). El medio Tb se suplementa con tiamina 0.5 M y elementos traza.

El cultivo se incubó a 35°C y 150 RPM durante 9 horas. Posteriormente se indujo la expresión de la enzima adicionando d-ALA 1 mM e IPTG 0.5 mM. Se incubó el cultivo entre 22 y 24 hrs a 35°C y 100 RPM.

El procedimiento general de purificación se describe a continuación:

1. Se recuperó la pastilla por centrifugación a 5000 x g.
2. Se resuspendió la pastilla en amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos de K 100 mM pH 7.4). Por cada gramo de pastilla usar 10 mL de amortiguador.
3. Se sonicó la muestra con micro punta a 35%. Se repitió el proceso de 3 a 4 veces durante 2 minutos (9s on/9s off) hasta lisar.
4. Se centrifugó la muestra a 15000 x g por 50 minutos. Se recuperó el sobrenadante y filtró a través de una membrana de 0.22 μ m o 0.45 μ m.
5. Se lavó la columna His-trap (His-trap 5 mL, General Electric) con 25 mL de H₂O destilada para remover etanol de almacenamiento.
6. Se pre-equilibró la columna con 25 mL de amortiguador de unión (10 mM imidazol) inyectado a 5 mL/min.
7. Se cargó la muestra a un flujo de 2 mL/min. Se pasó dos veces.
8. Se lavó con 8% de amortiguador de elución (500 mM imidazol).
9. Se eluyó la proteína haciendo un gradiente de 50 mM a 350 mM
 - 10 min 8% B
 - 20 min 70% B
 - 3 mL/min flujo

10. Se concentró la muestra de proteína pura por ultrafiltración usando membranas de corte de 50 KDa. En este último paso se sustituye el amortiguador de imidazol por Tris-HCl 100 mM, pH 8 suplementado con glicerol 10 %.

Los amortiguadores empleados fueron preparados bajo las siguientes especificaciones:

A (Amortiguador de lisis)	B (Amortiguador de elución)
Imidazol 10 mM	Imidazol 500 mM
NaH ₂ PO ₄ 50 mM	NaH ₂ PO ₄ 50 mM
NaCl 300 mM	NaCl 300 mM

Los extractos filtrados se cargaron en la columna HisTrap (General Electric) de afinidad a níquel. Esta columna cuenta con una resina pre-empacada de interacción con níquel, la cual une preferentemente residuos cargados positivamente de las proteínas, como las regiones de 6 histidinas (6xHis) o más.

2.5. Determinación de la actividad enzimática, actividad residual y estabilidad del grupo hemo de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.

Todas las mediciones espectrofotométricas fueron ensayadas a temperatura controlada de 25°C, en el equipo Perkin-Elmer series 836 ET acoplado a un baño de tipo *Peltier*. Se caracterizaron las constantes aparentes k_{cat} y K_M , para el sustrato H₂O₂ en la reacción de oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (DMP) por las mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3}. En la reacción se monitorea la aparición del producto polimérico a 468 nm. Se partió de concentraciones de peróxido de 0.1 mM hasta encontrar la saturación a este sustrato (Fig. 2.3).

Para cada concentración de sustrato se emplearon concentraciones de 0.5 mM de DMP, la cual es mayor a la K_M de la enzima silvestre. Las constantes de velocidad fueron determinadas considerando el modelo de Michaelis-Menten (ec. 2.2):

$$\frac{V}{E_t} = k_{cat} \frac{[S]}{K_m + [S]}, \left(\frac{\text{mmol}_{\text{sustrato}} / \text{L}}{\text{mmol}_{\text{enzima}} / \text{L} \times \text{min}} \right) \text{ ó } (\text{min}^{-1}) \quad (2.2)$$

Donde V corresponde a la velocidad de la reacción, E_t es la concentración total de enzima y k_{cat} corresponde a la constante catalítica. La concentración inicial de sustrato está definida por $[S]$ y K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual se obtiene $\frac{1}{2}$ de la velocidad máxima de la reacción, Por lo tanto, este parámetro define, de manera importante, la afinidad de la enzima por el sustrato.

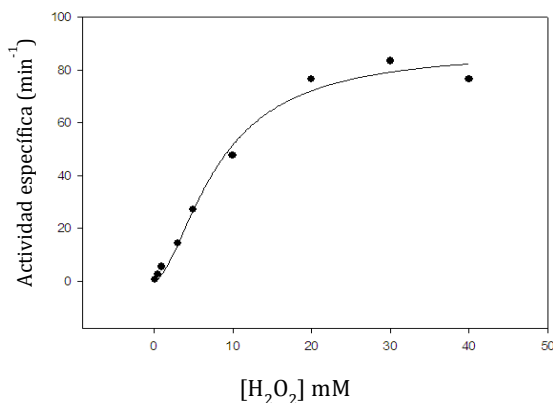


Figura 2.3. *Ejemplo del ajuste matemático aplicado a los datos de cinética de saturación.* En estos ensayos, a una concentración fija de enzima es sometida a concentraciones cada vez mayores de sustrato, a manera de alcanzar una meseta en la hipérbola, que represente la saturación del sitio activo.

La constante de inactivación de las enzimas, debida a la reacción con H_2O_2 en ausencia de sustrato reductor, fue determinada a través del monitoreo de la actividad residual. Se mantuvieron a las mutantes puntuales en amortiguador Tris 100 mM pH 8 con 3 mM de H_2O_2 durante 0, 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 minutos. Terminado cada intervalo de tiempo, se adicionó cloruro de pinacianol ($\epsilon_{603nm} = 82350 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se determinó la actividad remanente. Los valores fueron ajustados a un modelo de decaimiento exponencial.

Para determinar la velocidad de desaparición del grupo hemo en las mutantes puntuales, se incubaron 50 μM de enzima con 1, 3 y 10 mM de H_2O_2 . Se determinó el espectro UV-Vis (600-280 nm) a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 minutos posteriores a incubar con H_2O_2 (fig. 2.4).

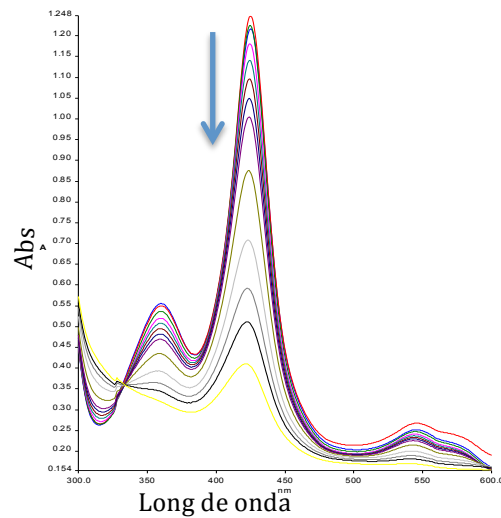


Figura 2.4. *Ejemplo de la señal cuantificada en los ensayos de destrucción del grupo hemo. En estos ensayos, se le da seguimiento a la banda Soret, representativa del grupo prostético. Para los citocromos P450, sin reducción del Fe por CO, la señal se detecta ~425 nm.*

Se reportan los valores de desaparición de la banda Soret (425 nm) como porcentaje del total inicial. Se ajustaron los datos a un modelo de decaimiento exponencial y los valores reportados se expresaron en unidades de min^{-1} .

3. VALIDACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS.

3.1. El caso de la cloroperoxidasa. Avances y retos en el estudio de CPO.

La cloroperoxidasa es una de las peroxidasas más estudiadas. Desde su descubrimiento en la década de los 60 en el hongo parasítico *Caldariomyces fumago*, ha sido el centro de atención de los estudiosos de las hemo-proteínas^{59,60}. Es una proteína con un plegamiento único, compuesto por una serie de 8 hélices alfa, en cuyo centro de masas se encuentra un grupo hemo penta-coordinado por un tiolato, impuesto por la cisteína 29 (C29). Esta enzima es capaz de catalizar reacciones tipo peroxidasa, además de halogenaciones oxidativas en átomos de carbono. Además comparte similitudes con los citocromos P450, tanto en la arquitectura del sitio activo como en las reacciones que lleva a cabo: hidroxilaciones en carbonos sp²⁵⁹.

En casi 50 años de estudio, la enzima no ha podido ser manipulada de manera exitosa a nivel genético, por las dificultades en el desarrollo de las herramientas de biología molecular en el organismo de origen y mucho más problemático aún, la incapacidad de expresión heteróloga por problemas de plegamiento correcto en otros organismos^{59,61-64}. Sin embargo estas limitaciones no han impedido trabajar con la enzima silvestre⁶⁵.

En el último reporte de Ayala *et. al.*⁶⁶ se estudió el fenómeno de inactivación suicida en la CPO por H₂O₂. En ese estudio se determinó que la proteína no pierde estructura terciaria cuando se inactiva completamente. Estos datos concordaron con los trabajos previos, en donde se exploró la formación de radicales libres de aminoácidos durante la reacción de CPO con *m-cpba* mediante EPR y sólo se detectaron las especies intermediarias Cpd0, Cpd I y Cpd II⁶⁷⁻⁶⁹. Se sugiere que el proceso predominante durante la inactivación de la CPO es la destrucción del grupo hemo, ya que sólo la banda Soret desaparece durante de la reacción con H₂O₂.

Al analizar las masas relativas de los aminoácidos totales de CPO inactivada, se encontró una desproporción en la cantidad de triptófanos, encontrando una disminución y sugiriendo su oxidación. De igual manera los residuos de metionina fueron oxidados. No obstante los resultados, las limitaciones técnicas de la metodología empleada, en la

cual se oxidan residuos de metionina durante la derivatización, arrojó la interrogante de si fueron oxidados mediante el proceso de inactivación oxidativa o durante el tratamiento de espectrometría de masas, la cual quedó pendiente⁶⁶.

Abordamos este trabajo con las herramientas QM/MM *Et-pathway*, para determinar si existían residuos capaces de donar electrones al CpdI de CPO y apoyar la evidencia anterior⁶⁶. De esta forma, se estudiaron los flujos electrónicos durante la inactivación de CPO.

Expresar CPO heterológamente en *A. nidulans* fue un reto importante, ya que la validación experimental es un proceso inherente al cálculo de los procesos de transferencia electrónica que sufre la proteína durante su inactivación por H₂O₂. A pesar de contar con datos teóricos de la inactivación, la carencia de un sistema experimental robusto impidió verificar experimentalmente las hipótesis generadas por métodos QM/MM.

A pesar de existir reportes de la expresión de CPO en *Aspergillus niger*, la reproducción de los datos no ha sido posible debido a la inestabilidad genética de la cepa (integración no homóloga del gen *cpo* en el genoma de *A. niger*)⁵⁹. Por nuestra parte, no fue posible generar una cepa recombinante de *Aspergillus nidulans* capaz de expresar CPO. No obstante, se generó información teórica acerca del proceso de inactivación al identificar varios residuos de bajo potencial redox proclives a oxidarse en presencia de CPO-CpdI.

Los cálculos QM/MM fueron realizados con el paquete Qsite Schrödinger® el cual implementa el cálculo de campo autoconsistentes (SCF, Self Consistent Field) en la región cuántica hasta resolver la función de onda de manera. Para el cálculo de la función de onda, se empleó la metodología UDFT o DFT sin restricción de spin (Unrestricted Density Functional Theory). Todos los cálculos se hicieron con el método híbrido DFT con funciones base tipo B3LYP (Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) y HF/6-311G (*d,f,p*).

No obstante las aproximaciones del método DFT, el cual es empleado ampliamente en sistemas bio-inorgánicos por describir propiedades electrónicas y atómicas como distancia de enlace y frecuencias vibracionales con alta precisión, se recurrió

nuevamente a calcular las energías totales y las densidades de spin con el método Hartree-Fock en cada estructura geoméricamente optimizada.

Los cálculos fueron realizados en 4 procesadores AMD Athlon®, en el clúster Sputnik II del Instituto de Biotecnología, UNAM. El sistema consistió en la enzima completa CPO, con todas sus modificaciones post-traduccionales (N y O glicosilaciones: N-Acetilglucosamina y Manosa, respectivamente), inmersa en aguas explícitas a 8 Å tipo SPC y en estado activado o CpdI, el cual fue generosamente proporcionado por el Dr. Victor Guallar (BSC, España) (código PDB 2J5M, Cpd0 de CPO). Este intermediario se calculó empleando la misma región QM, con acoplamiento antiferromagnético en el Fe y con multiplicidad doblete ($S=1/2$).

El sistema total incluyó 12933 átomos, de los cuales entre 150 a 275 átomos fueron tratados en la región cuántica. Se estudió el sistema en estado doblete de multiplicidad de spin con deficiencia de carga negativa, es decir, para emular la oxidación que promueve la extracción de un electrón de un aminoácido o del mismo grupo hemo. La región cuántica incluyó el grupo hemo y su átomo central de Fe, el oxígeno proximal derivado del rompimiento del H_2O_2 , la molécula de agua derivada del proceso anterior y los residuos A27, P28, C29, P30, A31 y E183 (Fig. 3.1).

Para analizar la transferencia desde residuos oxidables, se analizaron 5 posiciones: M61, M153, W209, W210 y W213. De igual manera se realizaron experimentos de competencia para determinar cual residuo donaba mayor densidad de spin al CpdI. En la siguiente tabla se resumen los datos de oxidación derivados del CpdI de CPO.

Residuo	Densidad de spin en residuo	Oxidación del residuo (%)
M61	0.098	9.8
M153	0.353	35.3
W209	0.992	99.2
W210	0.674	67.4
W213	0.349	34.5

Tabla 3.1. *Densidad de spin y el porcentaje de oxidación de cada residuo estudiado mediante QM/MM et-pathway. Todos los cálculos se realizaron en estado doblete ($S=1/2$) y se incluyeron de manera independiente cada uno de los residuos oxidables. La suma total de spin =1.*

Sobre los residuos de metionina, en particular M153, este fue oxidado un 35%, mientras que M61 sólo 10%, lo cual sugiere que no son residuos muy fácilmente oxidables, ya que se encuentran en promedio a 9 Å del grupo hemo. En este sentido, si existe una competencia por la donación de electrones, estos residuos tendrían menor probabilidad de donación durante la competencia. La mayor población de spin se distribuyó entre el ligando axial C29 y el residuo E183 incluidos en la región cuántica. El grupo hemo no presentó la deslocalización electrónica mayoritaria, salvo en el propionato del anillo *d*, el cual podría marcar alguna ruta de extracción electrónica (Fig. 3.1).

Este resultado sugiere que los residuos de metionina podrían tener un papel minoritario en la reducción del Cpd I o si se oxidan, que lo hagan más lentamente que la oxidación del anillo de porfirina.

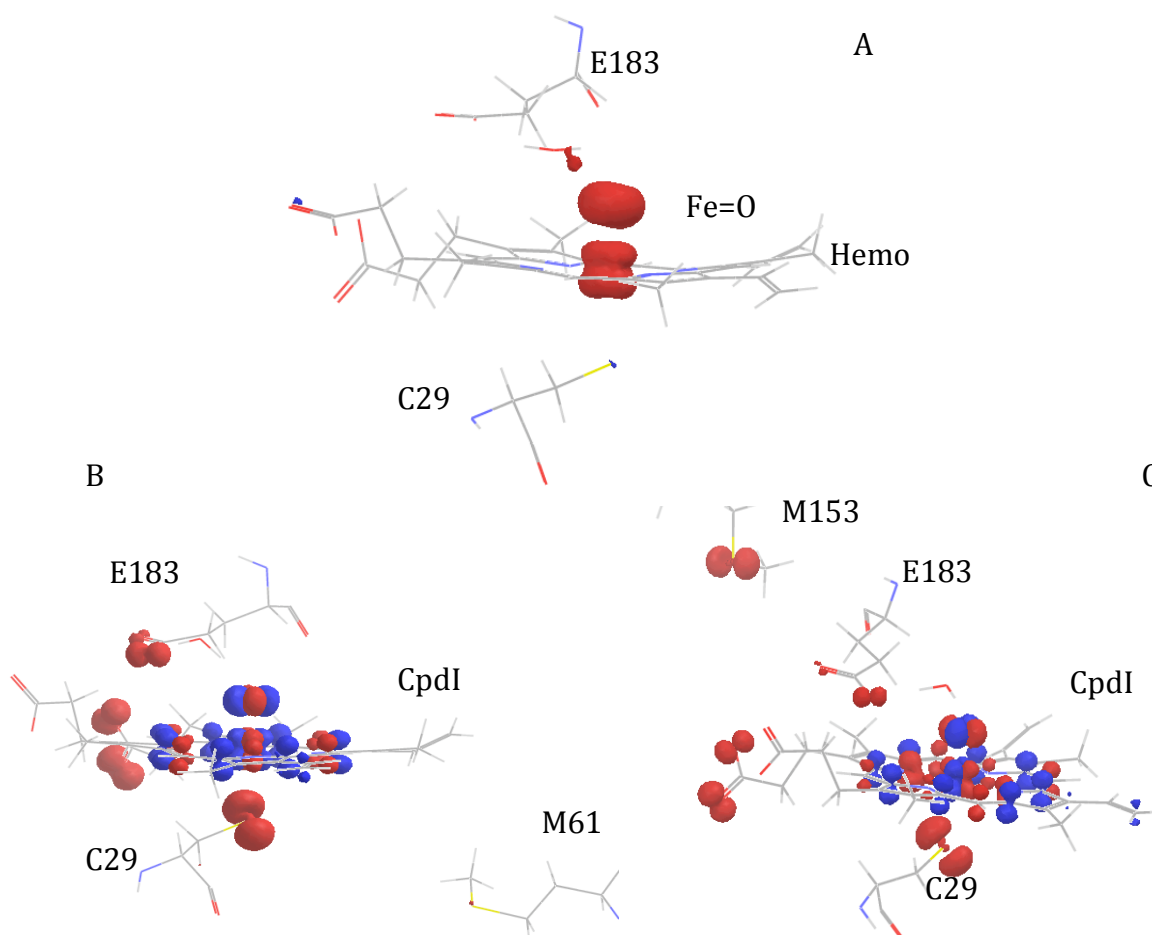


Figura. 3.1. *Representación gráfica de la población de spin en residuos seleccionados, calculada para el CpdI de la cloroperoxidasa. A. CpdI sólo con ligandos axiales C29 y E183. B. Ensayo de transferencia electrónica al CpdI al incluir a M61, el cual no es buen donador. C. Ensayo de transferencia electrónica al CpdI al incluir a M153, el cual es buen donador.*

En la figura 3.2 se muestra la transferencia electrónica entre el CpdI y los tres residuos de triptófano, es decir, un experimento de competencia donde los tres triptófanos estaban incluidos en la región cuántica, además de los residuos M61 y M153.

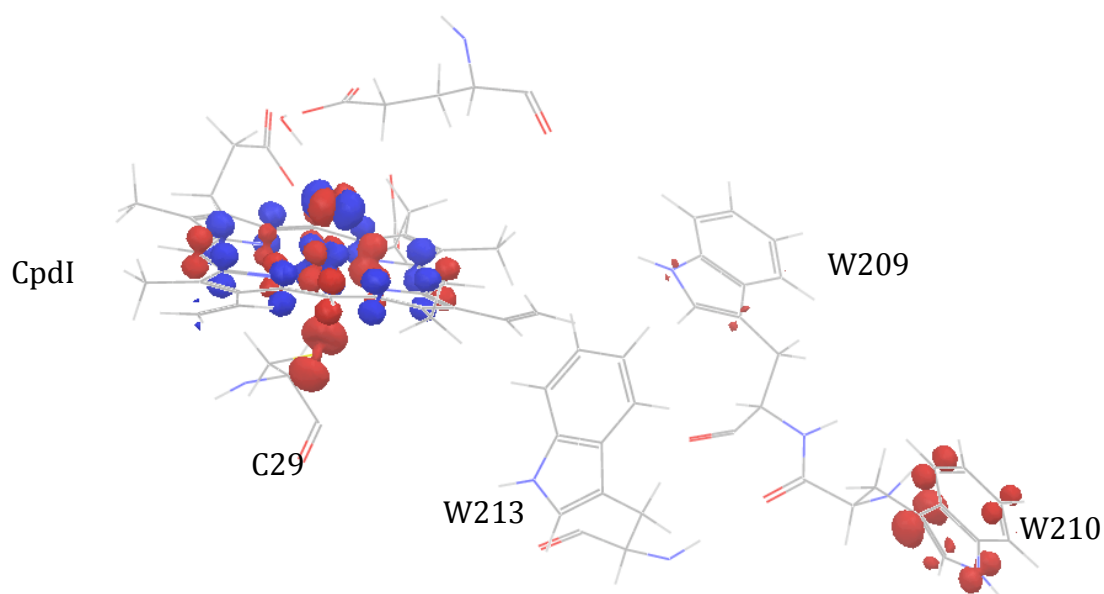


Figura 3.2. *Ensayo de competencia entre el CpdI y los tres residuos de W contiguos en CPO. El residuo W210 es la posición con mayor densidad de spin. Sin embargo, el ligando axial C29 también donó densidad hacia el CpdI contiguo, siendo congruente con los reportes que identifican a C29 oxidado.*

Residuo	Densidad de spin en residuo	Oxidación del residuo (%)
M61	0.001	0.1
M153	0.0001	0.01
W209	0.115	11.5
W210	0.289	28.9
W213	0.004	0.4

Tabla 3.2. *Densidad de spin y el porcentaje de oxidación de los residuos de W de CPO. Todos los cálculos se realizaron en estado doblete ($S=1/2$) y se incluyeron de manera simultánea cada uno de los residuos oxidables. La suma total de spin = 1.*

En los experimentos independientes entre cada residuo de triptófano y el CpdI, se determinó que en los tres residuos hay densidad de spin significativa, lo cual es congruente con el resultado experimental en el cual los tres residuos son parcialmente oxidados. No obstante, en el ensayo de competencia, es decir, con los tres residuos en la región QM, sólo dos residuos donan densidad de spin: W209 y W210. Estos residuos son los más alejados al grupo hemo, además de que W210 se encuentra en la superficie

accesible al solvente, así como la posición más probable de ser reducida por la presencia de sustrato, al ser oxidada.

Por otro lado, el residuo más cercano, W213, podría funcionar como puente entre los residuos expuesto y el CpdI. En este caso, el ambiente alrededor de W209 y W210 parece favorecer la deslocalización del electrón. Estos residuos se encuentran cercanos a la superficie y están rodeados de grupos electrodonadores, como Y221 o moléculas de agua superficiales que estabilicen la transferencia. Estas características derivarían en sitios superficiales de óxido-reducción.

De estos experimentos se concluye que la transferencia electrónica puede ocurrir desde los residuos vecinos hasta el CpdI, sin embargo, la ausencia de señales de radicales basadas en aminoácidos nos hace pensar que podría estar sucediendo un fenómeno previo, es decir, que la oxidación del grupo hemo sea un fenómeno más rápido y más favorecido que la oxidación de aminoácidos. La discusión se complica entre los fenómenos que son posibles y los fenómenos que son probables. ¿Cuál es la probabilidad de encontrar señales por EPR de radicales basados en W? Entonces ¿Cómo se encuentran los W parcialmente oxidados?

Estas incógnitas podrán ser atacadas hasta contar con un sistema de validación *in vitro*, el cual permita generar las mutantes puntuales y verificar la reducción en la velocidad de inactivación, además de afinar los métodos analíticos para la asignación de los residuos oxidados. Otra alternativa es la identificación de las especies transitorias por métodos espectroscópicos de alta velocidad que vuelvan a los ensayos clásicos por espectroscopia UV/Vis obtenidos hace más de 30 años⁷⁰.

3.2. El caso del citocromo c estable. Usando herramientas QM/MM para entender el fenómeno de estabilización.

En un reporte previo de nuestro grupo, se reportó la estabilización catalítica del citocromo c ante concentraciones elevadas de H₂O₂. En ese trabajo, se generó una variante (N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G) cuyo grupo hemo no se destruía tras 120 minutos de exposición a 1 mM de H₂O₂. Además, la actividad peroxidasa de esta variante no disminuyó significativamente con el tiempo de reacción²⁵.

La generación de esa variante siguió la premisa de aislar al sitio activo con residuos con alto potencial rédox, es decir, generar una barrera aislante al flujo electrónico para evitar las reacciones no controladas derivadas de la reacción con H₂O₂ que derivaban en especies intermediarias con alto poder oxidante (Cpd0, CpdI y CpdII)⁷¹. Este trabajo se basó en la evidencia del desbalance electrónico durante la reacción entre citocromo c y H₂O₂, la cual evidencia que otras fuentes electrónicas, como residuos de aminoácidos, podrían participar en la inactivación suicida¹⁵.

Para validar nuestro método, realizamos el ejercicio inverso al de esta tesis, es decir, partimos de un sistema estabilizado experimentalmente e intentamos explicar como funcionaban las rutas de transferencia electrónica, tanto en el citocromo silvestre como en la variante estable. En este sentido probamos la hipótesis de la estabilización por ligando axial, en este caso, mutando el residuo de metionina 80 que coordina al átomo central de Fe.

Las rutas de transferencia se estudiaron en el sistema silvestre y en la variante estable (N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G). Se partió de la estructura resuelta por cristalografía de rayos X de la proteína silvestre del 1-iso-citocromo c (código PDB 1YCC)⁷² y se generaron las mutaciones introducidas en el trabajo previo del grupo mediante el paquete *psfgen* contenido en el programa de simulación molecular NAMD.

Para realizar la misma jerarquización mediante la distribución de probabilidad de Maxwell-Boltzmann, se produjeron 50 ns por dinámica molecular, con el paquete NAMD v.2.6 usando el campo de fuerza CHARMM 2.7 (University of Illinois, Urbana-Champaign). El sistema total incluyó 4110 moléculas de agua tipo TIP3 y 7 iones Cl⁻ necesarios para la neutralización.

Se recuperó la estructura más representada y que además se ajustara a los siguientes parámetros:

- Enlace Fe-S ~5 Å.
- Grupos propionatos en enlace de hidrógeno
- RMSD (cadena principal) no mayor a 0.8 Å, con respecto al cristal.

La región QM comprendió el grupo hemo y la fracción O, los residuos N13, C14, R15, Q16, C17 y H18, siendo un total del 146 átomos en la región QM básica. Al incluir más átomos en la región de transición, se alcanzó como máximo 437 átomos cuánticos.

Se estudió el sistema en estado doblete ($S=1/2$) de multiplicidad de spin con deficiencia de carga negativa, es decir, para emular la oxidación que promueve la extracción de un electrón de un aminoácido o del mismo grupo hemo. En la estructura seleccionada se optimizó el CpdI ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ – porfirina \cdot^+) en estado doblete y se procedió al estudio de las rutas en el mismo estado de multiplicidad de spin. Las cargas puntuales se ajustaron al potencial electrostático. Simulamos al CpdI como especie oxidante, ya que múltiples reportes han mostrado que la reacción entre H_2O_2 genera especies transitorias de alto potencial redox⁷³ en citocromo c desplegado⁷⁴. De igual manera, mediante experimentos de *spin trapping*, se han detectado especies derivadas del rompimiento heterolítico del enlace O-O del H_2O_2 ⁷⁵⁻⁷⁸. En nuestro grupo, se detectó mediante EPR, una de las especies *en vía* de CpdI, Cpd0, la cual resulta del rompimiento heterolítico del H_2O_2 .

En la figura 3.3 se muestran los residuos que densidad de spin al CpdI de la proteína silvestre. La mayoría de estos residuos había sido descritos previamente, salvo Y46 y Y48, los cuales se sugieren como relevantes debido a su cercanía con el grupo hemo. Se encontró densidad de spin en Y74 y Y97, las cuales han sido objeto de estudio por ser nitrosiladas, tanto *in vivo* como *in vitro* durante la reacción del CYC con peroxinitritos⁷⁹⁻⁸².

En la misma figura 3.3 se muestra el mapa de la variante estable, la cual cambia significativamente en su distribución de spin con respecto a la proteína silvestre. En esta variante no encontramos de densidad de spin en Y46 y Y97. Sin embargo, el ligando axial M80 aparece donando mayor densidad de spin, con respecto a la proteína silvestre, lo que sugeriría un rol mucho más activo al donar electrones para reducir a CpdI.

En ambas proteínas se encuentra densidad de spin en la Y74, que se encuentra a 5 Å sobre la M80 en la proteína silvestre y a 8 Å en la variante estable. Se sugiere que este residuo podría generar radicales libres centrados en tirosina, y que además, este podría estabilizarse por el enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de E64.

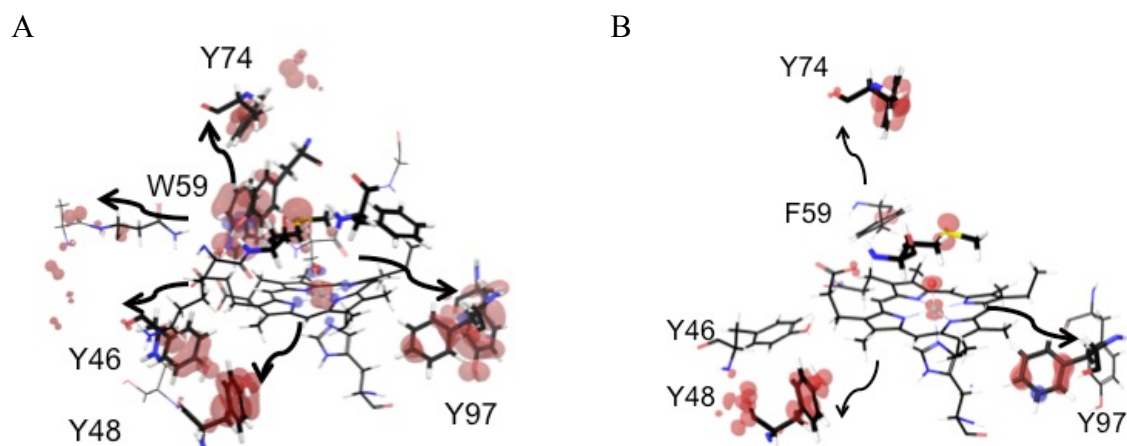


Figura 3.3. **Rutas de transferencia electrónica en las variantes de citocromo c.** A. Citocromo c silvestre. Los residuos Y46, Y48, W59, Y67, Y74, M80 y Y97 donan densidad de spin. B. Variante estable de citocromo c (N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G). En esta variante, la densidad de spin se localizó en los residuos Y48, Y74, M80 y Y97, sugiriendo rutas distintas con respecto a la proteína silvestre.

Para obtener información acerca del papel de M80 como “candado”, es decir, que la metionina axial fuera capaz de donar densidad electrónica para evitar la propagación del daño por radicales, se preparó la mutante N52I, W59F, Y67F, K79A, **M80A**, F82G y se determinaron sus constantes catalíticas en la oxidación de 2-metoxifenol (guayacol). Se realizaron los controles de la enzima silvestre y la variante estable. Además, se determinaron las constantes para la variante N52I, Y67F, M80A, como control de ausencia de la sexta coordinación.

También se determinaron las constantes de inactivación, al ajustar los datos de actividad residual en la oxidación de cloruro de pinacianol (tabla 3.3).

Variante de citocromo c	$K_{M \text{ ap } H_2O_2}$ (mM)	$k_{cat \text{ ap } H_2O_2}$ (min^{-1})	k_i (min^{-1})
WT16	2.85 ± 0.51	32.36 ± 5.67	0.08 ± 0.01
N52I,W59F,Y67F,K79A,F82G	2.00 ± 0.63	34.21 ± 4.32	*
N52I,Y67F,M80A	4.28 ± 0.97	53.74 ± 6.42	0.06 ± 0.05
N52I,W59F,Y67F,K79A,M80A,F82G	5.58 ± 0.84	62.23 ± 7.21	2.57 ± 0.05

* No se detectó pérdida de actividad en 120 min de incubación en 1 mM H_2O_2 .

Tabla 3.3. **Constantes catalíticas calculadas para variantes de citocromo c.** La sustitución de M80 resulta en la variante estable (N52I,W59F,Y67F,K79A,M80A,F82G) aumenta la velocidad de inactivación aunado a un incremento en la actividad específica.

En la tabla 3.3 se muestra como la constante catalítica aumenta casi al doble para las variantes M80A. Sin embargo, estas mismas variantes muestran valores mayores de constante de inactivación. Para el caso de WT16, el que tenga una constante de inactivación parecida N52I, Y67F, M80A puede obedecer a que tiene todas la rutas de transferencia abierta. No obstante, la variante N52I, Y67F, M80A pierde la estabilización por el átomo de S.

Es notable como la variante menos estable M80A gana actividad, debido a la reactividad elevada de un hemo penta-coordinado. No obstante, este sistema se encuentra expuesto a un mayor ataque por parte de los intermediarios altamente oxidantes, ya que se forman de manera más acelerada. Estudios de EPR en el citocromo c silvestre demostraron la capacidad de generar radicales libre basados en aminoácidos durante la reacción con H_2O_2 o peróxidos orgánicos, sin embargo, la naturaleza exacta de las especies radicalarias no fue elucidada^{83,84}.

Con esta aproximación se intentó obtener información del fenómeno *a posteriori*, es decir, entender la estabilización como la remodelación de las rutas de transferencia en la variante estable, con mayor énfasis en el papel estabilizador de M80 al ceder electrones durante la formación descontrolada de intermediarios con alto poder oxidante.

CAPÍTULO 4. DE LA TEORÍA AL EXPERIMENTO.

4.1. Análisis conformacional del citocromo P450_{BM3} mediante dinámica molecular.

Los estudios de mecánica molecular en la enzima silvestre 21B3 P450_{BM3}, fueron necesarios para optimizar las estructuras a analizar por el algoritmo QM/MM. Este último se limita a cientos de átomos o decenas de residuos, cuya conformación no se modificó significativamente (el RMSD calculado sobre C_α fue 0.7 Å). Por lo tanto, se necesitó contar con conformaciones, lo más representativas, de la población experimental para los análisis siguientes.

En la figura 4.1 se muestran el RMSD y RMSF (calculados sobre C_α) resultantes de los 10 ns de simulación de 21B3 P45_{BM3}. Se aprecia que la estructura se estabiliza durante los primeros 500 ps de simulación, por lo que 10 ns de simulación resultaron suficientes para los análisis.

El análisis del RMSF (calculado sobre C_α) nos permitió determinar las regiones de la enzima más móviles o flexibles. Esto toma sentido ya que se ha especulado que los residuos que componen las rutas de transferencia de electrones, e inclusive, las proteínas mismas encargadas de transferir electrones, presentan conformaciones muy rígidas o de baja movilidad²¹. De manera muy interesante, la región de unión al grupo hemo (C400) es muy poco flexible. Esto podría entenderse a la existencia de un sitio específico sobre el cual se posiciona el hemo.

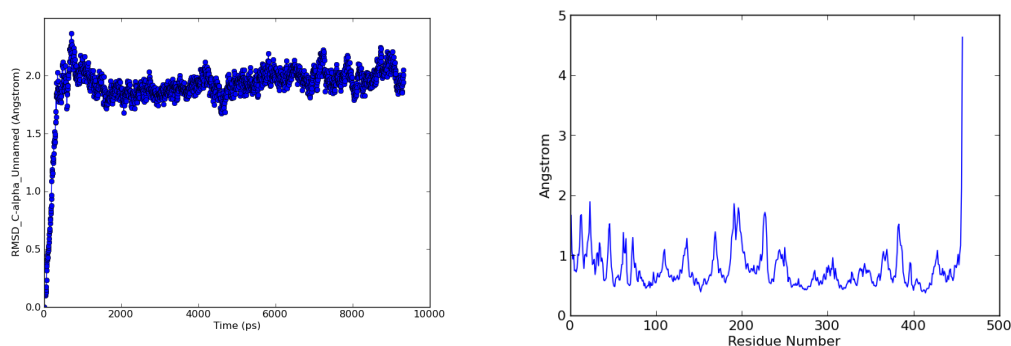


Figura. 4.1. *Fluctuaciones atómicas promedio de la enzima 21B3 P450_{BM3}. En el panel derecho se observa el RMSD promedio de los C_α durante los 10 ns de simulación. En el panel izquierdo se muestran las fluctuaciones promedio por residuo.*

Al calcular la distribución de Maxwell-Boltzmann sobre las energías totales de las proteínas, se logró jerarquizar por medio de un criterio energético, a las estructuras resultantes y así obtener aquella más representadas en la simulación, es decir, las conformaciones que tendrían mayor probabilidad de aparecer en solución. De manera adicional, se realizó un análisis de clustering, usando el RMSD sobre C_α con *cutoff* de 0.5 Å. La estructura energéticamente más probable se encontró en el cluster más representado, mientras que la estructura energéticamente menos probable se ubicó en el cluster menos poblado.

Se seleccionaron 3 estructuras de acuerdo a su frecuencia y cuyo RMSD no fuera mayor a 0.5 Å (Fig. 4.2).

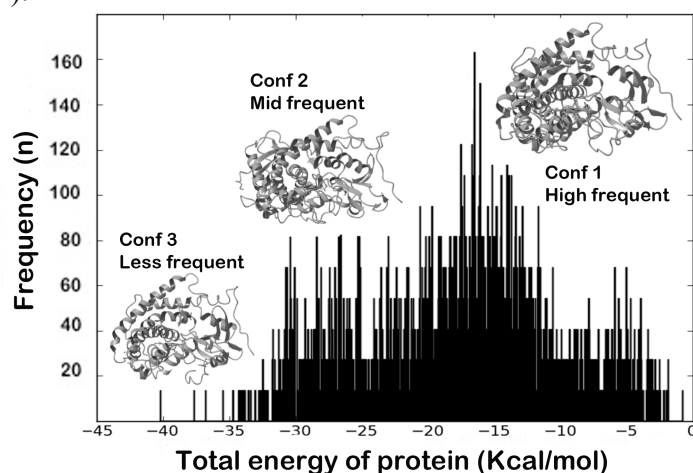


Figura 4.2. **Distribución de las conformaciones de 21B3 P450_{BM3} durante la simulación.** La energía total del sistema está expresada en decenas de miles de Kcal/mol. Se esquematizan las conformaciones seleccionadas así como la región de la distribución donde se recuperaron. El orden de la energía total se muestra en decenas de miles.

4.2. Descripción de la multiplicidad del compuesto I de P450_{BM3}.

El CpdI es un di-radical con dos electrones desapareados tanto en el complejo Fe^{IV}=O como en la porfirina. No obstante, en los metales de transición los electrones pueden ocupar distintos orbitales, es decir, presentar estados de spin degenerados⁸⁵. En estos estados, la multiplicidad (2S+1) puede variar, repercutiendo en el número de electrones libres en cada complejo. Para el caso de Fe^{IV} en el CpdI de los P450, su configuración electrónica es d⁵, es decir, es realmente un Fe^V con cinco electrones por acomodar en los orbitales. De esta manera, podemos encontrar 1 electrón desapareado (S=1/2) cuya multiplicidad será 2 (doblete), 3 electrones (S=3/2) en estado cuarteto y 5 electrones (S=5/2) en estado sexteto (Fig. 4.3).

Los tres estados de multiplicidad de spin fueron estudiados en cada una de las simulaciones, a manera de obtener un panorama de cual estado resulta más poblado. Para tal efecto, la diferencia energética entre cada estado fue utilizado para calcular la probabilidad de ocurrencia.

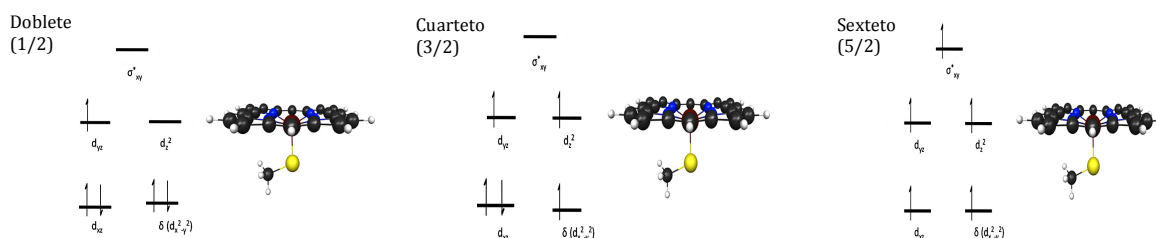


Figura. 4.3. **Probables estados de spin en el Fe hémico de los citocromos P450.** En cada estado de multiplicidad de spin se muestra la distribución promedio de los electrones en los orbitales atómicos. Esta distribución electrónica influye de manera directa en la geometría del complejo y su reactividad.

La diferencia en energía total entre cada estado de spin fue calculada mediante la distribución de probabilidad de Maxwell-Boltzmann. De esta manera, se contó con una herramienta que nos permitió seleccionar cual de las posibles rutas es más probable así como el estado de spin preferente, en términos energéticos.

En la figura 4.4 se muestran los resultados del cálculo de la distribución de probabilidad de la ocurrencia de las diferentes configuraciones de spin del CpdI de 21B3 P450_{BM3}. Para descartar posibles interferencia por el tamaño de la región QM, se incluyeron diferentes residuos para calcular las propiedades del CpdI.

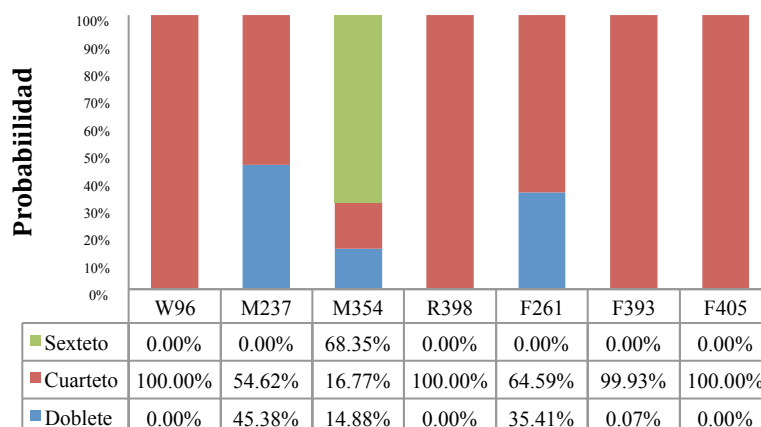


Figura. 4.4. **Probables estados de spin del CpdI y su modificación al incluir residuos vecinos en la región QM.** La probabilidad de transferencia de cada ensayo se expresa en porcentaje para cada estado de spin. Se incluyeron varios residuos de aminoácido en la región cuántica básica como control.

4.3. Rutas de transferencia electrónica en citocromo P450_{BM3}.

Se determinó que la diferencia energética entre los estados de multiplicidad de spin doblete y cuarteto, no era significativa, de tal forma que empleamos la multiplicidad reportada experimentalmente del compuesto I de P450 de *Sulfolobus acidocaldarius*³⁴, que es un **doblete** (S=1/2) o Fe^{IV} de bajo spin. Sin embargo, existen estados mezclados de spin y se han descrito ampliamente para múltiples hemo proteínas, como catalasas-peroxidasas, CYPs P450, peroxidasas de plantas, etc⁸⁵⁻⁹². En un estudio reciente, se encontró una diferencia de 1.01 Kcal/mol entre el cuarteto y el doblete en P450_{cam} y varias iso-formas de CYPs P450⁹³. Nuestras simulaciones mostraron una diferencia alrededor de ~ 3.4 Kcal/mol. De tal manera, que los siguientes cálculos de estudio de transferencia se realizaron en estado doblete (S=1/2).

El algoritmo empleado nos permitió identificar los residuos aminoácidos que localizan mayor densidad de spin al incluir un electrón extra en su descripción cuántica (carga +1). De esta manera, pudimos aumentar la región cuántica inicial paulatinamente, al agregar iteradamente más residuos aminoácidos y describir la ruta que seguiría el electrón. Para este estudio, partimos del compuesto más oxidante (CpdI) y proseguimos aumentando la región cuántica hasta la superficie accesible al solvente, explorando los residuos de aminoácidos intermedios en el camino.

En la tabla 4.1 se describen las rutas estudiadas, que van desde algún residuo oxidable localizado en superficie accesible al solvente (W90, Y160, W325 y M237), hasta el compuesto I (CpdI) en el interior de la proteína.

Et-pathway	Residuos de aminoácidos que comprenden la ruta (desde el donador al aceptor)
1	Y334/W90-T91-W96-A399-C400-CpdI
2	Y160-N159-G157-C156-M119-M118-F405-Q404-Q403-G402-C400-CpdI
3	W325-L324-R362-H361-P392-F393-C400-CpdI
4	M237-F261-G402-C400-CpdI

Tabla 4.1. *Residuos de aminoácidos pertenecientes a rutas de transferencia electrónica. Los residuos marcados se seleccionaron por su capacidad de deslocalizar densidad de spin durante los cálculos con el algoritmo QM/MM Et-pathway..*

Se encontraron 4 rutas robustas, es decir, los mismos residuos de aminoácidos, en diferentes conformaciones y estados de spin, trazando las mismas rutas. El dato principal del análisis fue la densidad de spin que albergaban los aminoácidos en cada ruta. Entonces así se lograron trazar “los cables conectores” o rutas de transferencia.

A continuación se enlistan los residuos de aminoácido que componen cada ruta y su posible efecto en la transferencia de electrones.

La ruta 1 describió la transferencia desde el residuo W90 hasta CpdI, conectando en su ruta al residuo W96. Esta ruta opera principalmente mediante efecto de transferencia de carga o inductivo por el esqueleto proteico, estando muy marcada la región del ligando axial C400 hasta el residuo R398. En este último residuo, la densidad de spin se encontró en la cadena lateral guanidinio, la cual es co-planar al anillo indólico de W96, probablemente promoviendo la continuidad de la ruta (Fig. 4.5).

Sólo W96 presentó densidad de spin al ser incluida en la primera región de C400-R398, excluyendo a residuos como R100, en distancia de enlace de hidrógeno con el propionato *a* del grupo hemo. Este último no donó densidad de spin, soportando la continuidad de la ruta por W96.

T91 fue el siguiente residuo identificado, conectándose con W90 por transferencia de carga. Este residuo, localizado en la región más externa del “canal de salida de agua”^{94,95} se encuentra, en promedio a 10 Å del hemo y a 3 Å de Y334, además siendo co-planar a H92. Estos dos últimos residuos sí presentaron densidad de spin al ser incluidos en la región cuántica, sugiriendo que en esa conformación, pueden ser oxidados.

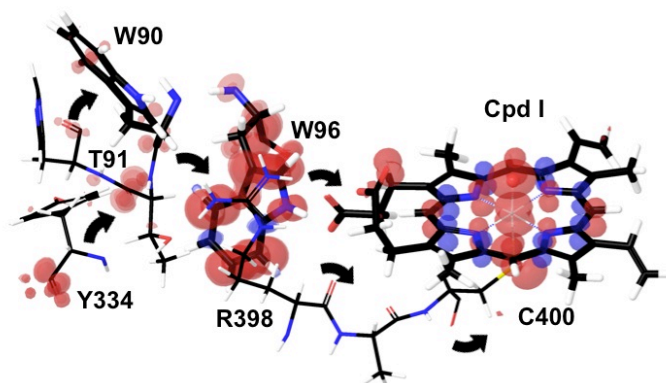


Figura. 4.5. *Ruta 1 estudiada por QM/MM Et-pathway*. En flechas se esquematizan los residuos donadores. Los residuos y el compuesto I se esquematizan en bastones. La densidad de spin se esquematiza en color rojo.

En la segunda ruta, se conectó al residuo Y160 con el CpdI mediante el residuo F405 cercano al grupo vinilo *b* del hemo. Estos grupos vinilo se han identificado como grupos electrónicamente activos en los grupos hemo y su interacción con estructuras resonantes se ha identificado como ruta de entrada de electrones durante la reducción del CpdI⁹⁵. El residuo Y160 se encuentra a 15 Å del CpdI y presentó en la región intermedia residuos oxidables como Y115, M118, M119 y C156. Sin embargo, la ruta prosiguió, al incluir residuos cercanos a los anteriores, los cuales promovieron la deslocalización de la densidad a otros residuos superficiales. De esta manera se logró prolongar una ruta hasta Y160 en la superficie (Fig. 4.6).

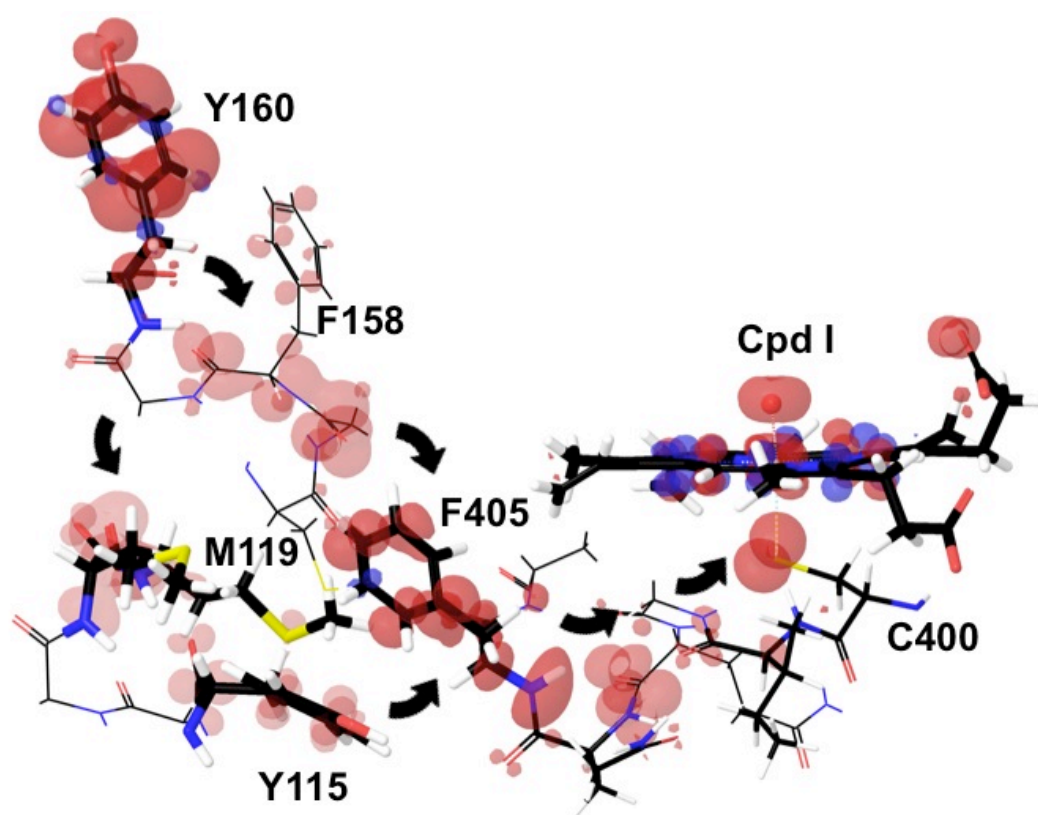


Figura. 4.6. *Ruta 2 estudiada por QM/MM Et-pathway.* Las flechas esquematizan los residuos donadores y la dirección de la donación. Los residuos y el compuesto I se esquematizan en bastones. La densidad de spin se esquematiza en color rojo. La ruta puede proseguir por M119 o por C156 hasta Y160.

En esta ruta el efecto más importante fue impuesto por F405, la cual estabilizó al electrón transitoriamente, funcionando como “puente” hacia la región de Y115, M118 y M119 para proseguir por C156, a través del esqueleto por transferencia de carga, hasta su estabilización final en Y160.

La tercera ruta conectó al residuo W325 con CpdI (~13 Å). Esta ruta presenta un fuerte componente de efecto resonante o de dobles enlaces conjugados (como en anillos de F, H y W), ya que F393, H361 y W325 median la transferencia de manera localizada. La ruta prosigue por la C400 al F393, localizado a 3 Å. Este residuo se encuentra conectado a H361 mediante el residuo P392. Desde H361 se transfiere el electrón a R362, cuya cadena lateral es co-planar a W325; o al esqueleto de L324 prosiguiendo hasta W325.

Sin embargo, la ruta también puede continuar, en menor medida, por P326. Este último residuo, mediante efecto de transferencia de carga o inductivo, se conectó a L324 y este a su vez, transfiere a W325. Esta último residuo fue estabilizado por F275, el cual parece interactuar por enlace tipo π - π con el anillo indólico de W325 (Fig. 4.7).

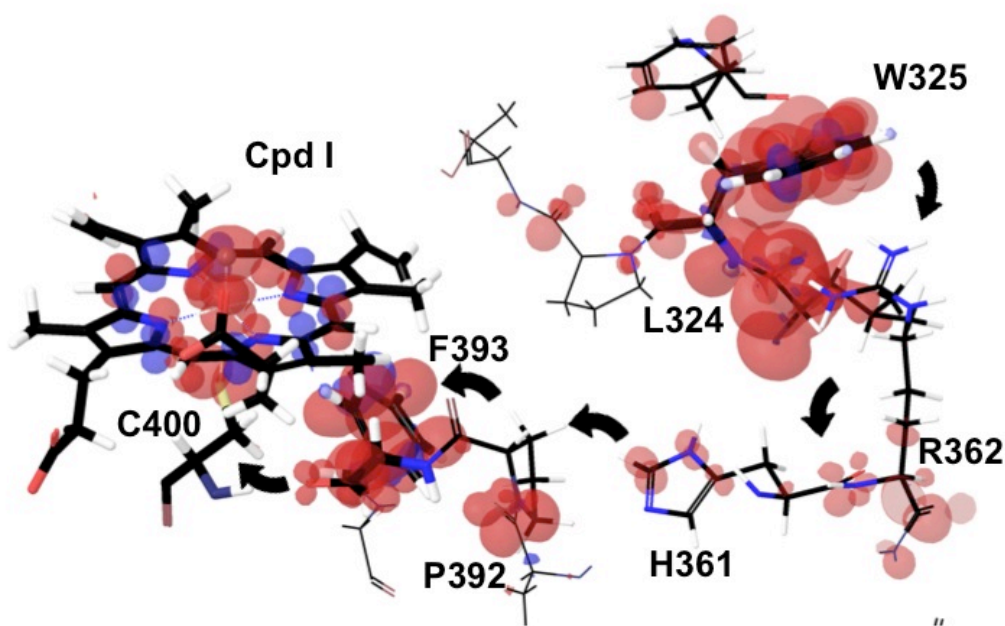


Figura. 4.7. *Ruta 3 estudiada por QM/MM et-pathway*. Las flechas esquematizan los residuos donadores. Los residuos y el CpdI se esquematizan en bastones. La densidad de spin se esquematiza en color rojo. La ruta prosigió por efecto resonante entre F393, H361 y W325.

Se ha propuesto un papel regulador del estado redox de la proteína a través de las interacciones entre F393 y el ligando axial C400. Múltiples mutantes han demostrado que entre más aislado se encuentre el C400, es decir, menos interacciones de enlaces de hidrógenos o por vecinos polares cercanos, el potencial redox aumenta^{96,97}.

La última ruta fue racionalizada para no llegar a la superficie accesible al solvente, es decir, incluiría a un residuo cercano al grupo hemo como donador último. Esta ruta conectó a M237, a ~ 9 Å del CpdI, mediante F261 como “puente”. En esta ruta, se logró describir a F261 y M237 como posibles donadores, sin embargo, al incluir a los residuos cercanos H236, T235, L238 y H329, se logró describir una ruta hasta la superficie (Fig. 4.8). H239 es el residuo más externo, no presenta residuos en interacción tipo π - π y sólo muestra enlaces de hidrógeno con moléculas de agua circundantes y se encuentra localizado a 19 Å del CpdI.

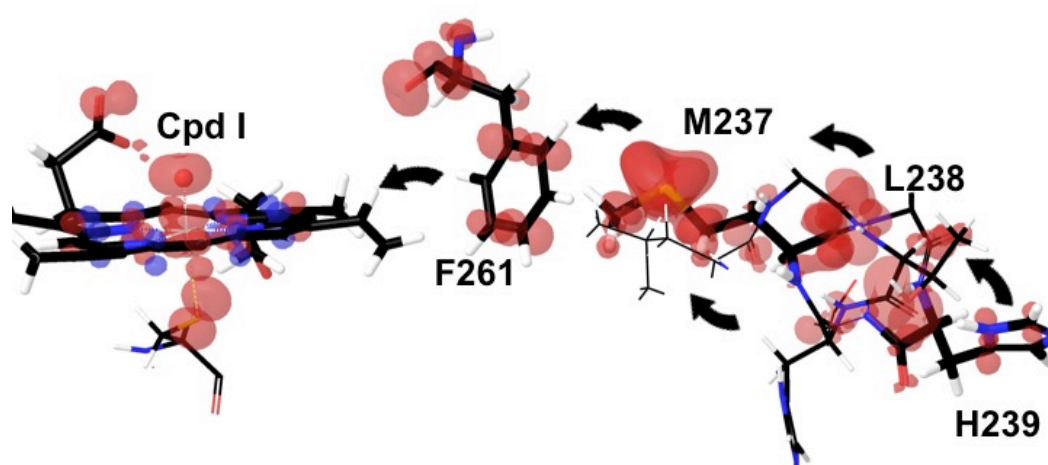


Figura. 4.8. *Ruta 4 estudiada por QM/MM Et-pathway*. Las flechas esquematizan los residuos donadores y la ruta de la transferencia. Los residuos y el compuesto I se esquematizan en bastones.

De manera general, el método anterior nos permitió identificar cuales residuos estaban involucrados en rutas de transferencia. Sin embargo, para obtener una estimación cuantitativa acerca de cual residuo era determinante en la ruta, es decir cual albergaba más densidad de spin, procedimos a incluir a todos los residuos de una ruta en el mismo cálculo.

La aproximación anterior nos permitió generar un experimento de competencia, en el cual, el residuo más susceptible a oxidarse deslocalizaría mayor densidad. La tabla 4.1 resume los resultados de densidad de spin y la fracción correspondiente al total de spin (como $S=1/2$, la suma total de spin es 1). No obstante, no nos permitió identificar cual residuo era el de mayor importancia para la ruta.

Los datos muestran una tendencia a la localización de la densidad de spin en los donadores superficiales (caso de las rutas 1-3), sin embargo, los residuos cercanos al hemo también presentan alta densidad de spin (segundos en orden). Este ensayo de competencia podría explicar por que al mutar residuos como W96 y F405, la actividad y estabilidad se modificaron significativamente. Además, los residuos cercanos coinciden con los datos experimentales en tener un papel preferente en la estructura de la ruta.

	Densidad de spin por residuo			Fracción de spin por residuo			Distancia (Å) al grupo hemo (C α -Fe)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>e-Pathway 1</i>									
W90	0.498	0.610	0.586	0.50	0.60	0.63	15.24	15.34	15.44
T91	0.008	0.005	0.059	0.008	0.005	0.06	15.93	15.92	15.95
H92	0.036	0.027	0.060	0.03	0.02	0.06	19.51	19.46	19.57
W96	0.451	0.355	0.137	0.45	0.35	0.15	14.41	14.02	14.55
Y334	0.0	0.0	0.082	0.0	0.0	0.09	19.31	19.66	19.40
R398	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.0	11.17	10.09	11.05
A399	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.35	8.01	8.25
<i>e-Pathway 2</i>									
Y115	0.562	0.070	0.034	0.06	0.07	0.03	17.20	17.23	17.32
M118	0.048	0.091	0.044	0.05	0.09	0.04	19.28	19.81	19.74
M119	0.289	0.279	0.121	0.30	0.29	0.12	17.55	17.62	17.73
C156	0.184	0.118	0.092	0.18	0.12	0.09	15.64	15.72	16.01
F158	0.003	0.014	0.038	0.004	0.01	0.04	18.63	18.59	18.89
Y160	0.139	0.362	0.435	0.14	0.37	0.43	20.99	20.45	20.82
Q404	0.069	0.004	0.095	0.07	0.004	0.10	6.73	6.76	6.92
F405	0.196	0.036	0.142	0.20	0.04	0.14	9.81	9.81	9.59
<i>e-Pathway 3</i>									
L324	0.007	0.008	0.004	0.0	0.01	0.0	11.32	11.16	11.61
W325	0.903	0.903	0.768	0.90	0.95	0.77	14.36	14.03	14.32
H361	0.0	0.0	0.002	0.0	0.0	0.0	17.89	17.24	17.03
R362	0.015	0.015	0.063	0.01	0.02	0.06	19.01	19.21	18.99
P392	0.021	0.021	0.056	0.02	0.02	0.06	9.39	10.25	9.87
F393	0.058	0.004	0.100	0.06	0.06	0.10	6.36	6.92	6.42
<i>e-Pathway 4</i>									
L233	0.009	0.007	0.009	0.009	0.007	0.01	15.47	16.01	15.24
H236	0.233	0.001	0.195	0.23	0.002	0.20	19.16	18.94	18.76
M237	0.479	0.433	0.515	0.48	0.45	0.52	18.95	18.83	18.92
L238	0.010	0.008	0.005	0.01	0.009	0.01	22.59	21.32	21.02
H239	0.261	0.337	0.263	0.26	0.35	0.26	23.81	23.96	23.76
F261	0.004	0.171	0.006	0.004	0.18	0.01	9.37	9.98	10.21

Tabla. 4.2. *Ensayos de competencia entre los aminoácidos de cada ruta. En este ensayo sólo los residuos con mayor densidad de spin fueron seleccionados y re-calculados para encontrar al residuo preferente en la ruta.*

La ruta 4 parece ser la excepción, ya que el residuo H239 albergó menor densidad de spin durante el ensayo de competencia y M237 tuvo el 60 % del spin total. Estos datos sugieren que M237 puede estar en una ruta de extracción de electrones no superficial. Sin embargo, como vimos previamente, la ruta puede ser rastreada hasta H239 en la superficie, sugiriendo una ruta expedita durante la inactivación.

Encontramos que los residuos de aminoácido pertenecientes a las rutas de transferencia electrónica estaban en las regiones de menor movilidad, es decir regiones con RMSF menores al promedio (Fig. 4.9). Esto coincide con la descripción clásica de cables conectores a nivel intramolecular, propuesta para las proteínas evolucionadas para transferencias electrónicas eficientes²¹.

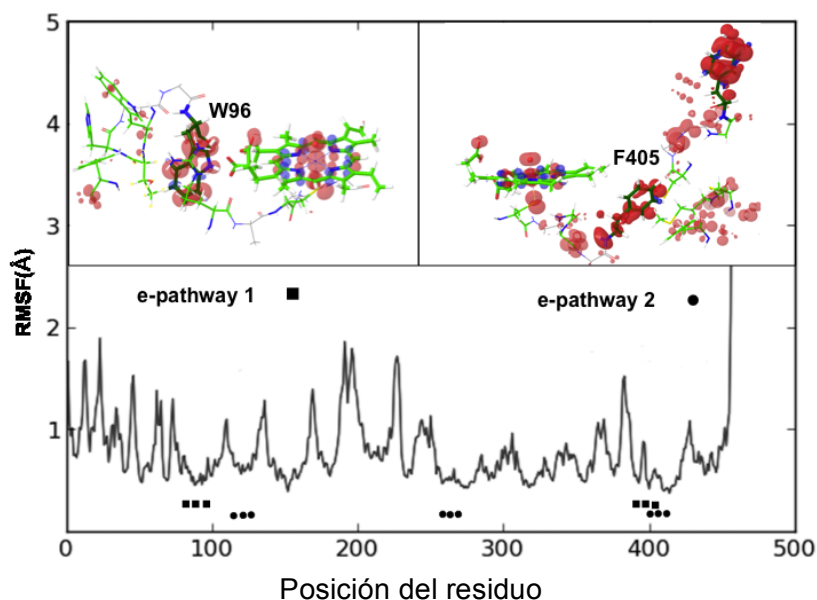


Figura. 4.9. **Las rutas de transferencia electrónica se localizan en sitios rígidos de la proteína.** El panel izquierdo se muestran los residuos que componen a la ruta 1. En el panel derecho se muestra la ruta 2. Panel inferior muestra el RMSF de la simulación y la posición de las rutas. (■) Ruta 1, (●) Ruta 2.

4.4. Selección de residuos de aminoácidos trascendentes para la inactivación suicida.

Los residuos más cercanos al grupo hemo y que localizaron densidad de spin fueron seleccionados para mutarlos por residuos con alto potencial redox, a manera de generar una “*barrera aislante*”.

El residuo W96 mantiene enlaces de hidrógeno con el propionato d del grupo hemo. Este residuo ha sido estudiado en la enzima completa (que contiene el dominio de unión a NAD(P)H) y su mutación por aminoácidos que no generan enlace de hidrógeno (alanina o isoleucina) provocaron la disminución de la velocidad de reducción del NAD(P)⁺⁴². Sin embargo, en el dominio de unión a hemo, cuya ruta de transferencia de electrones es distinta, su rol no ha sido determinado. La mutación propuesta fue W96A (Fig. 4.10.A).

El residuo F405 es el residuo más cercano al grupo vinilo del anillo B del hemo y se sugiere su relación directa a través de interacciones π - π debido a su co-planaridad y a cambios conformacionales concertados, es decir, dependientes uno del otro. Su sustitución por leucina rompería la interacción electrónica con un grupo vinilo de hemo^{96,98} (Fig. 4.10.C).

El residuo M237 se encuentra a 5 Å de uno de los carbonos meso centrales del grupo hemo. Estos carbonos meso han sido caracterizados como centros reactivos, ya que “ligandos suicidas” son capaces de formar aductos covalentes en estas posiciones. La idea principal de mutar la M237 por valina (M237V) radicó en aislar la reactividad de uno de los carbonos meso del grupo hemo, a la vez de conservar el volumen alrededor de esa posiciones y por ende, el plegamiento (Fig. 4.10.C).

El residuo F393 es uno de los moduladores principales del ligando axial C400, ya que interacciona mediante orbitales π con el azufre del tiolato. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida en la enzima completa demostraron que además modula el potencial redox del hemo al regular cambios conformacionales de los grupos vinilo del hemo⁹⁶⁻¹⁰¹. Su sustitución por histidina resultó en un incremento en la V_{max} para la reducción del

NAD(P)⁺. La sustitución de F393A nos permitiría aislar al ligando axial C400 y así aumentar su potencial redox (Fig. 4.10.D).

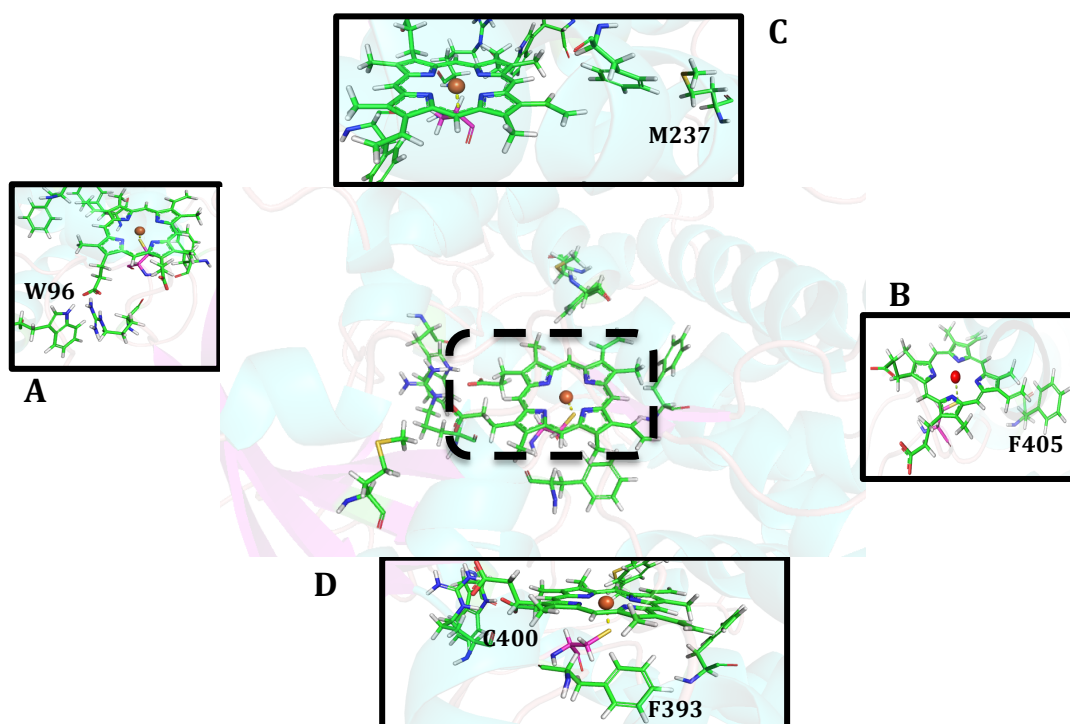


Figura. 4.10. *Esquema general de la selección de los residuos de aminoácidos de 21B3 P450_{BM3} sujetos a mutagénesis sitio-dirigida. (A) W96. Región cercana al propionato d. (B) F405. Este residuo es co-planar al grupo vinilo del anillo c. (C) M237. Este aminoácido se encuentran en posición cercana al carbono meso b del grupo hemo. (D) F393. Este residuos interacciona fuertemente con C400, probablemente modulando el potencial redox del ligando axial.*

4.5. *Transferencia electrónica en la doble mutante W96A/F405L.*

La generación de la doble mutante W96A/F405L, como resultado de los ensayos de actividad catalítica y estabilidad a H₂O₂, generó una brecha entre la teoría y el experimento, ya que se calcularon nuevamente las rutas de transferencia de electrones en la doble mutante.

Para tal efecto se simularon 50 ns de dinámica molecular de la doble mutante W96A/F405L, en las mismas condiciones que la enzima 21B3 parental. Se calcularon los datos de energías totales a una distribución de Maxwell-Boltzmann y se extrajo la conformación más representativa.

En esta conformación se estudiaron las propiedades del CpdI mediante herramientas químico-computacionales QM/MM. Se determinó al estado de multiplicidad de spin doblete (S=1/2) como el más probable (tabla. 4.3), siendo congruentes con los estudios experimentales por EPR^{34,100}. En ese estado se estudiaron las rutas de transferencia electrónicas y los ensayos de competencia. Las energías y densidades de spin se calcularon con el método HF.

Multiplicidad de spin	Energía QM/MM (Kcal/mol)	Diferencia energética
Doblete (1/2)	-2559222.263	0
Cuarteto (3/2)	-2559226.232	3.96
Sexteto (5/2)	-2559231.248	8.98

Tabla. 4.3. Descripción electrónica del CpdI de la doble mutante W96A/F405L. La diferencia energética entre los estados doblete y sexteto es de casi 9 Kcal/mol y entre el doblete y el cuarteto de casi 4 Kcal/mol. De nuevo, la diferencia no es tan grande y puede dar cabida a estados de spin mezclado. Sin embargo, el estado doblete es el único que se observa experimentalmente.

De manera interesante, la ruta 1, que comprendía al W96, sólo muestra densidad de spin en el residuo W90, el más alejado del grupo hemo. Sin embargo, la distancia se modificó, generando que el anillo indólico de W90 migrara ~ 4 Å hacia el hemo, generando una estructura más compacta (Fig. 4.11A).

Para la ruta 2, la mutación de F405 por L genera una reorganización menor, con respecto a la ruta 1. Los residuos M118, M119 y Y160 aparecen como los residuos con mayor contribución a la densidad de spin.

La densidad de spin ya no aparece en C156 o Y115, como en 21B3, sino que se localiza predominantemente en el residuo accesible al solvente Y160. Esto datos sugieren que se bloqueó la ruta de donación de electrones por la remoción de F405. Sin embargo, la presencia de densidad de spin en M118 y M119 sugiere que estos residuos aún funcionan como puentes para conducir al electrón (Fig. 4.11B).

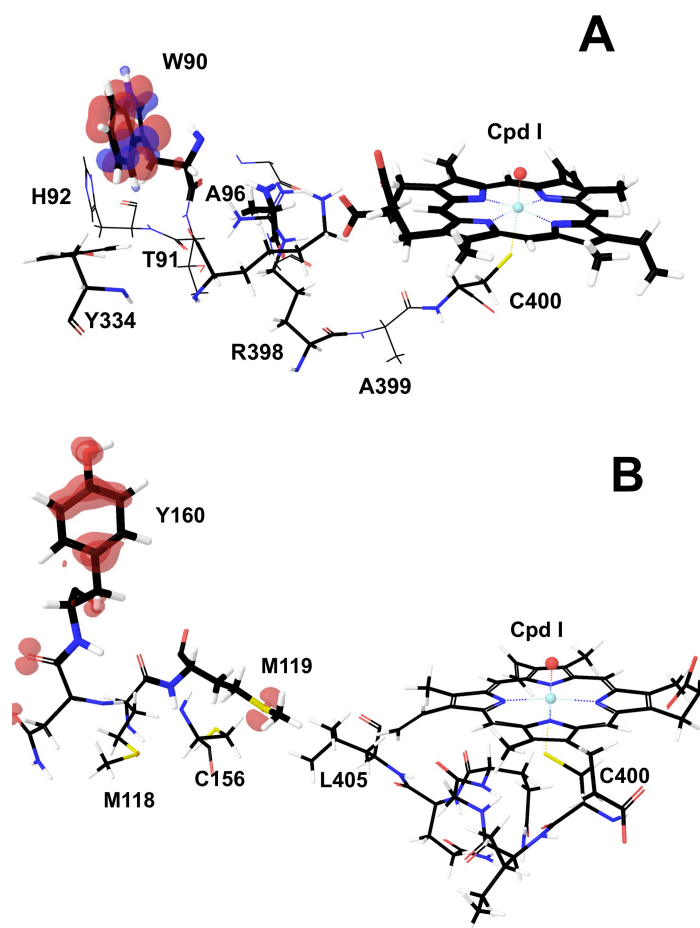


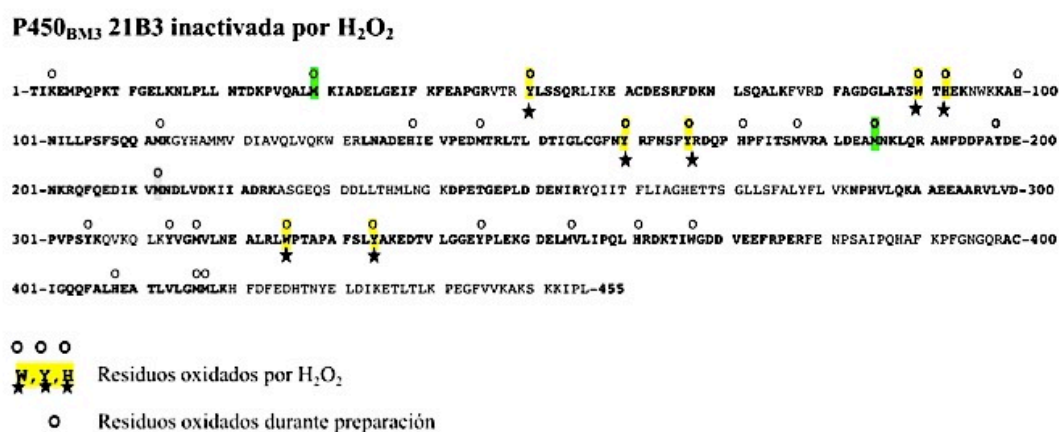
Figura. 4.11. **Rutas de transferencia en la doble mutante W96A/F405L.** A. Ruta 1. La densidad de spin ya no se localiza en toda la ruta, sino en W90. B. Ruta 2. La densidad de spin localiza en M118, M119 y Y160. Las densidades fueron calculadas mediante el método HF en estado doblete ($S=1/2$).

CAPÍTULO 5. DEL EXPERIMENTO DE VUELTA A LA TEORÍA.

5.1. Determinación de residuos de aminoácido oxidados en citocromo 21B3 P450_{BM3} inactivado por H₂O₂.

Una muestra de P450_{BM3} 21B3 (15 µg) completamente inactivada (expuesta a 3mM H₂O₂ durante 20 minutos) en ausencia de sustrato reductor, fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas. Previamente, se digirió la muestra con tripsina y los péptidos resultantes fueron secuenciados. El proceso de secuenciación se realizó mediante la determinación de la masa promedio de cada péptido inactivado con H₂O₂ y se comparó contra el control de la enzima sin H₂O₂, resultando en un coeficiente de oxidación, el cual representa el cambio en la masa del péptido debido a la introducción de oxígeno.

La figura 5.1 muestra los resultados del tratamiento y la tabla anexa compara la abundancia (*m/z*) de cada péptido sin inactivar e inactivado por H₂O₂.



Péptido	Intensidad del péptido sin H ₂ O ₂ (<i>m/z</i>)	Intensidad del peptido inactivado por H ₂ O ₂ (<i>m/z</i>)	Residuos oxidados
DFAGDGLATSwThEK	0.07	1.39	W90, H92
LwPTAPAFSLyAK	0.08	0.74	W325, Y334
LTLDTIGLCGFNyR	0.05	0.25	Y160
FNSFyR	0.01	0.18	Y166
yLSSQR	0.01	0.15	Y51

* La intensidad de *m/z* del péptido oxidado es el cociente de las muestras oxidadas entre las no oxidadas (H₂O₂/no-H₂O₂)

Figura. 5.1. **Determinación de residuos oxidados en una muestra inactivada por H₂O₂**. El panel superior muestra la secuencia de aminoácidos de P450_{BM3} 21B3 incubada 20 minutos en 3 mM de H₂O₂. El panel inferior muestra la abundancia relativa (*m/z*) de los péptidos resultantes de la digestión triptica, así como los residuos determinados como oxidados.

La determinación de residuos oxidados nos permitió identificar a Y51, W90, H92, Y160, Y166, W325 y Y334. Estos residuos si bien pueden ser modificados por vía de CpdI, aún es posible que sean alterados por modificación química al estar en contacto con H₂O₂. Sin embargo, es notable que varios de estos residuos fueron descritos con el algoritmo QM/MM *Et-pathway*.

La ruta 1 que describe la ruta desde W90 hasta CpdI muestra baja densidad de spin en H92, el cual fue efectivamente identificado por LC/MS. De igual manera, en la ruta 1 se encontró que Y334 donó baja densidad de spin, sin embargo, fue identificado como residuo oxidado en masas. Las tirosinas son residuos susceptibles a oxidación química, por lo cual pudiera tratarse de un efecto dual, en el cual la formación de un radical basado en Y pudiera reaccionar superficialmente.

Las rutas 2 y 3 muestran concordancia con los datos experimentales. En las dos rutas el con mayor densidad de spin fue Y160 y W325, respectivamente, y ambos residuos fueron identificados como oxidados por LC/MS. Esta evidencia sugiere que W325 podría reaccionar con CpdI al donar electrones, aunque más lento que W90 y Y160.

Los residuos Y166 y Y51 no fueron descritos por ninguna de las rutas estudiadas a nivel teórico. Se sugiere que estos dos residuos pueden ser modificados por exposición directa al H₂O₂. Y51 se encuentra localizado en el canal principal de acceso de los sustratos, y se ha demostrado que se modifica químicamente (nitrosilación) al ser expuesta a peroxinitrito¹⁰¹. Y166 se encuentra a 18 Å del CpdI, en la superficie accesible al solvente y cerca de la hélice F', la cual tiene el rol de apertura del canal principal de acceso del sustrato.

5.2. Mutagénesis sitio-dirigida en 21B3 P450_{BM3}.

Se generaron varias mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3} con la técnica descrita por Tseng y cols⁵⁸. Esta metodología es una combinación de dos técnicas clásicas de mutagénesis sitio-dirigida: extensión de megaprimers y digestiones con la endonucleasa *DpnI*, derivada del estuche comercial QuikChange (Stratagene). Se usó como templado al plásmido pCWori metilado, el cual codificaba para la enzima 21B3 (enzima parental). Los fragmentos generados para cada variante se muestran en la figura 5.2.

La correcta generación de las mutaciones fue comprobada por la secuenciación de los plásmidos fueron secuenciados en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

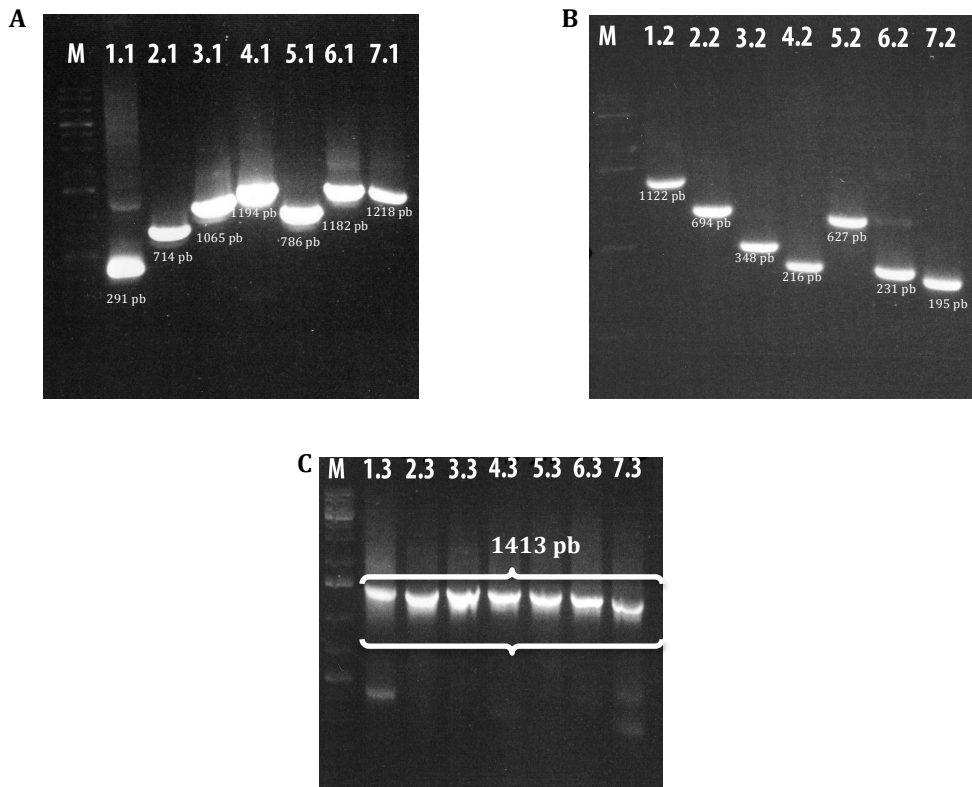


Figura. 5.2. **Fragmentos de DNA usados para la mutagénesis sitio-dirigida de 21B3 P450_{BM3}.** A. Fragmentos de megaprimers región 5' del gen. El carril 1 corresponden a fragmentos 5' de la mutante puntual W96A, respectivamente. El carril 2 corresponde a la mutante M237V. El carril 3 a M354V. El carril 4 a R398I. El carril 5 a F261L. El carril 6 a F393A. El carril 7 a F450L. B. Fragmentos de megaprimers de la región 3' del gen. Se siguió la misma nomenclatura C. Genes completos reconstituidos por la técnica de megaprimers el cual se utilizó como templado para la extensión del plásmido completo. Las mutantes M354V y R398I se usaron como controles de mutagénesis.

5.3. Caracterización cinética y estabilidad de las mutantes puntuales de citocromo P450_{BM3}.

Todas las mutantes puntuales fueron purificadas con éxito (pureza aprox. ~85 %) Se caracterizaron las constantes aparentes k_{cat} y K_M , para el sustrato H_2O_2 en la reacción de oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (DMP) por las mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3}.

La constante de inactivación de las enzimas en la reacción con H_2O_2 en ausencia de sustrato reductor, fue determinada a través del monitoreo de la actividad residual durante la oxidación de cloruro de pinacianol.

Para determinar la velocidad de desaparición del grupo hemo en las mutantes puntuales, se incubaron 50 μ M de enzima con 3, 5 y 10 mM de H_2O_2 .

Se determinó el espectro UV-Vis entre 600-280 nm a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 minutos posteriores a incubar con H_2O_2 .

Se reportan los valores de desaparición de la banda Soret (425 nm) como porcentaje del total inicial. Se ajustaron los datos a un modelo de decaimiento exponencial y los valores reportados en min^{-1} .

En la tabla 5.1 se resumen las constantes de cada variante.

Variante	$k_{cat\ app}$ H_2O_2 (min^{-1})	$K_{M\ app}$ H_2O_2 (mM)	k_{in} (min^{-1})	$t_{1/2}$ actividad (min)	k_{des} (min^{-1})	$t_{1/2\ hemo}$ (min)
21B3	96.0 ± 3.2	8.2 ± 1.2	1.81	0.38	0.07	9.6
W96A	34.9 ± 3.1	18.0 ± 3.7	0.21	3.23	0.02	34.3
F405L	116.5 ± 12.9	14.5 ± 3.9	0.26	2.60	0.05	13.1
F393A	102.9 ± 7.2	7.8 ± 1.3	1.62	0.55	0.07	9.76
M237V	95.3 ± 9.9	9.1 ± 1.3	1.92	0.36	0.05	12.5
W96A/ F405L	115.6 ± 10.9	6.6 ± 1.9	0.007	99*	-	>120 min

Tabla 5.1. *Constantes catalíticas aparentes de las mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3}.*

* Para W96A/F405L a 10 mM de H_2O_2 el tiempo de vida media del hemo fue de 2.57 min y el tiempo de vida media de la enzima fue de 2.30 min.

Las mutantes W96A y F405L fueron más estables a H_2O_2 . Sus constantes de inactivación son menores, en comparación a la enzima parental 21B3. La mutante W96A muestra un aumento en la vida media de la banda Soret, mientras que F405L muestra valores similares a 21B3. Este aumento en la estabilidad global de W96A puede entenderse al comparar la k_{cat} , ya que su disminución de casi 3 veces, en comparación a 21B3, sugiere que la estabilización se debe al bajo recambio: si la enzima reacciona menos con H_2O_2 , genera menos CpdI, entonces compromete menos su persistencia. La K_M evidencia este efecto al aumentar a casi el doble con respecto a la enzima parental. Los ensayos de determinación de residuos oxidables determinaron a W96 como residuo susceptible, por lo cual la sustitución en esta posición por alanina sugiere un papel preponderante, es decir, es una ruta de oxidación más expedita.

Por otro lado la enzima F405L muestra tiempos de vida media de la banda Soret similares a 21B3, pero tiempos de vida media globales casi 3 veces mayores. Su k_{cat} es ligeramente mayor y su constante de disociación es prácticamente el doble de la enzima de partida. Este tipo de estabilización no sacrifica la actividad catalítica, simplemente utiliza flujos electrónicos de manera más eficientes, es decir, que los residuos que comprometen la actividad se encuentran en la ruta de F405 y es de entenderse ya que casi todos los residuos son de bajo potencial redox: Y117, M118, M119, C156, Y160. Además, el encontrar oxidados a Y160 sugiere una participación fuerte de esta ruta, siendo importante para mantener la actividad catalítica sin sacrificar la estabilidad.

Al romper la interacción entre el anillo fenólico de F405 y el grupo vinilo del hemo con una cadena alifática, permitió aislar la entrada de electrones de una región muy susceptible a oxidación.

La mutante M237V no presentó efecto significativo ante H_2O_2 , ya que sus constantes catalíticas fueron muy similares a 21B3. Se sugiere que esta ruta no es determinante para la inactivación o se oxida más lentamente que otra ruta. Por espectrometría de masas, M237 o alguno de los residuos de su ruta de transferencia de electrones no fueron identificados como oxidados.

La mutante M354V no pudo expresarse en nuestro sistema heterólogo. Se ensayaron 3 L de cultivo para esta mutante, bajo las mismas condiciones que las otras mutantes y no se obtuvo enzima. A pesar de comprobar mediante secuenciación la inserción de la

mutación, la enzima no pudo recuperarse en la fracción soluble. Reportes anteriores, donde se sustituyeron, de manera incremental, las metioninas por nor-leucinas en la enzima 21B3 P450_{BM3}, muestran que al disminuir la cantidad de metioninas en la enzima, la expresión y purificación de las variantes se empobrece y dificulta. Por lo tanto, se sugiere que estos aminoácidos juegan un papel importante en la estructura terciaria, estabilizando el plegamiento por la naturaleza hidrófoba y voluminosa del residuo¹⁰⁰.

El efecto de la mutación F393A tampoco impactó significativamente la estabilidad o la actividad peroxigenasa. El efecto de esta mutación se esperaba interesante, ya que es el residuo más cercano al ligando axial C400. Reportes recientes sugieren que el potencial redox de la enzima está modulado principalmente por la interacción entre el anillo y el tiolato. Varias mutantes en la posición 393 resultaron con alteraciones significativas en la velocidad de reducción del Fe^{III} a Fe^{II} en un sistema enzimático completo (dominio hemo oxidasa – NAD(P)H reductasa). Sin embargo, el remplazo de esta posición por alanina no presentó un cambio significativo en la velocidad de reducción del CpdI, lo que evidencia su papel en otro proceso electrónico.

Las mutaciones puntuales W96A y F405L fueron las variantes que mostraron un cambio significativo en cuanto a la vida media del grupo hemo y la vida media de la enzima durante la catálisis.

En un intento por converger los dos fenómenos, se generó la doble mutante W96A/F405L y se caracterizó igual que las mutantes sencillas: estabilidad del grupo hemo en presencia de H₂O₂, permanencia de la actividad residual tras incubación prolongada en H₂O₂, así como las constantes cinéticas ajustadas al modelo de Michaelis-Menten. Los resultados de la caracterización se muestran en la tabla 5.1.

La estabilización impuesta por las dos mutaciones W96A/F405L, es comparable al efecto independiente de cada una de ellas. A 3 y 5 mM de H₂O₂, la doble mutante no perdió actividad significativa ni se destruyó la banda Soret. Sólo a 10 mM de H₂O₂ se encontró un efecto significativo en cuanto a la inactivación (Fig.5.3).

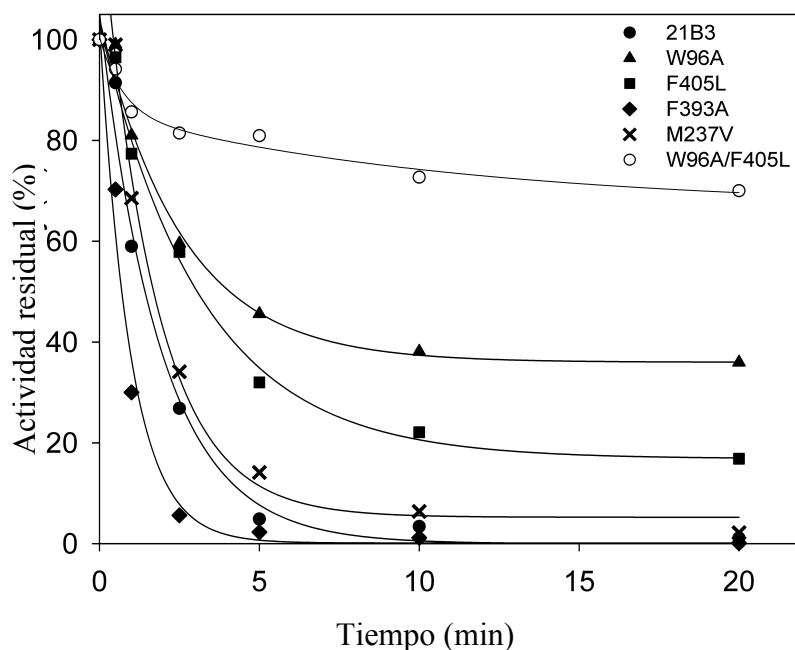


Figura. 5.3. *Cinética de inactivación de las mutantes puntuales de 21B3 P450_{BM3} en la oxidación de cloruro de pinacianol. Las mutantes fueron sometidas a incubaciones periódicas en ausencia de sustrato reductor, es decir, en condiciones que propiciaban la inactivación suicida. Los datos fueron ajustados a un modelo de decaimiento exponencial.*

Se sugiere que en las dos rutas, al reducir la velocidad de transferencia, se opta por otra ruta, la cual no es improductiva. Puede ser el caso de la preferencia de la ruta 3, la cual aún presentaría transferencia desde el W325. Sin embargo, más estudios deben realizarse. Por ejemplo, sería interesante determinar si en la doble mutante se genera el radical libre basado en triptófano reportado por Raner *et. al.*⁴¹, el cual soportaría la hipótesis de la “apertura” de la ruta productiva de W325.

El encontrar residuos oxidados mediante espectrometría de masas y además diferencias significativas en las constantes cinéticas de las mutantes, hicieron que el trabajo teórico se volviera integral; sobretodo por que varios residuos determinados experimentalmente como oxidados, fueron predichos por medio de las herramientas QM/MM.

Existen reportes en los cuales se modificaron los residuos de tirosina cercanas al sitio activo y con bajo potencial redox, empleando espectroscopia UV/Vis acoplada a *stopped-flow* y se determinaron las constantes de velocidad de la formación de CpdII en P450_{cam}^{13,43-45}.

El contar con datos cinéticos más aproximados, se podría esclarecer la naturaleza de la estabilización. Es importante remarcar que la aproximación a través de las constantes *aparentes* permitió reconocer a las variantes más estables. Sin embargo es necesario calcular las constantes reales para determinar la velocidad de aparición del CpdI o del CpdES, así como la velocidad de reducción de los mismos, al aparecer el CpdII. En síntesis, la determinación del comportamiento cinético del CpdI es necesario para entender a profundidad los fenómenos de transferencia electrónica en hemo proteínas.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Conclusiones

La utilización de métodos combinados, químico-computacionales e *in vitro*, nos permitió generar hipótesis sólidas acerca del flujo electrónico durante la inactivación, que a su vez nos permitieron dirigir los experimentos de estabilización de enzimas con actividad peroxidasa.

Las simulaciones QM/MM funcionaron como método de tamizaje, al reducir el número de residuos a mutar en aquellos que deslocalizaran mayor densidad de spin; esto con objeto de lograr la estabilización en pocas rondas de mutagénesis. Identificamos 4 rutas de transferencia al CpdI, y dentro de las mismas identificamos a W96, F405, M237 y F393 como residuos electrónicamente activos. Y aunque los residuos Y51, Y166, Y313 y M316 no pudieron ser descritos como oxidables en nuestros estudios QM/MM, marcan el punto de partida para explorar nuevas posiciones que permitan mejorar la estabilidad a H₂O₂.

Para complementar lo anterior es necesaria la utilización de un sistema *in vitro* para comprobar las hipótesis. Nuestros experimentos en mutantes de P450_{BM3} nos permitieron identificar dos tipos de estabilización: por bajo recambio (W96A) y por bloqueo de flujos improductivos (F405L). Este fenómeno era esperado, ya que las rutas de transferencia de electrones obedecen a eventos simultáneos, limitados por las geometría o cambios conformacionales dentro de la proteína.

Para la mutación W96A el fenómeno se reduce a pérdida de la actividad, es decir, W96 tiene un papel fundamental para reducir al CpdI mediante un ruta que lo conecta con la superficie accesible al solvente. También se sugiere que el bloquear esta ruta permite abrir o re-direccionar el flujo de manera mas ineficiente, reflejándose en bajo recambio. Por otra parte, la mutante F405L es más estable a H₂O₂ y mantiene actividad similar a la mutante 21B3. De tal manera que los grupos vinilos del hemo mantienen interacciones electrónicas con el anillo fenólico de la F405 y aún más importante, en la reducción del CpdI por la transferencia desde algún residuo de aminoácido, no obstante, sin sacrificar el recambio.

La técnica de identificación de residuos oxidables por espectrometría de masas, aunada a la determinación de las constantes catalíticas y de inactivación, nos ayudaron a cimentar el modelo de los flujos simultáneos, ya que los residuos identificados como oxidables pertenecían a rutas distintas de flujo de electrones. Además, las mutantes puntuales describían comportamientos cinéticos diferenciales, con respecto a la enzima parental.

La generación de la doble mutante W96A/F405L, la cual retuvo la actividad sin sacrificar la estabilidad, de hecho, mejorando en casi 260 veces la estabilidad, en comparación con la enzima parental. Esta variante nos permitió entender como las rutas de transferencia de electrones se remodelaron, es decir, al mutar los aminoácidos más proclives a transferir electrones, se estabilizó la actividad peroxidasa al cerrar el flujo improductivo que provenía de ellos.

De las conclusiones anteriores, integramos un modelo de reacción e inactivación en citocromo P450 (Fig. 6.1):

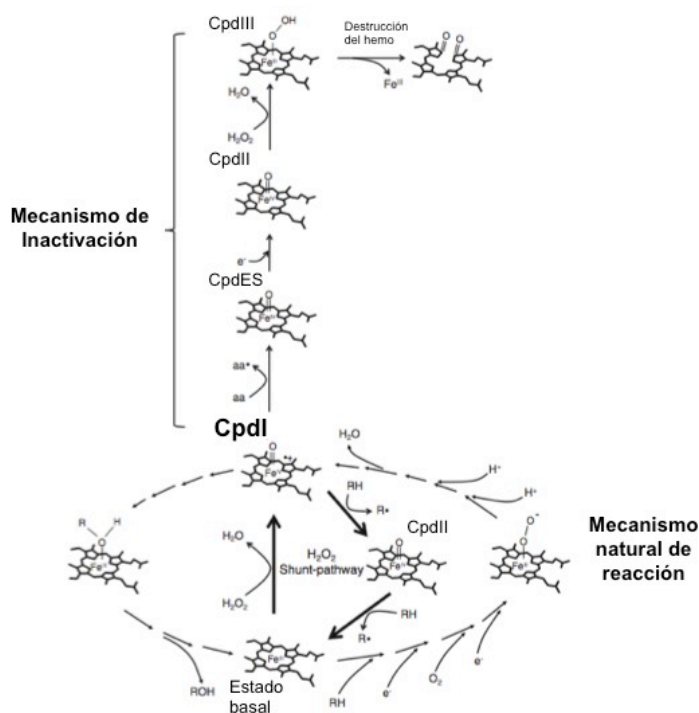


Figura 6.1. **Mecanismo global de las reacciones de CYP P450_{BM3}**. Este modelo enfatiza la naturaleza improductiva del CpdES la cual puede modularse por mutaciones en residuos involucrados en la transferencia, por otros de mayor potencial redox.

Tomada de Vidal-Limón et.al. 2013¹⁰³.

Perspectivas

Validación del método computacional.

La validación del método *QM/MM Et-pathway* debería incluir a más hemo proteínas, así como más de una conformación de las mismas. Esto debido a que el mínimo energético explorado podría no ser el más adecuado, y por ende, suficiente para permitir la transferencia electrónica. Y en este sentido, se vuelve evidente como al variar el ambiente proteico, se puede encontrar donación de spin desde residuos no sospechados, inclusive desde el mismo grupo hemo, como en el caso de los propionatos o en los carbonos de los ligandos axiales.

El utilizar ampliamente este método predictivo, sólo estaría limitado por la disponibilidad de estructuras tridimensionales disponibles y de los recursos de cómputo.

Caracterización cinética de formación del CpdI, CpdES y CpdII en las mutantes puntuales.

Empleando técnicas de espectroscopia UV/Vis de mezclado y lecturas de alta velocidad (*stopped-flow*), se podría caracterizar la formación de los intermediarios catalíticos involucrados en la inactivación. La utilización de constantes aparente no permite separar los fenómenos más tardíos, de los más rápidos, como la formación y decaimiento del CpdI. Usando técnicas de alta velocidad, se podría determinar cual, en las mutantes simples, cual es el residuo que reduce al CpdI a CpdES e inclusive, probar si esta especie CpdES es catalíticamente activa. De esta forma, se podría integrar un mecanismo más apegado a datos cinéticos.

Generación de mutantes múltiples.

Una perspectiva interesante de explorar es la utilización de la mutante W96A/F405L como nuevo punto de partida, ya que recupera las propiedades catalíticas de 21B3 y presentó mayor estabilidad operacional. Explorar las posiciones de la ruta 2 más proclives a oxidarse: M118 y M119, así como la sustitución de la C156.

Sin embargo, la mutante F393 podría ser una mutación interesante de analizar, ya que junto a F405L regulan a los grupos vinilo del hemo. Además, es la posición más cercana a C400, y daría acceso a la regulación del efecto *push-pull*, tan remarcado en hemo-proteínas con tiolato como ligando axial.

7. REFERENCIAS.

- (1) Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. *Plant Cell Reports* **2005**, *24*, 255.
- (2) Millett, F.; Miller, M. A.; Geren, L.; Durham, B. *J. Bioener. Biomem.* **1995**, *27*, 341.
- (3) Alfonso-Prieto, M.; Biarneás, X.; Vidossich, P.; Rovira, C. *J. Am. Chem. Soc* **2009**, *131*, 11751.
- (4) Ator, M. A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1542.
- (5) Conner, K. P.; Woods, C. M.; Atkins, W. M. *ABB* **2011**, *507*, 56.
- (6) Kagan, V. E.; Tyurin, V. A.; Jiang, J.; Tyurina, Y. Y.; Ritov, V. B.; Amoscato, A. A.; Osipov, A. N.; Belikova, N. A.; Kapralov, A. A.; Kini, V.; Vlasova, I. I.; Zhao, Q.; Zou, M.; Di, P.; Svistunenko, D. A.; Kurnikov, I. V.; Borisenko, G. G. *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 223.
- (7) Dolla, A.; Blanchard, L.; Guerlesquin, F.; Bruschi, M. *Biochimie* **1994**, *76*, 471.
- (8) Ayala, M.; Verdin, J.; Vazquez-Duhalt, R. *Biocat and Biotransf* **2007**, *25*, 114
- (9) Davies, M. J.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Rees, M. D. *Antiox & Redox Sign* **2008**, *1*.
- (10) Jones, P.; Dunford, H. B. *J. Inorg. Biochem* **2005**, *99*, 2292.
- (11) Spolitak, T.; Dawson, J. H.; Ballou, D. P. *J. Inorg. Biochem* **2006**, *100*, 2034.
- (12) Chance, M.; Powers, L.; Poulos, T.; Chance, B. *Biochem* **1986**, *25*, 1266.
- (13) Spolitak, T.; Dawson, J.; Ballou, D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 599.
- (14) Valderrama, B.; Vazquez-Duhalt, R. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2005**, *35*, 41.
- (15) Valderrama, B.; Ayala, M.; Vazquez-Duhalt, R. *Chem & Biol* **2002**, *9*, 555.
- (16) Lardinois, O.; Mestdagh, M.; Rouxhet, P. *BBA* **1996**, *1295*, 222.
- (17) Watanabe, L.; de Moura, P. R.; Bleicher, L.; Nascimento, A. S.; Zamorano, L. S.; Calvete, J. J.; Sanz, L.; Pérez, A.; Bursakov, S.; Roig, M. G.; Shnyrov, V. L.; Polikarpov, I. *J. Struc. Biol.* **2002**, *169*, 226.
- (18) Jakopitsch, C.; Rüker, F.; Regelsberger, G.; Dockal, M.; Peschek, G.; Obinger, C. *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1087.
- (19) García-Arellano. 2010. On Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Ayala M, & Torres, E. Eds. Springer. Cap. 13. pp. 353.
- (20) Page, C. C.; Moser, C. C.; Chen, X.; Dutton, P. L. *Nature* **1999**, *402*, 47.
- (21) Moser, C. C.; Chobot, S. E.; Page, C. C.; Dutton, P. L. (*BBA*) - *Bioenergetics*, **2008**. *1777*, 1032.

- (22) Moser, C. C.; Keske, J. M.; Warncke, K.; Farid, R. S.; Dutton, P. L. *Nature* **1992**, *355*, 796.
- (23) Pogni, R.; Baratto, M. C.; Giansanti, S.; Teutloff, C.; Verdin, J.; Valderrama, B.; Lenzian, F.; Lubitz, W.; Vazquez-Duhalt, R.; Basosi, R. *Biochem* **2005**, *44*, 4267.
- (24) Cherry, J. R.; Lamsa, M. H.; Schneider, P.; Vind, J.; Svendsen, A.; Jones, A.; Pedersen, A. H. *Nat. Biotech.* **1999**, *17*, 379.
- (25) Valderrama, B.; Garcia-Arellano, H.; Giansanti, S.; Baratto, M. C.; Pogni, R.; Vazquez-Duhalt, R. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1233.
- (26) Guallar, V. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13460.
- (27) Guallar, V.; Olsen, B. *J. Inorg. Biochem* **2006**, *100*, 755.
- (28) Guallar, V.; Wallrapp, F. *J. Roy. Soc. Inter.* **2008**, *5*, 233.
- (29) Cirino, P. C.; Arnold, F. H. *Ang. Chemie. Inter. Ed.* **2003**, *42*, 3299.
- (30) Matsunaga, I.; Ueda, A.; Fujiwara, N.; Sumimoto, T.; Ichihara, K. *Lipids* **1999**, *34*, 841
- (31) Matsunaga, I.; Yokotani, N.; Gotoh, O.; Kusunose, E.; Yamada, M.; Ichihara, K. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23592.
- (32) Cirino, P. C.; Arnold, F. H. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 932.
- (33) Rutter, R.; Hager, L. P.; Dhonau, H.; Hendrich, M.; Valentine, M.; Debrunner, P. *Biochem.* **1984**, *23*, 6809.
- (34) Rittle, J.; Green, M. T. *Science* **2010**, *330*, 933.
- (35) Newcomb, M.; Zhang, R.; Chandrasena, R. E. P.; Halgrimson, J. A.; Horner, J. H.; Makris, T. M.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc* **2006**, *128*, 4580.
- (36) Schünemann, V.; Trautwein, A.; Jung, C.; Turner, J. *Hyper. Interac.* **2002**, *141-142*, 279.
- (37) Guengerich, F. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611.
- (38) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, *287*, 1615.
- (39) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253.
- (40) Sligar, S. G. *Science* **2010**, *330*, 924.

- (41) Luthra, A.; Denisov, I. G.; Sligar, S. G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 26.
- (42) Raner, G. M.; Thompson, J. I.; Haddy, A.; Tangham, V.; Bynum, N.; Ramachandra Reddy, G.; Ballou, D. P.; Dawson, J. H. *J. Inorg. Biochem* **2006**, *100*, 2045.
- (43) Spolitak, T.; Dawson, J. H.; Ballou, D. P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20300.
- (44) Spolitak, T.; Funhoff, E. G.; Ballou, D. P. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *493*, 184.
- (45) Schünemann, V.; Jung, C.; Lenzian, F.; Barra, A. L.; Teschner, T.; Trautwein, A. *Hyper. Interac.* **2004**, *156-157*, 247.
- (46) van der Kamp, M. W.; Mulholland, A. J. *Nat Prod Repo* **2008**, *25*, 1001.
- (47) Harvey, J. N.; Bathelt, C. M.; Mulholland, A. J. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1352.
- (48) Wallrapp, F.; Masone, D.; Guallar, V. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12989.
- (49) Guallar, V.; Wallrapp, F. H. *Biophys. Chem.* **2010**, *149*, 1.
- (50) Guo, M.; Bhaskar, B.; Li, H.; Barrows, T. P.; Poulos, T. L. *PNAS* **2004**, *101*, 5940.
- (51) Lucas, M. F.; Rousseau, D. L.; Guallar, V. *BBA - Bioenergetics* **2011**, *1807*, 1305.
- (52) Jung, C. *BBA - Proteins & Proteomics* **2011**, *1814*, 46.
- (53) Altun, A.; Shaik, S.; Thiel, W. *J. Comp. Chem.* **2006**, *27*, 1324.
- (54) Wadt, W. R.; Hay, P. J. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284.
- (55) Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270.
- (56) Dunning, J., H. T.; Hay, P. J. *Mod Theo Chem*; Plenum: New York, 1976; Vol. 3.
- (57) Warshel, A.; Levitt, M. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227.
- (58) Tseng, W.C.; Lin, J.W.; Wei, T.Y.; Fang, T.Y. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 376.
- (59) Conesa, A.; van de Velde, F.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Punt, P. J. *J. Biol. Chem* **2001**, *276*, 17635.

- (60) Manoj, K. M.; Hager, L. P. *Biochem* **2008**, *47*, 2997.
- (61) Blanke, S. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem* **1988**, *263*, 18739.
- (62) Buchhaupt, M.; Ehrich, K.; Hüttmann, S.; Guder, J.; Schrader, J. *Biotechnol. Lett* **2011**, *33*, 2225.
- (63) Yi, X.; Mroczko, M.; Manoj, K. M.; Wang, X.; Hager, L. P. *PNAS* **1999**, *96*, 12412.
- (64) Grey, C. E.; Hedström, M.; Adlercreutz, P. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1055.
- (65) Hager, L. P. *J. Biol. Chem* **2010**, *285*, 14852.
- (66) Ayala, M.; Batista, C.; Vazquez-Duhalt, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 63.
- (67) Rutter, R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem* **1982**, *257*, 7958.
- (68) Sono, M.; Eble, K. S.; Dawson, J. H.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem* **1985**, *260*, 15530.
- (69) Stone, K. L.; Behan, R. K.; Green, M. T. *PNAS* **2006**, *103*, 12307.
- (70) Palcic, M. M.; Rutter, R.; Araiso, T.; Hager, L. P.; Dunford, H. B. *BBRC* **1980**, *94*, 1123.
- (71) Águila, S.; Vidal-Limón, A. M.; Alderete, J. B.; Sosa-Torres, M.; Vázquez-Duhalt, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85–86*, 187.
- (72) Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 527.
- (73) Busi, E.; Howes, B. D.; Pogni, R.; Basosi, R.; Tinoco, R.; Vazquez-Duhalt, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 39.
- (74) Diederix, R. E. M.; Fittipaldi, M.; Worrall, J. A. R.; Huber, M.; Ubbink, M.; Canters, G. W. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7249.
- (75) Kagan, V. E.; Tyurin, V. A.; Jiang, J.; Tyurina, Y. Y.; Ritov, V. B.; Amoscato, A. A.; Osipov, A. N.; Belikova, N. A.; Kapralov, A. A.; Kini, V.; Vlasova, I. I.; Zhao, Q.; Zou, M.; Di, P.; Svistunenko, D. A.; Kurnikov, I. V.; Borisenko, G. G. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 223.
- (76) Belikova, N. A.; Vladimirov, Y. A.; Osipov, A. N.; Kapralov, A. A.; Tyurin, V. A.; Potapovich, M. V.; Basova, L. V.; Peterson, J.; Kurnikov, I. V.; Kagan, V. E. *Biochem.* **2006**, *45*, 4998.

- (77) Basova, L. V.; Kurnikov, I. V.; Wang, L.; Ritov, V. B.; Belikova, N. A.; Vlasova, I. I.; Pacheco, A. A.; Winnica, D. E.; Peterson, J.; Bayir, H. I.; Waldeck, D. H.; Kagan, V. E. *Biochem.* **2007**, *46*, 3423.
- (78) Belikova, N. A.; Tyurina, Y. Y.; Borisenko, G.; Tyurin, V.; Samhan Arias, A. K.; Yanamala, N.; Furtmuüller, P. G.; Klein-Seetharaman, J.; Obinger, C.; Kagan, V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11288.
- (79) García-Heredia, J. M.; Díaz-Moreno, I.; Nieto, P. M.; Orzáez, M.; Kocanis, S.; Teixeira, M.; Pérez-Payá, E.; Díaz-Quintana, A.; De la Rosa, M. A. *BBA - Bioenergetics* **2010**, *1797*, 981.
- (80) Batthyány, C.; Souza, J. M.; Durán, R.; Cassina, A.; Cerveñansky, C.; Radi, R. *Biochem.* **2005**, *44*, 8038.
- (81) Abriata, L. A.; Cassina, A.; Tórtora, V.; Marín, M.; Souza, J. M.; Castro, L.; Vila, A. J.; Radi, R. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17.
- (82) Nakagawa, H.; Komai, N.; Takusagawa, M.; Miura, Y.; Toda, T.; Miyata, N.; Ozawa, T.; Ikota, N. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 15.
- (83) Davies, M. J. (*BBA*) - *General Subjects* **1988**, *964*, 28.
- (84) Barr, D. P.; Martin, M. V.; Guengerich, F. P.; Mason, R. P. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 318.
- (85) Bathelt, C. M.; Zurek, J.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12900.
- (86) Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 21.
- (87) Howes, B. D.; Schi⁻dt, C. B.; Welinder, K. G.; Marzocchi, M. P.; Ma, J.-G.; Zhang, J.; Shelnut, J. A.; Smulevich, G. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 478.
- (88) Chen, H.; Song, J.; Lai, W.; Wu, W.; Shaik, S. *J. Chem. Theo. Compu.* **2010**, *6*, 940.
- (89) Hirao, H.; Thiel, W.; Shaik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13007.
- (90) Cho, K.-B.; Hirao, H.; Chen, H.; Carvajal, M. A.; Cohen, S.; Derat, E.; Thiel, W.; Shaik, S. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 13128.
- (91) Ivancich, A.; Jakopitsch, C.; Auer, M.; Un, S.; Obinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14093.

- (92) Chen, H.; Hirao, H.; Derat, E.; Schlichting, I.; Shaik, S. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9490.
- (93) Lonsdale, R., Oláh, J., Mulholland, A. J., and Harvey, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15464-15474.
- (94) Fishelovitch, D.; Shaik, S.; Wolfson, H. J.; Nussinov, R. *J. Phys Chem B* **2009**, *113*, 13018.
- (95) Denisov, I. G.; Shih, A. Y.; Sligar, S. G. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *108*, 150.
- (96) Chen, Z.; Ost, T. W. B.; Schelvis, J. P. M. *Biochem.* **2004**, *43*, 1798.
- (97) Ost, T. W. B.; Miles, C. S.; Munro, A. W.; Murdoch, J.; Reid, G. A.; Chapman, S. K. *Biochem.* **2001**, *40*, 13421.
- (98) Girvan, H. M.; Levy, C. W.; Williams, P.; Fisher, K.; Cheesman, M. R.; Rigby, S. E.; Leys, D.; Munro, A. W. *Biochem J.* **2010**, *427*, 455.
- (99) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253.
- (100) Cirino, P., Tesis Doctoral. California Institute of Technology, **2004**.
- (101) Daiber, A.; Herold, S.; Schöneich, C.; Namgaladze, D.; Peterson, J. A.; Ullrich, V. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6729.
- (102) Hrycay, E. G.; Bandiera, S. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *522*, 71.
- (103) Vidal-Limón, A.; Águila, S.; Ayala, M.; Batista, C. V.; Vazquez-Duhalt, R. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *122*, 18.

8. ANEXOS



Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450_{BM3} by rational analysis of intramolecular electron transfer

Abraham Vidal-Limón^a, Sergio Águila^b, Marcela Ayala^a, Cesar V. Batista^a, Rafael Vazquez-Duhalt^{a,b,*}

^a Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico

^b Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Ensenada, Baja California, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2012

Received in revised form 15 January 2013

Accepted 16 January 2013

Available online 26 January 2013

Keywords:

Electron-transfer
Molecular mechanics
Peroxidase
P450
QM/MM
Stabilization

ABSTRACT

Combined quantum mechanical and molecular mechanical (QM/MM) calculations were used to explore the electron pathway involved in the suicide inactivation of cytochrome P450_{BM3} from *Bacillus megaterium*. The suicide inactivation is a common phenomenon observed for heme peroxidases, in which the enzyme is inactivated as a result of self-oxidation mediated by highly oxidizing enzyme intermediates formed during the catalytic cycle. The selected model was a mutant comprising only the heme domain (CYP_{BM3} 21B3) that had been previously evolved to efficiently catalyze hydroxylation reactions with hydrogen peroxide (H₂O₂) as electron acceptor. An extensive mapping of residues involved in electron transfer routes was obtained from density functional calculations on activated heme (i.e. Compound I) and selected amino acid residues. Identification of oxidizable residues (electron donors) was performed by selectively activating/deactivating different quantum regions. This method allowed a rational identification of key oxidizable targets in order to replace them for less oxidizable residues by site-directed mutagenesis. The residues W96 and F405 were consistently predicted by the QM/MM electron pathway to hold high spin density; single and double mutants of P450_{BM3} on these positions (W96A, F405L, W96A/F405L) resulted in a more stable variants in the presence of hydrogen peroxide, displaying a similar reaction rate than P450_{BM3} 21B3. Furthermore, mass spectrometry confirmed these oxidation sites and corroborated the possible routes described by QM/MM electron transfer (ET) pathways.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The cytochromes P450 (CYPs) are heme-thiolate oxygenases that catalyze a variety of reactions, such as hydroxylation of long-chain amides and alcohols, and epoxidation of long-chain unsaturated fatty acids [1–7]. The conventional CYP catalytic cycle consumes NAD(P)H to activate dioxygen (O₂), however CYPs are also capable of utilizing peroxides as surrogate sources of oxygen through a so called “peroxide shunt pathway” (Fig. 1) [1,8–10]. This shunt pathway is similar to peroxygenase activity present in some peroxidases in which hydrogen peroxide is used as both electron acceptor and oxygen donor [11–13]. Two CYPs are naturally H₂O₂-utilizing peroxygenases: BSβ from *Bacillus subtilis* (CYP152A1) and SPα from *Sphingomonas paucimobilis* (CYP152B1). These two enzymes are able to catalyze α-hydroxylation of fatty acids at high catalytic rates (300 and 838 min⁻¹, respectively) and they are highly stereoselective [14,15]. On the other hand, artificial CYP peroxygenases have also been generated. The heme domain of cytochrome P450_{BM3} (CYP102) from *Bacillus megaterium* has been engineered to a self-sufficient peroxygenase catalyst, through direct evolution methods [1,16]. This new variant (21B3) is

~20-fold more active than the parental enzyme in the presence of 10 mM H₂O₂ and using 12-*p*-nitrophenoxycarboxylic acid (12-*p*NCA) as substrate; it is also a versatile catalyst with a broad range of substrates as long-chain hydroxy acids, pesticides, substituted phenols, steroids and alkenes [9,17–19]. However, the 21B3 variant is still susceptible to H₂O₂-mediated inactivation as other peroxidases.

The H₂O₂-mediated inactivation in peroxidases is a mechanism-based process: once activated by H₂O₂, highly oxidizing intermediates are generated, two and one electron above the resting state, that must be reduced in order to return to the ground state (Fig. 1). These oxidizing intermediates, Compound I (oxoiron(IV)porphyrin-based π-cation radical) and Compound II (oxoiron(IV)porphyrin), have a sufficiently high redox potential (from 0.88 to 1.3 V) to oxidize heme-nearby and even distant amino acid residues, in the absence of an external reducing agent (i.e. substrate) [20]. Compound III (peroxoiron(III)porphyrin), a non-catalytic intermediate, has also been related to the self-inactivation of heme peroxidases and heme-proteins [20–22], generating the disruption of heme group and/or promoting the formation of protein-based free radicals (Fig. 1) [23–29]. The stabilization of heme peroxidases has been addressed from different approaches including directed evolution and site-directed mutagenesis [18,30,31]. In a previous work, a rational approach was followed based on the redox potential properties of residues in the vicinity of the heme group of iso-1-cytochrome c. By using site-directed mutagenesis and with the aim to electronically

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico. Tel.: +52 777 329 1655; fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: vazqduh@ibt.unam.mx (R. Vazquez-Duhalt).

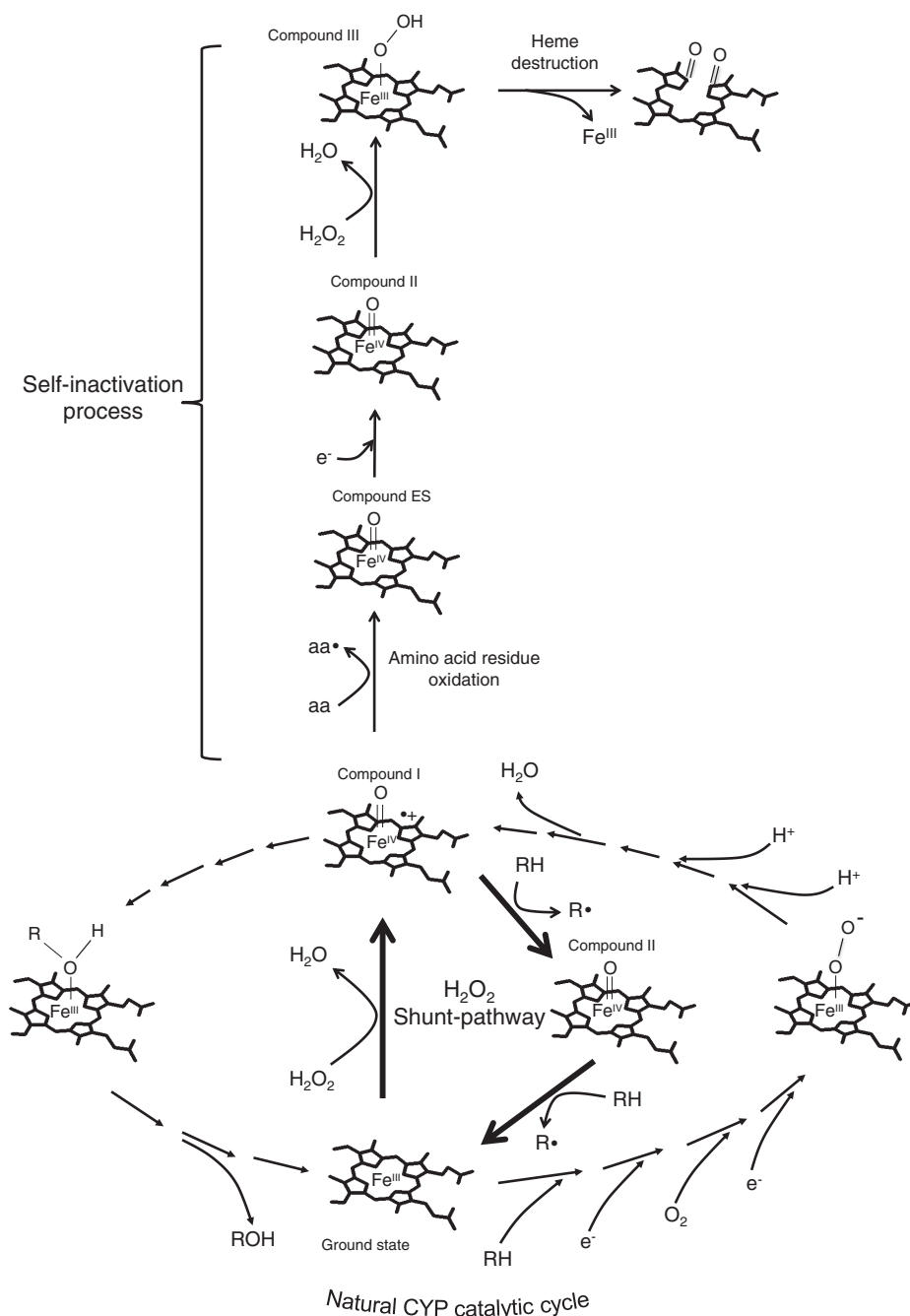


Fig. 1. Scheme of the catalytic cycles of CYP and peroxidase that are combined through the “peroxide shunt pathway”. The peroxidase self-inactivation intermediates, including the resting state and compounds I, II, III and ES are also shown.

isolate the active site, more stable variants were obtained, and our knowledge on the molecular events involved in the H_2O_2 -mediated inactivation was expanded. Following this strategy, the half-life time of the heme (Soret absorbance band) and catalytic activity was increased at least one order of magnitude [32]. Recently, computer simulation strategies, such as the hybrid quantum mechanics/molecular mechanics calculations (QM/MM), have been successful describing intra- and inter-molecular electron transfer pathways in oxidoreductases [33–36]. The aim of this work was to identify through QM/MM calculations the key residues around the second sphere of coordination of the heme iron of CYP_{BM3} 21B3 variant and selectively mutate them, in order to reduce electron delocalization from oxidizable residues and generate more stable mutants against H_2O_2 -mediated inactivation.

2. Experimental and theoretical methods

2.1. Chemicals

Hydrogen peroxide (H_2O_2), 2,6-dimethoxy-phenol and pinacyanol chloride were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO).

2.2. Site-directed mutagenesis

The mutagenic procedure was reproduced from [37] where two methods, Quickchange (stratagene) and megaprimer extension, were combined. This method exploits the advantage of parental vector digestion by DpnI restriction enzyme and high mutagenic-efficiency of

megaprimer extension. Two complementary mutagenic oligonucleotides for each selected position were designed. Two external oligonucleotides for megaprimer amplification were also synthesized:

W96A fwd, 5'-TGGACGCATGAAAAAATGCCAAAAAGCGC-3', 31 mer;
 W96A rev, 5'-GCGTTTTTTGGCATTTTTTTCATGCGTCCA-3', 31 mer;
 M237V fwd, 5'-ATTAACGCACGTCTAAACGGAAAAGATCC-3', 30 mer;
 M237V rev, 5'-GGATCTTTCCGTTTAGCACGTGCGTTAAT-3', 30 mer;
 F393A fwd, 5'-TAAACCGGCTGAAACGGTCAGCGTG-3', 26 mer;
 F393A rev, 5'-CACGCTGACCGTTCCAGCCGGTTTA-3', 26 mer.
 F405L fwd, 5'-GGTCAGCAGCTAGTCTTCATGAAGC-3', 26 mer;
 F405L rev, 5'-GCTTCATGAAGAGCTAGCTGCTGACC-3', 26 mer;
 pCWori-fwd, 5'-GAAACAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGT-3', 29 mer;
 pCWori-rev, 5'-GCGTATCACGAGGCCCTTCGTTCAAGC-3', 30 mer.

All mutant plasmids were confirmed by automated DNA sequencing at the DNA core facility of Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.3. Enzyme expression and purification

CYP_{BM3} 21B3, single and double mutants were expressed in *Escherichia coli* DH5 using the β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible pCWori vector. Bacterial cell cultures were grown for production, as previously described [1] and the 6xHis-containing variants were purified by Ni-NTA affinity chromatography using a 5 mL HisTrap HP column (GE Healthcare Bioscience). The red-colored fractions were collected, concentrated by ultrafiltration and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50 mM Tris-HCl buffer/10% glycerol, pH 8. CYP_{BM3} variants' concentration was determined by the CO binding assay [38], and enzyme purity was assayed by SDS-PAGE electrophoresis.

2.4. Peroxidase activity and H₂O₂-stability assays

For peroxidase activity, 4 μM enzyme preparation was assayed on the oxidation of 2,6-dimethoxyphenol ($\epsilon_{467} = 49,60\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) using H₂O₂ as electron acceptor. The peroxidase activity was determined varying the concentration of H₂O₂ and 2,6-dimethoxyphenol (both from 1 to 50 mM) until catalytic saturation was achieved. Catalytic constant values were obtained using the EnzFitter software (Biosoft, Cambridge, UK) following a Michaelis-Menten model kinetics. Peroxide-dependent inactivation rate constants were estimated incubating each mutant (4 μM) with 3 or 10 mM H₂O₂, and both the residual heme content and the residual peroxidase activity were monitored: through the disappearance of the Soret absorbance band (425 nm) and the latter by pinacyanol chloride oxidation ($\epsilon_{603} = 82,35\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). All reactions were carried out in 50 mM Tris/HCl buffer pH 8 at 298 K and monitored in a Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer. All reactions were performed in three independent replicates and the half-life time ($t_{1/2}$) was estimated from a first-order decay equation ($a_t = a_0 e^{-kt}$).

2.5. Mass spectrometry analysis

A sample of fully inactivated CYP_{BM3} 21B3 (15 μg) was reduced with dithiothreitol (DTT), derivatized with iodoacetamide, and digested in gel with trypsin (Promega) under N₂-saturated atmosphere. The peptide solution was applied into a liquid chromatography-mass spectrometry system (LC-MS) comprising a micro-flux liquid chromatograph Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) and a mass spectrometer LTQ-OrbitrapVelos (Promega) with nanospray ionization system (ESI). The fluid flow speed was maintained at 500 nL/min (flow split 1/20). Peptide mixture was separated in a PicoFrit Proteoep 2 column (New Objective Inc., Woburn, MA). Collision induced dissociation (CID) and high energy collision dissociation (HCD) experiments were performed

and the resulted spectra were analyzed with Sequest module of Protein Discovery v1.3 program.

2.6. Molecular modeling techniques

The starting protein coordinates were taken from the X-ray structure of the heme domain of a variant of *B. megaterium* cytochrome CYP_{BM3} (PDB code: 3QJ8), because the structure of the 21B3 variant has not been resolved yet and the latter mutant is a close relative. The extra 9 mutations contained in 3QJ8 were reverted previously to conformational optimization. The protein was prepared with the Protein Preparation Wizard inside Maestro 9.2 package and included in a 15 Å water box (8373 SPC type water molecules). The simulated annealing calculations and data analysis were carried out using the Desmond and Maestro programs respectively (Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 3.0, Schrödinger, NY).

OPLS_2005 force field was used for all simulations. Cubic periodic boundary conditions were used ($93 \times 93 \times 93\text{ \AA}^3$) with an NpT ensemble at constant pressure (1 atm). Temperature was applied by weak coupling to an external bath temperature coupling relaxation time. All short-range interactions were computed using a 9 Å cutoff, meanwhile for long-range interactions (electrostatic and van der Waals) a smooth particle mesh Ewald of 1×10^{-9} of tolerance was applied. The simulated annealing was carried out in 6 steps. Full-system was heated at 10 K for 30 ps, 100 K for 100 ps, 300 K for 200 ps, 400 K for 300 ps, 400 K for 500 ps and finally cooled to 300 K for 1000 ps. A lineal interpolation between two adjacent time points step was employed. After step 6, a production of 10 ns was achieved with an integration time of 1 fs. All analysis was performed using trajectory coordinates and energies written to disk every 1.0 ps.

2.7. QM/MM ET pathways

Three different structures from MD production were selected according to its frequency in a Maxwell-Boltzmann energy distribution. All the structures were analyzed for QM/MM ET pathway, as described by Guallar et al. [33–36,39,40]. All QM/MM calculations were performed with the QSite module of Schrödinger Suite 2011. QM region was studied at b3lyp/lacvp* level of theory, while the rest of the protein, MM region was treated with an empirical potential (OPLS_2005 force field) [41,42]. The lacvp* basis set is a combination of the 6–31G* basis set and lanl2dz effective core basis set. Specifically, the atoms H to Ar are described with the 6–31G* basis set, while heavier atoms as Fe, are modeled using the lanl2dz basis set (Dunning/Huzinaga valence double- ζ , Los Alamos ECP plus DZ on Na-La, Hf-Bi) [43–45]. An 8 Å layer of water molecules was incorporated to the protein surface and the link-atom (H-cap) approach was used for specifying the covalent QM/MM boundary region. First, QM/MM calculations on Cpd I (restricted region comprising 144 atoms) employed geometrical optimization at density functional theory (DFT) level and Hartree-Fock (HF) energy corrections. Electron pathway description included several QM regions taken from previously optimized structures and comprised ~150–300 atoms depending on the route. For the competition calculations, only the current residues of each pathway were considered into QM region, while Cpd I was excluded and its MM charges were adjusted to reproduce the electrostatic potential (ESP).

3. Results

In the classic catalytic cycle of peroxidases, the first and most oxidizing intermediate (E^{\bullet} from 740 to 1370 mV) [46] is the named Compound I (Cpd I, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ –porphyrin $\cdot+$). In the absence of substrate, Cpd I may abstract electrons from intra-molecular sources as amino acid residues or the prosthetic heme group. Since Cpd I has been clearly recognized as the oxidizing intermediate responsible for a plethora of reactions in CYP450s [47,48] the analysis of the oxidizing power of this

intermediate during suicide inactivation becomes relevant. The electron transfer routes during inactivation have been described to be simultaneous and thus competitive [20], following as a rule that protein based free radicals travel inside the protein matrix until stabilization at the lowest redox potential position available [49]. Several amino acid residues are prone to be oxidized by Cpd I, thus competition between different routes makes difficult to measure their contribution to the whole inactivation process. Our main goal was to describe different ET pathways during intra-molecular reduction of Cpd I, in order to selectively mutate spin containing residues around the second sphere of coordination of iron, and finally determinate their role in the self inactivation process.

3.1. Molecular modeling and selection of enzyme conformations for electron pathway studies

Molecular dynamics simulations were employed in order to explore different protein conformations, since the electron transfer is highly dependent of geometry between acceptor and donor (distance and local environment imposed by neighbor residues). Three conformations were ranked and selected accordingly to the Maxwell–Boltzmann energy distribution: the first structure represents the most frequent conformation, the second structure was selected from the moderately frequent conformation and the third structure was the less frequent conformation (Fig. 2, conformations 1, 2 and 3, respectively in Table 1). Simulations have showed that transient water molecules were able to generate water chains from T216 toward heme iron [50]. In this context, our simulation also showed that multiple water molecules were able to form an aqueduct, as previously reported by Oprea et. al. [51] and Fishelovitch et. al. [52] for several CYP enzymes.

3.2. Prediction of intramolecular ET pathways in CYP_{BM3} 21B3

QM/MM DFT ab initio calculations were performed using the entire protein. Each MM-conformation was selected for modeling of Cpd I through energy minimization using DFT. First, Cpd I was modeled and optimized using a constrained QM region, involving Fe=O and heme group and residues from R398 to G402 (i.e. 144 atom), while the rest of enzyme and water molecules was treated in MM region [53]. R398–G402 were included in the QM region because

they share hydrogen bond between C400 thiolate and G402 backbone, and also for the electrostatic coupling between propionate groups and R398 positively charged guanidine side chain [54,55]. As previously described [53], Cpd I can be effectively described by single modeling of the Fe=O moiety and charge adjustment of the QM region. The authors also considered an energy difference of 1.0 kcal/mol between the quartet ($S=3/2$) and doublet spin ($S=1/2$) states. Thus, we modeled both states using unrestricted open-shell, plus $S=5/2$, because various theoretical studies on CYP isoforms have identified the sextet as ground state [56,57]. The QM energy allowed the identification of $S=3/2$ (i.e. quartet) as the most frequent multiplicity state (3.4 kcal/mol lower than $S=1/2$). Because a larger QM region than that from Lonsdale et al. [53] was employed, the difference in potential energy was expected.

Second, single point energy calculations on Cpd I optimized structures were performed in doublet spin state for all three conformations. This is because Fe=O moiety is excluded from QM region and in the absence of one electron, the singlet multiplicity or closed shell system of protein atoms (C, N, S, O, H) turns into doublet or open shell system. Starting from C400 (coordinating the heme group) and moving towards the protein surface, several residues were sequentially included in the QM region. Once a residue was found concentrating spin density, it was considered a member of the ET pathway. This procedure was iterated in order to explore spin delocalization on the neighboring residues, and thus the direct ET pathway that connects a donor residue (solvent exposed residue) and the acceptor (Cpd I) was found.

After ET pathway determination, a third round of single-point calculations was performed on each ET pathway in order to identify the highest spin-density residues. This new set of calculations, including all previously identified residues, except Cpd I, allowed us to understand the electron donation competition during Cpd I reduction. Single point calculations were carried out in a doublet spin state in the absence of one electron or plus one positive charge. MM charges of Cpd I were derived from electrostatic potential (ESP). The spin density per residue was estimated from Mülliken population analysis (Table 1). With this electron-deficient approximation, it is possible to identify and select targets prone to oxidation. As observed in Table 1, the different geometrical conformations display different spin density distribution, which highlights the importance of performing these calculations with an energetically favored configuration. In our case, the spin density of the most populated species according to the Maxwell–Boltzmann energy

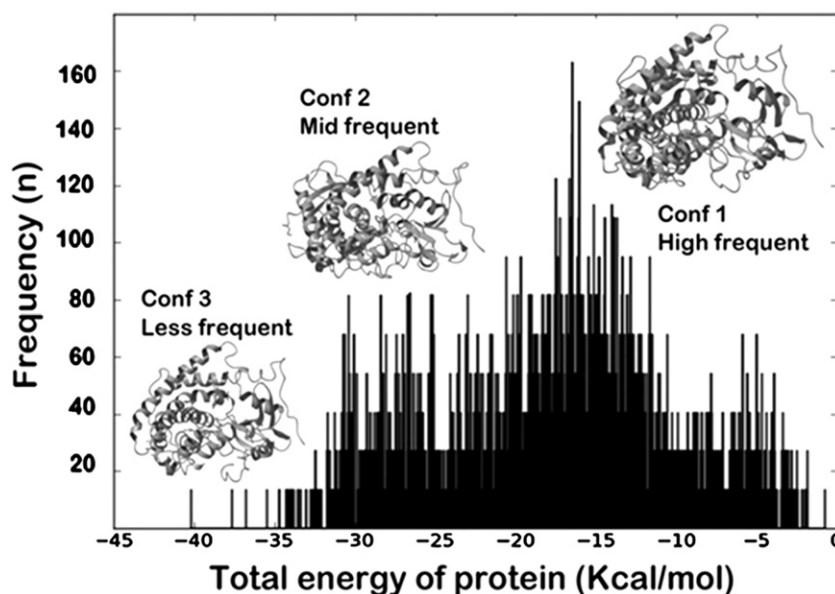


Fig. 2. MD selection of probable conformations of Cpd I of CYP_{BM3} 21B3. A Maxwell–Boltzmann energy distribution was adjusted from total energy (kcal/mol) and frequency (n) of every structure of MD production. The most probable conformation (Conformation 1) was found at 8.32 ns (RMSD 2.03 Å), in regard to initial coordinates; the middle-frequent conformation (Conformation 2) was found at 4.59 ns (RMSD 2.18 Å) and less frequent conformation (Conformation 3) was found at 1.85 ns (RMSD 2.53 Å).

Table 1

Spin density per residue from competition calculations on three different conformations of CYP_{BM3} 21B3. Mutated residues in each pathway are highlighted. All single point calculations were done in doublet spin multiplicity and charges were adjusted to match the electrostatic potential (ESP) imposed by Cpd I.

Conformation	Spin density per residue			Spin fraction			Distance (Å) from heme (C _α -Fe)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>e-Pathway 1</i>									
W90	0.498	0.610	0.586	0.50	0.60	0.63	15.24	15.34	15.44
T91	0.008	0.005	0.059	0.008	0.005	0.06	15.93	15.92	15.95
H92	0.036	0.027	0.060	0.03	0.02	0.06	19.51	19.46	19.57
W96	0.451	0.355	0.137	0.45	0.35	0.15	14.41	14.02	14.55
Y334	0.0	0.0	0.082	0.0	0.0	0.09	19.31	19.66	19.40
R398	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.0	11.17	10.09	11.05
A399	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.35	8.01	8.25
<i>e-Pathway 2</i>									
Y115	0.562	0.070	0.034	0.06	0.07	0.03	17.20	17.23	17.32
M118	0.048	0.091	0.044	0.05	0.09	0.04	19.28	19.81	19.74
M119	0.289	0.279	0.121	0.30	0.29	0.12	17.55	17.62	17.73
C156	0.184	0.118	0.092	0.18	0.12	0.09	15.64	15.72	16.01
F158	0.003	0.014	0.038	0.004	0.01	0.04	18.63	18.59	18.89
Y160	0.139	0.362	0.435	0.14	0.37	0.43	20.99	20.45	20.82
Q404	0.069	0.004	0.095	0.07	0.004	0.10	6.73	6.76	6.92
F405	0.196	0.036	0.142	0.20	0.04	0.14	9.81	9.81	9.59
<i>e-Pathway 3</i>									
L324	0.007	0.008	0.004	0.0	0.01	0.0	11.32	11.16	11.61
W325	0.903	0.903	0.768	0.90	0.95	0.77	14.36	14.03	14.32
H361	0.0	0.0	0.002	0.0	0.0	0.0	17.89	17.24	17.03
R362	0.015	0.015	0.063	0.01	0.02	0.06	19.01	19.21	18.99
P392	0.021	0.021	0.056	0.02	0.02	0.06	9.39	10.25	9.87
F393	0.058	0.004	0.100	0.06	0.02	0.10	6.36	6.92	6.42
<i>e-Pathway 4</i>									
L233	0.009	0.007	0.009	0.009	0.007	0.01	15.47	16.01	15.24
H236	0.233	0.001	0.195	0.23	0.002	0.20	19.16	18.94	18.76
M237	0.479	0.433	0.515	0.48	0.45	0.52	18.95	18.83	18.92
L238	0.010	0.008	0.005	0.01	0.009	0.01	22.59	21.32	21.02
H239	0.261	0.337	0.263	0.26	0.35	0.26	23.81	23.96	23.76
F261	0.004	0.171	0.006	0.004	0.18	0.01	9.37	9.98	10.21

distribution (conformation 1) was utilized as basis for the design of stabilizing mutations.

Four routes were determined, each comprising different quantum regions (Fig. 3) in order to track the electron delocalization through the pathway. The resulting ET pathways were described based on spin density, which described the free radical character of the species. All spin plots were obtained from a grid projection of the difference in the α - and β -spin orbitals from an unrestricted wave function. Mülliken spin population analysis was also used to estimate the amount of radical character in each residue.

The first ET pathway from W90 \rightarrow heme CpdI (Fig. 3a) allowed the identification of solvent-exposed residues prone to oxidation: Y334, W90, and H92. Y334 is placed at \sim 20 Å from heme and it is located on the most external position of the aqueduct previously identified by Oprea et al. [51]. H92 is also a surface residue, co-planar and distanced 3 Å from W90 (\sim 22 Å from heme). This pathway describes a markedly inductive effect of protein backbone, allowing spin density to be placed in the amide bond of A399–C400. R398 also showed low spin density on its guanidine side chain, which could promote spin delocalization from W96 nearby. The latter was previously suggested as a probable electron donor, since a tryptophan-based amino acid free radical was identified by low-temperature EPR on reaction of P450_{BM3}-F87G with iodobenzene (IOB) or *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA) [10]. Although W96 is hydrogen bonded to the *d*-ring heme propionate (17-propionate IUPAC nomenclature), the pathway could not be directly tracked from heme, because spin delocalization rises from C400 partial electron donation.

On the other hand, spin density migrated from W96 to T91, which transferred to W90 by the inductive effect of the backbone. Other solvent exposed residues such as H92 and Y334 also harbored spin density (Fig. 3a). A competition calculation on low redox potential residues of the first ET pathway (i.e. W90, T91, H92, W96, Y334, R398 and A399) showed that W90 and W96 were the residues containing the highest spin density (0.48 and 0.49 spin fraction) (Table 1), while the H92, Y334 and R398 residues accounted for the remaining fraction of spin (\sim 0.04 fraction) on the most frequent conformation. Due to its close vicinity to the heme group (1.75 Å) and its electron-donating character, W96 was replaced by an alanine residue (W96A variant), representing a non-hydrogen bonding and high redox potential species.

The second ET pathway (Fig. 3b) describes the electron migration from exposed Y160 to heme Cpd I. In this pathway, we explored the role of oxidizable tyrosine residues, because previous studies on single and double mutants on tyrosine residues of P450cam (Y75F and Y96F) demonstrated the existence of a tyrosine-based free radical close to heme [25,28,58,59]. Unexpectedly, competition calculations on most probable conformation, showed low spin density on closest residues to heme, namely Y115 and C156 (0.06 and 0.19 of total spin fraction). However, F405, M119 and Y160 were the residues with the highest spin density (0.20, 0.29 and 0.14 of spin fraction, respectively) (Table 1). Because F405 is placed close (\sim 4.51 Å) to the α -ring vinyl group (3-vinyl), it may share π - π stacking interaction. This residue was replaced by leucine (F405L variant), in order to reduce the aforementioned interaction.

The third ET pathway (Fig. 3c) explored the radical migration from solvent-exposed W325 \rightarrow heme Cpd I. QM/MM iterative methods revealed that electron spin density is able to migrate by inductive effect, imposed by the intervening residues (R362, H361, L324, P392 and F393), until C400. This inductive transfer promoted the localization of spin density on F393 and W325 residues (0.05 and 0.90 spin fractions), with relative lower spin density on H361, R362 and P392 (\sim 0.05 of spin fraction) on the most probable conformation. The main goal of this calculation was to explore the existence of another tryptophan-based free radical, since another 3 more tryptophan residues are at accessible distance of Cpd I (W90, W96, and W130 at 19.1, 24.6 and 19.9 Å from C_α-Fe, respectively). Because F393 is the closest spin containing residue (3.09 Å from thiolate of C400), it was replaced by alanine; since the aromatic moiety may play an important role through steric interactions and its replacement may electronically disconnect the heme prosthetic group from the protein matrix.

The fourth ET pathway (Fig. 3d) probed the direct electron spin migration from M237 (9 Å from heme) to Cpd I. This residue is bridged to heme by the phenyl side chain of F261. The competition calculation resolved that spin density is preferably localized in the M237 vicinity (0.48 of total spin fraction on most probable conformation). However, while QM region was changed, the spin density was able to migrate from M237 side chain to neighboring residues until reaching the solvent exposed H239 (M237 \rightarrow H236, L238 \rightarrow H239), probing that M237 functions as bridge instead of electron sink (Table 1). M237 was replaced by valine (M237V) in order to reduce the electron migration.

3.3. Catalytic and stability properties of single and double mutants of CYP_{BM3} 21B3

Four amino acid residues were selected from the ET pathway analysis: W96 from the first ET pathway (Fig. 3a), F405 from the second ET pathway (Fig. 3b), F393 from the third ET pathway (Fig. 3c) and M237 from the fourth ET pathway (Fig. 3d). The selected residues were mutated and the variants expressed in *E. coli* DH5 α strain. P450_{BM3} mutants were purified and kinetically characterized for the oxidation of 2,6-dimethoxyphenol, varying hydrogen peroxide concentration (Table 2). The stability in the presence of 3 mM hydrogen peroxide and in the absence of a reducing substrate was also determined

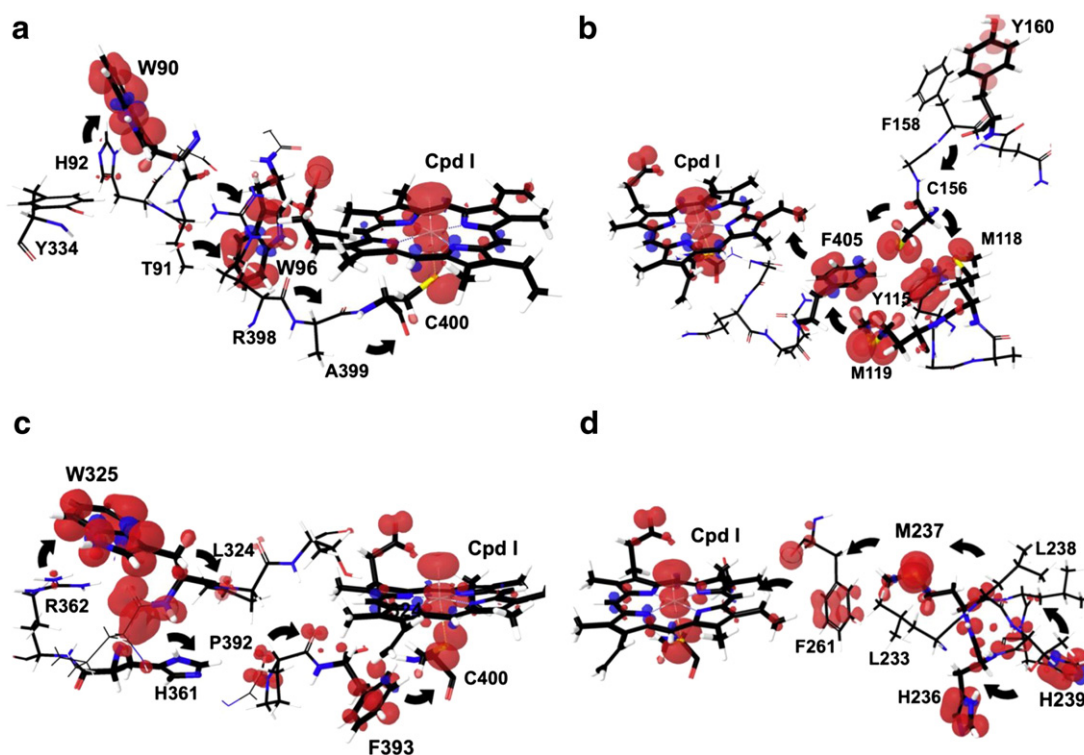


Fig. 3. Electron transfer pathways obtained from a grid projection of the difference in the α - and β -spin orbitals from an unrestricted wave function. The estimation of radical character of residues was obtained from Mülliken spin population analysis. The resulting ET pathways were described based on spin density, describing the free radical character of the species.

(Fig. 4), and decay constants for activity and destruction of heme signal are also shown in Table 2.

The parental 21B3 shows poor stability in the presence of 3 mM H_2O_2 (Table 2). The catalytic activity is quickly lost ($t_{1/2} = 0.38$ min), while the heme integrity remains longer ($t_{1/2} = 9.6$ min), suggesting that inactivating oxidation precedes the heme destruction, as observed in some peroxidases [20,32]. The W96A mutant was 3-fold less active (k_{cat}) than parental 21B3, and as expected both activity (k_i) and heme integrity (k_h) decreased slower compared to parental protein. The hydrogen peroxide inactivation is a mechanism-based process, thus the faster peroxidase is, the faster free radicals are produced and, in the absence of reducing substrate, it is thus inactivated sooner. Mutations on F393 and M237 do not significantly affect neither activity nor heme stability. On the opposite, the catalytic activity of mutant F405L showed increased stability compared with parental 21B3 ($t_{1/2}$ of 3.23 and 0.38, respectively) without significant change in the catalytic activity (k_{cat}), suggesting true enzyme stabilization.

In order to explore the combinatorial effects attained by single-point mutations, a double mutant W96A/F405L was prepared. This double mutant showed similar catalytic efficiency that parental 21B3 ($k_{\text{cat}}/K_M = 17.51$ and $11.61 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively). However, the double

mutant acquired a marked stability in the presence of 3 mM H_2O_2 . In terms of activity, the double mutant is 260 times more stable than the parental enzyme, and no heme destruction after 120 min could be detected. Contrarily to kinetic stability of all other variants that fill a first-order equation, the double variant W96A/F405L followed double-exponential decay kinetics ($r^2 = 0.9757$). In addition, QM/MM calculations of the most probable conformation (obtained from molecular dynamics simulation) of double mutant W96/F405L resulted in a more favorable doublet spin state (~ 3.9 kcal/mol lower than quartet), showing that changes in surrounding media modify spin equilibrium. Furthermore, competition calculations of doublet spin multiplicity of W96A/F405L double mutant, displayed poor electron spin density along protein backbone from the solvent exposed residues W90 and Y160 of ET pathways 1 and 2, respectively. This result support that electron transfer pathways were effectively reduced and remodeled as consequence of higher redox potential site mutations.

3.4. Determination of oxidized residues in P450_{BM3} 21B3

To validate the QM/MM algorithm and to identify possible electron sources from protein matrix during inactivation process, the presence

Table 2

Kinetic constants (k_{cat} and K_M) of P450_{BM3} mutants and first-order rate constants for inactivation (k_i) and heme destruction (k_h) in presence of 3 mM H_2O_2 .

Variant	$k_{\text{cat app}}$ (min^{-1})	$K_M \text{ app}$ (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)	k_i (min^{-1})	$t_{1/2}$ activity (min)	k_h (min^{-1})	$t_{1/2}$ heme (min)
21B3	96	8.3	11.6	1.81	0.38	0.07	9.6
W96A	35	18.	1.9	0.21	3.23	0.02	34.3
F405L	117	14.5	8.0	0.26	2.60	0.05	13.1
F393A	103	7.8	13.1	1.62	0.55	0.07	9.76
M237V	95	9.1	10.5	1.92	0.36	0.05	12.5
W96A;F405L	116	6.6	17.5	0.007	99	Stable ^a	Stable ^a

^a No heme destruction detected after 2 h.

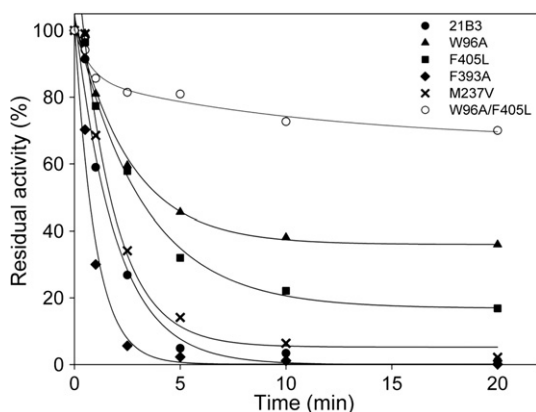


Fig. 4. Inactivation kinetics of selected mutants of P450_{BM3} 21B3. Residual activities of each variant were estimated after different incubation times with 3 mM H₂O₂ and they are expressed as percentage of the initial rate (time 0).

of oxidized residues in a fully inactivated sample of parental 21B3 variant was determined (Table 3). Trypsin cleaved peptides from fully H₂O₂-inactivated P450_{BM3} 21B3 were analyzed through LC–MS and the oxidized residues were identified. Residues W90, H92 and Y334 from ET pathway 1, Y160 from ET pathway 2, and W352 from ET pathway 3 were detected as oxidized amino acids. In addition, low redox potential and exposed residues were also identified as oxidized residues (M30, Y51, Y166, M185, Y198, M212, Y305, Y313, M316).

4. Discussion

Peroxidase stabilization has been a challenging and intense research field due to the intrinsic reactivity of catalytic intermediates (i.e. Cpd 0, Cpd I and Cpd III, theoretically and experimentally demonstrated) generated during enzyme turnover [3,56]. In order to stabilize peroxidases, different approaches have been explored. Directed evolution has achieved remarkable success to increase the stability against hydrogen peroxide, temperature and ionic strength [60,61]. These methodologies use a high throughput screening of large collections of mutants under selective pressure for certain harsh conditions. Nevertheless, the role of mutations on the stabilization usually remains unknown and their effects could not be entirely accounted for redox chemistry [30], and thus the generated information could not be applied for other enzymes.

However, rational redox-based approaches generate more information about the inactivation process. The prime target of these approaches is the identification of low redox potential residues, which are readily oxidized by Cpd I in the absence of reducing substrate, and their replacement by site-directed mutagenesis [32]. The peroxidase inactivation process initially involves electron transfer to heme, either

Table 3

Oxidized residues (shown in bold) from H₂O₂-inactivated P450_{BM3} 21B3. A sample of fully inactivated CYP_{BM3}21B3 was digested with trypsin under N₂-saturated atmosphere. The peptide solution was analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry system (LC–MS) with nanospray ionization system (ESI).

Peptide	Oxidized residues
DFAGDGLATSW THEK	W90, H92
V M NDLV DK	M212
L W PTAPAFSL YAK	W325, Y334
VLVDPVPS YK	Y305
LTLDTIGLCGF NYR	Y160
FNS FYR	Y166
ANPDDPAYDEN KR	Y198
YLSS QR	Y51
ALDEAM NK	M185
YVGMVLNEAL R	Y313, M316
NLPLNTDKPVQAL MK	M30

from residues 14 Å away of the active site through the backbone [36] or from close residues (closer than 14 Å) by the quantum process of tunneling [62]. Whatever the process, a detailed electronic description of the active site and surrounding residues is needed in order to understand the main role of each amino acid in the reactivity control of intermediates, as well as to mapping the possible residues prone to electron donation during suicide inactivation.

In previous works, ab initio QM/MM methods have been used to track the electron migration pathways between redox partners, such as heme peroxidases (cytochrome c peroxidase and cytochrome c) and heme-thiolate enzymes (P450cam and putidaredoxin) [34,39,40]. The main goal of these reports was to map the migration of an electron spin excess through the enzyme, resulting in the description of an interconnecting pathway between the redox centers, which in turn allowed the identification of key residues within each pathway [36].

Our QM/MM calculations of Cpd I showed that the most probable spin ground state is quartet (only 3.46 kcal/mol lower than doublet spin state). It has been reported that Cpd I ground state, from a thermophilic P450, is a doublet [48]. Nevertheless, this state depends on conformation, electrostatic potential imposed by protein residues and solvent, pH and temperature [63,64], and heme proteins may display mixed quantum spin states between different Fe oxidation states [55,64–66]. This is supported by the fact that d⁴–d⁷ elements could certainly have degenerated spin states [67]. As an example, theoretical studies on Cpd I of Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* displayed a mixture of spin states, between doublet and quartet as ground state [68,69]. Since there are not conclusive experimental data for our system, all three spin states were explored performing a Maxwell–Boltzmann distribution analysis in order to find the more probable state, as performed by Shaik and Thiel groups [52,56,57].

In this work, we have identified, by QM/MM methods, the possible electron transfer pathways and then selectively identified the key residues (lowest redox potential and high spin-containing located on the second coordination sphere of Fe) of each pathway. Calculations of electron spin migration allowed us to map four different electron pathways connecting heme Cpd I with low redox potential residues on the surface (Y334, Y160, M237, W90 and W325) (Fig. 3). These ET pathways were different in length and nature of involved residues, suggesting differences in the conductivity from the protein matrix to the heme Cpd I. Also, from our competition calculations, it was shown that subtle fluctuations of protein conformation (RMSD~0.5 Å) significantly altered the delocalization of spin density on the residues of each pathway, according to Page et al. [62] who pointed out the importance of establishing the protein geometric configurations prone to electron transfer. Thus, choosing the most probable conformation (i.e. through molecular dynamics and Maxwell–Boltzmann distribution) as work model, proved to be an important issue for proper assignment of the oxidation tendency of residues.

From these calculations, we selectively replaced amino acid candidates (high spin-containing and heme-closest residues) with higher redox potential residues (W96A, F405L, M237V and F393A), in order to verify the theoretical hypothesis of reducing electron flow to heme Cpd I. Two mutations showed significant stability improvement against the presence of hydrogen peroxide when compared to CYP_{BM3} 21B3 parental enzyme. The W96A variant showed higher heme integrity (Soret band half-life time) and the F405L variant increased catalytic stability (residual activity). The W96 residue has been previously reported as a harboring residue for the radical formed during reaction of CYP_{BM3} 21B3 with *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA), measured by EPR and transient kinetics [10]. In addition, for P450cam it was suggested [54] and then experimentally confirmed [70], that heme propionate groups are electrostatically shielded by hydrogen bonds to arginine residues (R172 and R399), stabilizing the porphyrin π-cation radical. The W96 residue is also hydrogen bonded to *d*-propionate group and could promote delocalization of the free radical of Cpd I, as reported for ascorbate peroxidase [33]. Our results suggest that

replacing W96 with a higher redox potential residue stabilizes the porphyrin π -cation radical, as reflected by the increased half-life time of the enzyme. However, this argument for stability should be taken cautiously because the mutation negatively affects the peroxidase activity (3 times slower than parental CYP_{BM3} 21B3), consequently producing a reduced electron flow.

On the other hand, residue F405 is placed at close proximity to *a*-ring vinyl of heme group during molecular dynamics simulation (4.5 ± 0.6 Å) and its phenyl side chain is oriented to form a π - π stacking interaction. Our calculations also showed that F405 harbors spin density, suggesting an electron transfer process to this residue. Residue F405 is linked to C400 thiolate through Q403 and Q404, generating a complex network of hydrogen bonds. The mutation F405L increased the half-life time almost 7-fold, while the catalytic rate was not affected, it even slightly increased when compared with the parental CYP_{BM3} 21B3 (116 min^{-1} vs 96 min^{-1} , respectively). The stability of the Soret signal was also slightly increased, suggesting that F405 plays a role in electron transfer involved in the heme self-destruction. Thus, Cpd I could readily oxidize the involved residues in the ET pathway 2, because Y115, M118, M119, C156 and Y160 have a lower redox potential than F405. The mutation on F405 eliminates the connecting bridge generated by phenyl side chain and then the electron flow is efficiently reduced, generating a more stable enzyme.

Despite the fact that we could track electron spin migration from surface to Cpd I in the ET pathways 3 and 4, their pathway media is composed of higher redox potential residues; W325-L324-R362-H361-P392-F393-C400-Cpd I for ET pathway 3 and H239-L238-H236-M237-F261-Cpd I for ET pathway 4. Apparently, these media represent a higher energetic barrier for electron transfer and thus seem to be less preferred pathways for radical migration to reduce heme Cpd I. Thus, as expected mutations in these pathways do not affect the enzyme stability.

Finally, to identify the electron sources from protein matrix during inactivation process, we evaluated our QM/MM algorithm through LC-MS analysis. Oxidized residues in a fully H₂O₂-inactivated P450_{BM3} 21B3 were determined. W90, H92, Y334, Y160 and W325 from ET pathways 1, 2 and ET pathway 3, respectively, were found in its oxidized form. The oxidation of these residues was effectively predicted by the QM/MM algorithm. The non-predicted residues are particularly low redox residues or they are located in the solvent exposed protein surface. Thus, our QM/MM algorithm was accurate enough to identify several routes and it was possible by site directed mutations to reduce the electron transfer from electron donating residues to Cpd I.

5. Conclusions

The algorithm "QM/MM ET pathway" was successfully used to map the intramolecular electron transfer involved in the radical migration that induces the suicide inactivation of cytochrome P450_{BM3} 21B3. Rational enzyme stabilization was performed by site directed mutation of selected amino acid residues based on their redox properties. The participation of selected residues on the ET pathways was experimentally confirmed by LC-MS analysis. From this study, a double variant, showing to be 260 times more stable to hydrogen peroxide inactivation than the parental enzyme, was produced. In conclusion, the rational approach with QM/MM tools was useful to stabilize the CYP_{BM3} 21B3, and because it is mechanism-based, this approach could be extended to the study of other peroxidases.

Acknowledgments

All computer analysis was performed using the cluster of the Instituto de Biotecnología-UNAM. The work has been funded by PAPIIT-UNAM (IN201612) and CONACYT (AVL scholarship). We thank Dra. L. Perezgasga and Rosa Roman for their technical help.

References

- P.C. Cirino, F.H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 3299–3301.
- D.C. Haines, D.R. Tomchick, M. Machius, J.A. Peterson, *Biochemistry* 40 (2001) 13456–13465.
- I.G. Denisov, T.M. Makris, S.G. Sligar, I. Schlichting, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2253–2278.
- E.G. Hrycay, S.M. Bandiera, *Arch. Biochem. Biophys.* 522 (2010) 71–89.
- K. Jensen, P.E. Jensen, B.L. Müller, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 533–539.
- A. Luthra, I.G. Denisov, S.G. Sligar, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 26–35.
- C.J.C. Whitehouse, S.G. Bell, L.-L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 1218–1260.
- I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A.M. Stock, S.A. Maves, D.E. Benson, R.M. Sweet, D. Ringe, G.A. Petsko, S.G. Sligar, *Science* 287 (2000) 1615–1622.
- P.C. Cirino, F.H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* 344 (2002) 932–937.
- G.M. Raner, J.I. Thompson, A. Haddy, V. Tangham, N. Bynum, G. Ramachandra Reddy, D.P. Ballou, J.H. Dawson, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 2045–2053.
- R. Rutter, L.P. Hager, H. Dhonau, M. Hendrich, M. Valentine, P. Debrunner, *Biochemistry* 23 (1984) 6809–6816.
- K.M. Manoj, L.P. Hager, *Biochemistry* 47 (2008) 2997–3003.
- M. Pecyna, R. Ullrich, B. Bittner, A. Clemens, K. Scheibner, R. Schubert, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 885–897.
- I. Matsunaga, N. Yokotani, O. Gotoh, E. Kusunose, M. Yamada, K. Ichihara, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23592–23596.
- I. Matsunaga, A. Ueda, N. Fujiwara, T. Sumimoto, K. Ichihara, *Lipids* 34 (1999) 841–846.
- Q.-S. Li, J. Ogawa, S. Shimizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 1258–1261.
- C.J.C. Whitehouse, S.G. Bell, H.G. Tufton, R.J.P. Kenny, L.C.I. Ogilvie, L.L. Wong, *Chem. Commun.* 8 (2008) 966–968.
- M.M.Y. Chen, C.D. Snow, C.L. Vizcarra, S.L. Mayo, F.H. Arnold, *Protein Eng. Des. Sel.* 25 (2012) 171–178.
- L. Sanchez-Sanchez, R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, *Pestic. Biochem. Physiol.* 102 (2012) 169–174.
- B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Chem. Biol.* 9 (2002) 555–565.
- H. Wariishi, M.H. Gold, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2070–2077.
- K.P. Conner, C.M. Woods, W.M. Atkins, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 56–65.
- T. Fox, G. Tsapralis, A.M. English, *Biochemistry* 33 (1994) 186–191.
- R.-Q. Liu, M.A. Miller, G.W. Han, S. Hamm, L. Geren, S. Hibdon, J. Kraut, B. Durham, F. Millett, *Biochemistry* 33 (1994) 8678–8685.
- V. Schünemann, A. Trautwein, C. Jung, J. Terner, *Hyperfine Interact.* 141–142 (2002) 279–284.
- A. Ivancich, C. Jakopitsch, M. Auer, S. Un, C. Obinger, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14093–14102.
- A.J. Fielding, R. Singh, B. Boscolo, P.C. Loewen, E.M. Ghibaudi, A. Ivancich, *Biochemistry* 47 (2008) 9781–9792.
- T. Spolitat, J. Dawson, D. Ballou, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 599–611.
- C. Bernini, R. Pogni, F.J. Ruiz-Duenas, A.T. Martinez, R. Basosi, A. Sinicropi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 5078–5098.
- J.R. Cherry, M.H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, A.H. Pedersen, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 379–384.
- H. Takahashi, C. Miyazaki-Imamura, in: J. Kim, S.H. Kim, P. Wang (Eds.), *Biomolecular catalysis*, American Chemical Society Symposium Series, vol. 986, 2008, pp. 61–75, (Chapter 3).
- B. Valderrama, H. Garcia-Arellano, S. Giansanti, M.C. Baratto, R. Pogni, R. Vazquez-Duhalt, *FASEB J.* 20 (2006) 1233–1235.
- V. Guallar, B. Olsen, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 755–760.
- V. Guallar, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 13460–13464.
- V. Guallar, F.H. Wallrapp, *J. R. Soc. Interface* 5 (2008) 233–239.
- V. Guallar, F.H. Wallrapp, *Biophys. Chem.* 149 (2010) 1–11.
- W.-C. Tseng, J.-W. Lin, T.-Y. Wei, T.-Y. Fang, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 376–378.
- F.P. Guengerich, M.V. Martin, C.D. Sohl, Q. Cheng, *Nat. Protocols* 4 (2009) 1245–1251.
- F. Wallrapp, D. Masone, V. Guallar, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 12989–12994.
- M.F. Lucas, D.L. Rousseau, V. Guallar, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1807 (2011) 1305–1313.
- W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1657–1666.
- W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11225–11236.
- T.H. Dunning Jr., P.J. Hay, in: H.F. Schaefer III (Ed.), *Modern Theoretical Chemistry*, Plenum, New York, 1976, pp. 1–28.
- P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 270–283.
- W.R. Wadt, P.J. Hay, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 284–298.
- G. Battistuzzi, M. Bellei, C.A. Bortolotti, M. Sola, *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (2010) 21–36.
- M. Newcomb, R. Zhang, R.E.P. Chandrasena, J.A. Halgrimson, J.H. Horner, T.M. Makris, S.G. Sligar, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 4580–4581.
- J. Rittle, M.T. Green, *Science* 330 (2010) 933–937.
- C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1504 (2001) 196–219.
- P.J. Winn, S.K. Lüdemann, R. Gauges, V. Lounnas, R.C. Wade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5361–5366.
- T.I. Oprea, G. Hummer, A.E. García, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 2133–2138.
- D. Fishelovitch, S. Shaik, H.J. Wolfson, R. Nussinov, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 13018–13025.
- R. Lonsdale, J. Oláh, A.J. Mulholland, J.N. Harvey, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 15464–15474.
- V. Guallar, M.-H. Baik, S.J. Lippard, R.A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6998–7002.

- [55] C.M. Bathelt, J. Zurek, A.J. Mulholland, J.N. Harvey, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12900–12908.
- [56] B. Meunier, S.P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3947–3980.
- [57] A. Altun, S. Shaik, W. Thiel, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1324–1337.
- [58] V. Schünemann, C. Jung, F. Lenzian, A.L. Barra, T. Teschner, A. Trautwein, *Hyperfine Interact.* 156–157 (2004) 247–256.
- [59] T. Spolítak, J.H. Dawson, D.P. Ballou, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 2034–2044.
- [60] G. Saab-Rincón, B. Valderrama, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 167–192.
- [61] E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, F.J. Ruiz-Duenas, A.T. Martinez, M. Alcalde, *Biochem. J.* 441 (2012) 487–498.
- [62] C.C. Page, C.C. Moser, X. Chen, P.L. Dutton, *Nature* 402 (1999) 47–52.
- [63] C.M. Bathelt, A.J. Mulholland, J.N. Harvey, *Dalton Trans.* (2005) 3470–3476.
- [64] K.-B. Cho, H. Hirao, H. Chen, M.A. Carvajal, S. Cohen, E. Derat, W. Thiel, S. Shaik, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 13128–13138.
- [65] A. Feis, M.P. Marzocchi, M. Paoli, G. Smulevich, *Biochemistry* 33 (1994) 4577–4583.
- [66] B.D. Howes, C.B. Schidt, K.G. Welinder, M.P. Marzocchi, J.-G. Ma, J. Zhang, J.A. Shelnut, G. Smulevich, *Biophys. J.* 77 (1999) 478–492.
- [67] Y. Sunatsuki, Y. Ikuta, N. Matsumoto, H. Ohta, M. Kojima, S. Iijima, S. Hayami, Y. Maeda, S. Kaizaki, F. Dahan, et al., *Angew. Chem.* 115 (2003) 1652–1656.
- [68] H. Chen, H. Hirao, E. Derat, I. Schlichting, S. Shaik, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 9490–9500.
- [69] H. Chen, J. Song, W. Lai, W. Wu, S. Shaik, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 940–953.
- [70] T.P. Barrows, T.L. Poulos, *Biochemistry* 44 (2005) 14062–14068.



Unusual activation during peroxidase reaction of a cytochrome c variant

S. Águila^{a,*}, A.M. Vidal-Limón^a, J.B. Alderete^b, M. Sosa-Torres^c, R. Vázquez-Duhalt^a

^a Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico

^b Facultad de Ciencias Químicas, Casilla 160-C, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^c Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán México, DF. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2012

Received in revised form 11 August 2012

Accepted 12 September 2012

Available online 19 September 2012

Keywords:

Compound 0

Cytochrome c

EPR

Heme

Molecular dynamics

Peroxidase activity

ABSTRACT

Cytochrome c has been extensively used as model of peroxidase reaction. The peroxidase activity and stability of a triple mutant CYC-3 (N52I, Y67F and M80A) were studied and compared to those of wild type protein (Wt-16). The CYC-3 variant showed ten-fold increased activity in styrene oxidation. An intermediary specie that resembles to Cpd 0 ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{---OOH}$) of peroxidases was detected through EPR measurements during the reaction of CYC-3 with H_2O_2 . Using molecular dynamics (MD) it was found that mutations in CYC-3 induce conformational changes in the M80 loop promoting the rotation of D ring propionate toward heme iron and the inclusion of transient water molecules that could explain the formation of Cpd 0 intermediate. The effects of these conformational changes on the activity increase are discussed.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cytochrome c is a heme protein involved in the electron transport chain of mitochondria [1]. Under pro-apoptotic conditions, this protein plays an important role in the modification on mitochondria inner membrane, being a structural modulator through peroxidation of phospholipids as cardiolipin [2,3]. Thus, cytochrome c could be considered as a versatile protein, showing a role as antioxidant in certain conditions, even as scavenger of superoxide radical during oxidative burst [4,5].

This protein is able to catalyze peroxidase-like reactions, as oxidative dehydrogenation, S-oxidation, epoxidation, hydroxylation, aromatic oxidation and hydrogen peroxide (H_2O_2) dismutation [6]. Peroxidase-like activity of cytochrome c have been studied in different reaction media, either in solution or immobilized, showing that the activity can be modified by the support pore-size [7,8] or by the nature of support [9–12]. On the other hand, cytochrome c has been extensively used as biocatalyst in non-conventional reaction media [13,14], showing a relative stability in organic solvents. On opposite to peroxidases, cytochrome c has

the heme prosthetic group covalently bonded to cysteine residues (C14 and C17), avoiding the heme loss in increasing concentrations of solvents [15–18]. In addition, due to its conformational flexibility, the activity could be increased by mutations around heme pocket [19], or even increased in unfolded states of the protein [20].

Despite the extensive studies on this protein, its peroxidase mechanism has not been elucidated. The task is not trivial, since there is evidence from EPR measurements, that cytochrome c cleave homolytically the O–O bond of H_2O_2 [21]. In addition, tridimensional structures of cytochrome c resolved from X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance (NMR), evidences the absence of an acid–base general catalyst in the heme vicinity that could reorganize the hydrogen peroxide protons, as in the case of peroxidases.

In our previous work, a set of multiple-point mutations was generated [22]. We selected a double mutant (N52I, Y67F) as starting point because lack of complex hydrogen bond network imposed by water 166 (W166), which in turn altered overall redox potential and increased protein flexibility [19]. In addition, we included a third mutation in axial ligand methionine 80 (M80) in order to mimic the penta-coordinated environment of peroxidases.

The CYC-3 variant was characterized in terms of its reaction with H_2O_2 by UV/vis and EPR spectroscopic techniques. Finally, with the aid of molecular dynamic simulations, the possible conformational changes associated to the absence of M80 axial ligand are discussed.

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, Mexico. Tel.: +52 7773291619.

E-mail address: seaguila@ibt.unam.mx (S. Águila).

2. Experimental procedure

2.1. Chemicals

Hydrogen peroxide (H₂O₂), pinacyanol chloride and styrene were obtained from Sigma–Aldrich. Acetonitrile was purchased from American Bioanalytical Natick, MA, USA.

2.1.1. Site-directed mutagenesis and purification of recombinant iso-1-cytochrome c variants

The plasmid pCYC3, encoded for mutant CYC-3 (N52I, Y67F, M80A), was generated as previously described [22]. The derived plasmid was transformed into *Escherichia coli* C41 strain for protein expression [23]. Mutant (CYC-3) and wild-type (Wt-16) proteins were expressed and purified according to García-Arellano et al. [24] with minor modifications. The proteins were purified through an anion exchange chromatography using a High-S Econo-Pac cartridge (BioRad).

2.1.2. Activity assays and stability

Styrene oxidation was performed in a reaction mixture (1 mL) containing wild-type protein or iso-1-cytochrome c variant and 1 mM styrene in 60 mM phosphate buffer, pH 6.0, with 15% acetonitrile at 25 °C [7]. The reactions were started by addition of different concentrations of H₂O₂. For catalytic rate determination the reactions were stopped after 2 min by adding 1 mL of acetonitrile and the reaction extent was monitored by HPLC. All data were adjusted to Hill kinetic model.

Total turnover number (TTN) was estimated following the reactions for 30 min until no reaction was detected. The reaction progress was monitored by HPLC (Merck Hitachi) equipped with an L-6200A Intelligent pump, an UV-visible detector L-4200 model and a reverse-phase column (2.1 mm × 250 mm) RP-18 5 μm (Lichrocart). The mobile phase was acetonitrile:water 65:35 (v/v) at 0.5 mL/min. The decrease in the styrene concentration was determined by measuring the peak area at A₂₅₄ and correlated to a standard curve. The specific activity was estimated by measuring the moles of oxidized substrate *per mole enzyme per min* at 25 °C. All reactions were done by triplicate, and the mean and standard deviations are reported.

Inactivation rate constants were estimated in independent assays of each cytochrome preparation. Wt-16 or CYC-3 variant (3 μM) were incubated in the presence of 1 mM H₂O₂ and the residual peroxidase activity at 0.16, 0.5, 1, 5, 10 and 20 min was determined as pinacyanol chloride oxidation ($\epsilon_{603} = 82.35 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [6]. The reactions were carried out in 60 mM sodium phosphate buffer pH 6.1 at 25 °C. All measurements were carried out in a Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrometer. Half-life time ($t_{1/2}$) was estimated from a first-order decay equation ($a_t = a_0 e^{-kt}$).

2.1.3. EPR measurements

EPR spectra were recorded on a Bruker Elexys E-500 spectrometer equipped with an Oxford Instruments liquid Helium system at 9.8 GHz of potency. The protein samples (0.5 mM) were incubated in an ice-cold water bath at 276 K, prior to addition of 1 mM H₂O₂. Immediately after mixing, the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at 77 K until recording. All EPR spectra were recorded between 4 and 20 K. The simulated spectra were obtained using standard simulation packages.

2.1.4. EPR spin trapping experiments

EPR spectra were recorded using a Jeol TE300 ESR spectrometer (Tokyo, Jp) operating at 9.44 GHz with a modulation frequency of 100 kHz. All reactions were performed in 60 mM sodium phosphate

solutions (pH 6.1) treated with Chelex 100 resin to inhibit possible trace-transition metal catalysis. The reactions were performed at 25 °C in a total volume of 0.25 mL with 30 mM 5,5-dimethyl-N-oxide (DMPO) and 120 μM of each variant. All the reactions were started by the addition of 5 mM hydrogen peroxide.

2.1.5. Simulation method

Molecular dynamics (MD) simulation and analysis were carried out using the NAMD and VMD programs, respectively. The CHARMM 27 force field was used with CHARMM parameters for the heme group in cytochrome c being kindly shared by Luthey-Schulten's group [25]. The simulations were performed in the presence of explicit solvent with 994 water molecules (TIP3P). For all simulations, the starting protein coordinates were taken from X-ray structure of oxidized *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c (PDB code: 1YCC). The mutated proteins were constructed from the same pdb with psfgen NAMD package. Truncated sphere boundary conditions were used. An NpT ensemble was performed; constant pressure (1 atm) and temperature were applied by weak coupling to an external bath temperature coupling relaxation time. A short-range cutoff of 8 Å was used. For long-range interactions (electrostatic and van der Waals) a cutoff range of 12 Å was applied. Every 10 fs pair list was updated. Integration time of 2 fs was used for production. Analysis of trajectory coordinates and energies were written to disk every 0.1 ps. For each variant, trajectories of 50 ns were obtained at 25 °C.

3. Results

The catalytic constants for peroxidase activity of CYC-3 variant and wild-type (Wt-16) proteins were determined for styrene oxidation, which is a typical peroxidase substrate (Table 1). The CYC-3 variant is ten-times more active and shows twice catalytic efficiency than the wild-type cytochrome. The total turnover number (TTN) is also four-times higher in the variant than in the wild-type protein at 25 °C. TTN could be related to both activity rate and stability. In the CYC-3 variant the high TTN values could be attributed to the increase in activity, because the stability ($t_{1/2}$) is the same in both preparations (Table 1).

In order to detect differences in the nature of intermediaries during the reaction of CYC-3 with H₂O₂, EPR experiments at helium temperature were performed using fast freeze techniques. In the resting state, CYC-3 variant showed high spin signals at $g = 6.06$, 5.86 and 4.38, while low spin signals are displayed at $g = 2.05$, 2.01 and 1.97. From the data integration of each EPR signal, important differences were detected. CYC-3 contains predominantly high spin iron species (~80%), contrarily to Wt-16 [4,26]. An amino acid based radical was also found in CYC-3 at $g = 2.0046$ (Fig. 1A), which seems to be different than those found in Wt-16 ($g = 2.0032$). The broad signal of the radical found in CYC-3 was 20.7 G, meanwhile for Wt-16 was 8.7 G [27]. This amino acid radical of CYC-3 resembles to a tryptophan-based radical, since simulation of an N atom of indole group fits well to experimental data (Fig. 1C).

Immediately after mixing CYC-3 with H₂O₂, a signal was detected in the low spin region of CYC-3 (Fig. 1A). This signal at $g_x = 2.2940$; $g_y = 2.1892$; $g_z = 1.9279$ resembles to low spin Fe^{III}–OOH (Cpd 0). The spectra simulation suggests the presence of this intermediate coupled to the formation of amino acid free radical. The simulation of the intermediate Fe^{III}–OOH, fits well to experimental data (Fig. 1D), and it is similar than those from other heme proteins such as myoglobin [28] and P450_{cam} [29].

To corroborate the presence of a Cpd 0 like intermediate, spin trapping experiments were carried out. Detection of hydroxyl radical could suggest the homolytic cleavage of O–O bond, thus the formation or accumulation of Cpd 0 could not be accounted. DMPO

Table 1
Catalytic constants of wild-type yeast iso-1-cytochrome c and its CYC-3 variant for the styrene oxidation.

Cytochrome c variant	k_{cat} styrene (s^{-1})	K_{H} styrene (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{H}}$ ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Hill parameter (n)	r^2	TTN ($\text{mol}_{\text{subst}}/\text{mol}_{\text{enz}}$)	Life-time ($t_{1/2}$ = min)
Wt-16	1.00 (± 0.36)	0.67 (± 0.39)	1.49	1.27 (± 0.29)	0.9942	15 (± 2.51)	14.6
CYC-3	9.13 (± 4.30)	0.63 (± 0.43)	144.92	1.46 (± 0.46)	0.9839	47 (± 6.99)	12.5

Experimental data of specific rate constants of variant is found in Fig. 1S.

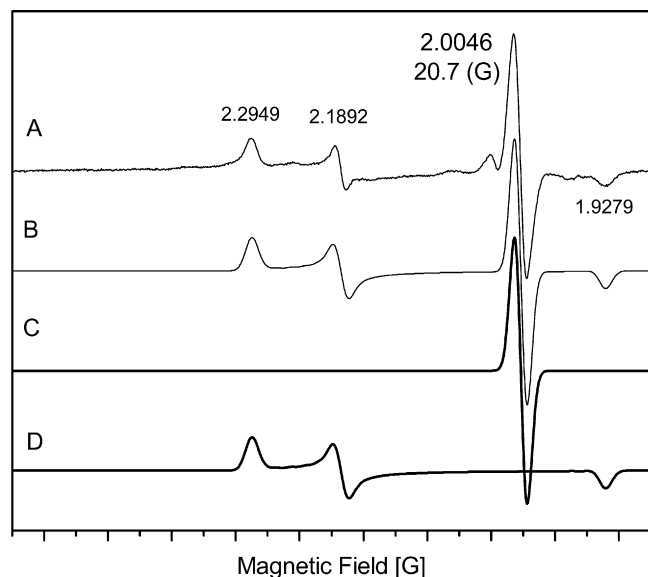


Fig. 1. EPR signals and simulation spectrum of the electronic signals from the reaction of CYC-3 with H_2O_2 . (A) Low spin region recorded during the reaction. (B) Simulated spectra of low spin iron signal and amino acid free radical. (C) The simulation of the signal at $g = 2.0046$ and 20.57 G broad suggesting a tryptophan-based radical. (D) Simulation of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$. The parameters for simulation were 9.3893 (ls $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$) $g_x = 2.2940$; $g_y = 2.1892$; $g_z = 1.9279$.

(5,5-dimethyl-N-oxide) was used as trapping probe for detection of hydroxyl radical (OH^\bullet) during the reaction of Wt-16 or CYC-3 with H_2O_2 . Wt-16 showed the formation of $\text{DMPO}^\bullet\text{-OH}$ adduct, as previously reported [21,30] displaying a quartet signal at 77 K (Fig. 2D). CYC-3 also showed quartet signal at 77 K, suggesting a mixture of intermediates (Fig. 2C).

Molecular mechanics simulations were performed to obtain detailed information of possible conformational changes that could contribute to the activity increase. The structural dynamics of cytochrome c mutants were analyzed by performing 50 ns MD. The root mean square deviation (RMSD) of backbone atoms remains largely constant along the simulation with averages ca. 1.5 and 1.4 for Wt-16 and CYC-3 respectively (data not shown). Maximum deviations of 1.9 \AA were observed at 37 and 35 ns for Wt-16 and CYC-3, respectively.

At 25°C , the secondary structure did not show significant changes in any protein preparation. Nevertheless, there were significant changes in tertiary structures of CYC-3 variant. In Fig. 3 is compared the displacement of methionine 80 Ω -loop (M80 loop, residues 75–85 [31]) of both proteins. M80 loop of CYC-3 showed higher flexibility during 50 ns of molecular dynamics ($1.640 \pm 0.298 \text{ \AA}$) when compared with these from Wt-16 ($0.680 \pm 0.160 \text{ \AA}$) (Fig. 2S, supplementary material). Another important conformational change was the rotation of D propionate toward iron heme group (Fig. 4A). CYC-3 presented 96% of propionate permanence inside the heme group at 25°C (Fig. 4B), while rotation of D propionate toward iron heme group was not observed for Wt-16 protein during 50 ns of MD.

In addition, another important feature observed through MD simulations performed on CYC-3, is that there are residing water

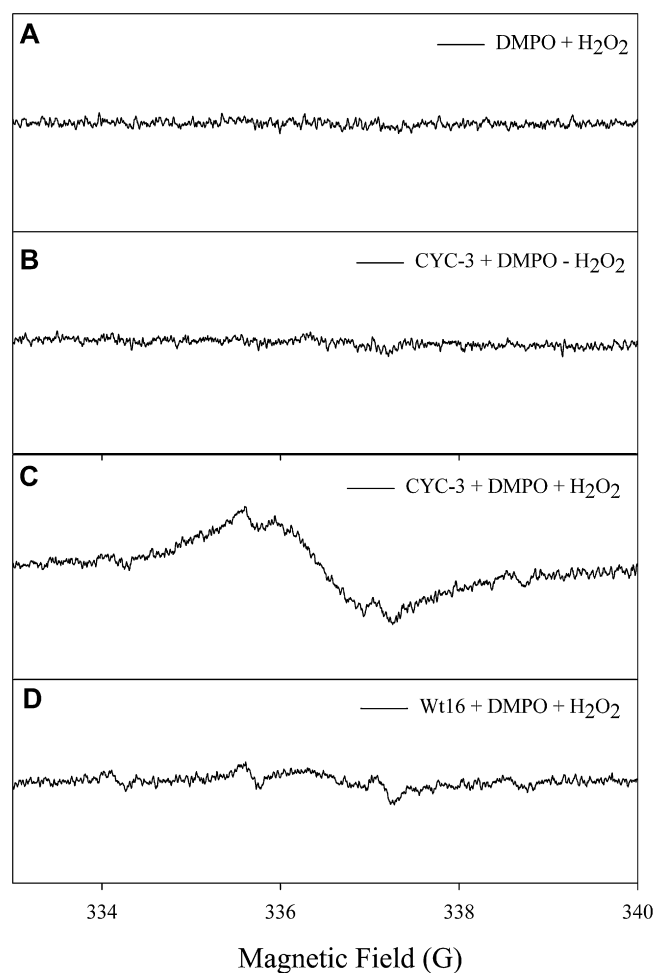


Fig. 2. Spin trapping experiments of reaction of iso-1-cytochrome c variants and H_2O_2 . (A) Control reaction of $\text{DMPO} + \text{H}_2\text{O}_2$. (B) Control reactions of $\text{DMPO} + \text{CYC-3}$. As expected, no OH^\bullet signals were detected in absence of H_2O_2 reaction. (C) Spectra of reaction of $\text{DMPO} + \text{CYC-3} + \text{H}_2\text{O}_2$. A low intensity quartet signal, related to DMPO-OH^\bullet adduct was recorded at 77 K. (D) Spectra reaction of $\text{DMPO} + \text{Wt-16} + \text{H}_2\text{O}_2$. The quartet signal was found in the same experimental conditions.

molecules found inside the active site, which share hydrogen bond with the carboxylate group of D-propionate heme group (Fig. 5A). The first water molecule interacts with the carboxylate group between 19 ns and 25 ns and later other molecule was observed between 30 ns and 50 ns (Fig. 5B). These water molecules could be involved in the propionate acid–base catalysis, since the transfer of proximal proton of the H_2O_2 at the D-propionate can be mediated by hydrogen bonding interaction with the water molecule.

4. Discussion

The aim of this work was to explore the effect of direct alterations on the redox environment around the heme group, in order to evaluate changes in the activity rate (k_{cat}) through changes on both, the axial ligand and the amino acid residues that could be redox potential regulators.

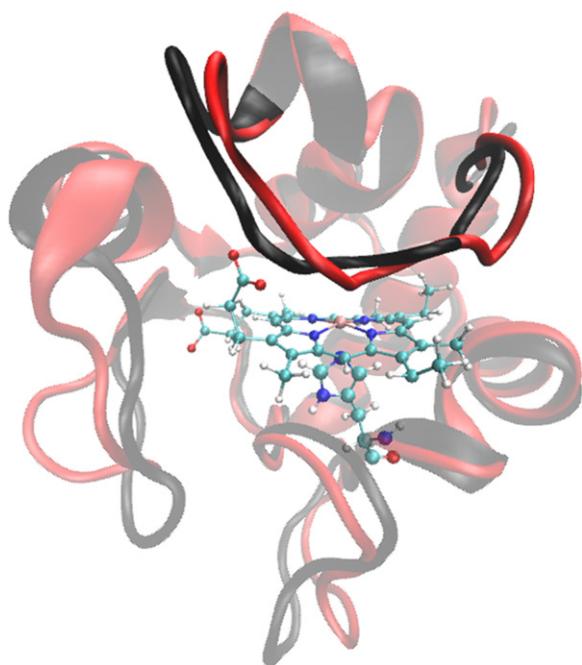


Fig. 3. Displacement of M80 loop (residues 75–85) [31] from CYC-3 variant (black) and from compared wild-type protein (red). The figure corresponds to the average structures determined by rmsd of MD. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

Wild-type cytochrome c (Wt-16) has a conserved and internally bonded water molecule (Wat166) that is forming hydrogen bonds with the N52 and Y67 residues. These hydrogen bonds are involved in the tertiary structure stabilization, and also in the strength of the Fe–S bond imposed by M80 ligand. Another important factor modulating M80 bond strength is its direct interaction with the side chain of Y67 residue. It could be expected that this hydrogen bond increases the electron-withdrawing capacity of the M80 ligand and thereby increases the heme reduction potential [32]. The mutation of serine 52 of cytochrome c5511 from *Pseudomonas*

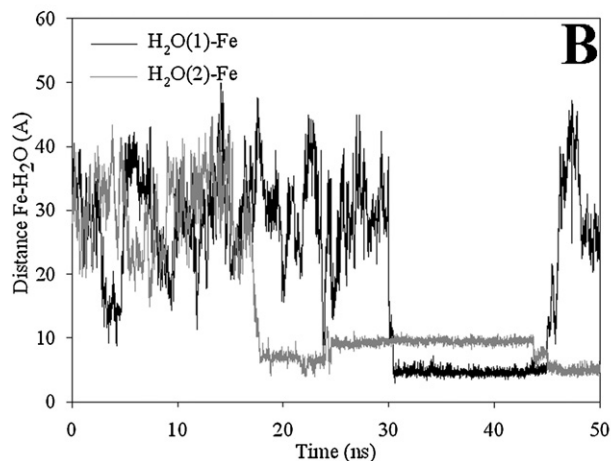
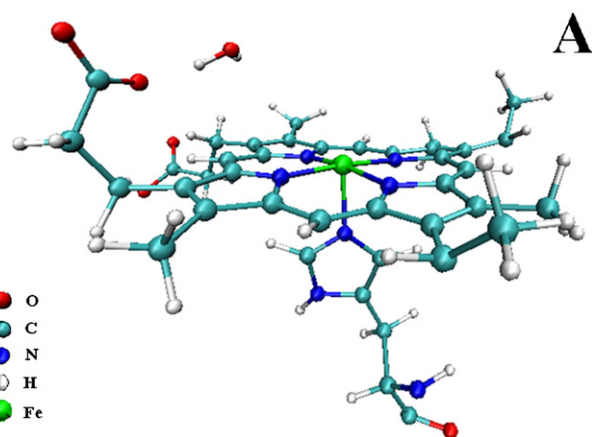


Fig. 5. Resident water molecules inside CYC-3. Scheme of water molecules inside heme pocket and water exchange during molecular dynamics simulation.

aeruginosa (equivalent to the position N52 of iso-1-cytochrome c) significantly modifies the polarity of heme cavity by changing the hydrogen bond pattern. This mutation also drastically modifies the redox potential (~ 40 mV) [33]. Thus, modulation of cytochrome c

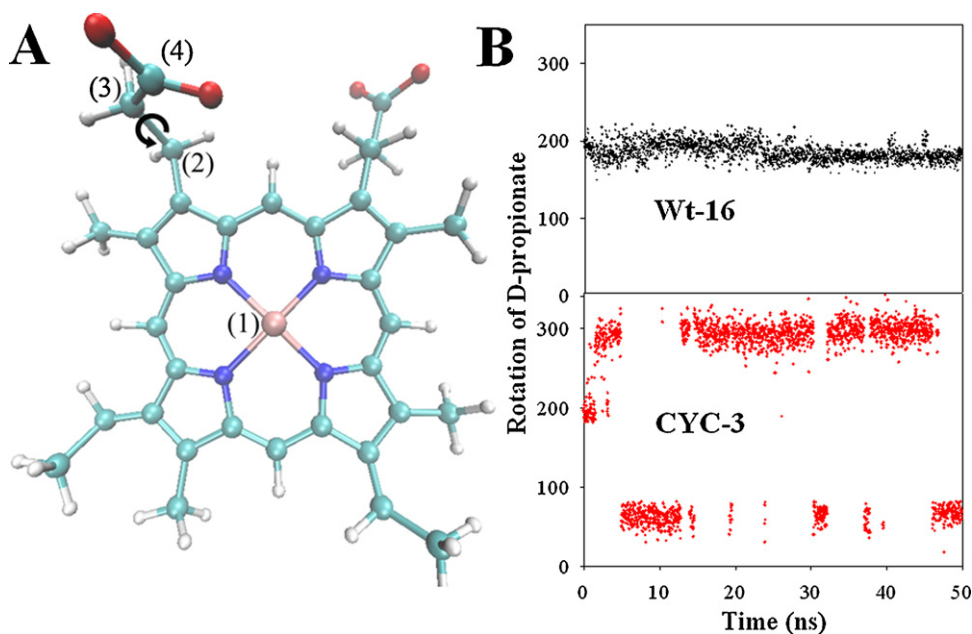


Fig. 4. Rotation of the D-ring propionate of CYC-3. (A) Scheme of the conformational change of D-ring propionate. (B) Permanence of the propionate toward the iron heme group during MD. The propionate rotation was considered with respect to the heme iron. The rotation angle is referred to FE(1)–CA(2)–CB(3)–CG(4) of D-ring propionate.

redox potential seems to be directly dependent on conformation of amino acid residues close to heme group [34]. In our case, the mutations of N52I and Y67F disrupt the hydrogen bond network with Wat166, losing this structural water molecule. The mid-point redox potential of the mutant is altered since the single mutation Y67F disrupts the direct interaction of tyrosine OH with the SD of M80 [33,32].

The triple mutant CYC-3 showed a nine-fold increase of catalytic activity when compared with the wild-type protein (Table 1). In addition, the catalytic efficiency of CYC-3 is two orders higher than Wt-16. The same increase in activity was observed for the oxidation of guaiacol by CYC-3 in the absence of acetonitrile ($k_{\text{cat}} = 1941 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 2.85 \text{ mM}$ for Wt-16 and, $k_{\text{cat}} = 3229 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 4.28 \text{ mM}$ for CYC-3 variant), suggesting that this increase in activity is associated to conformational changes due to mutations and no consequence of the presence of organic solvent [35,36]. According our data, there are not differences of half-life time between CYC-3 and Wt-16, thus the TTN increase could be not attributed to the protein stability. It seems that the increase of turnover number is only due to the activity increase (Table 1).

Previously was described for cytochrome P450_{cam}, that loss of water coordination of heme or a change from hexa-coordinated to penta-coordinated state modulates the redox potential of iron from low to high spin [37,38]. The triple mutant CYC-3, in a penta-coordinated state, lacks of redox modulation imposed by Wat166, N52 and Y67, producing a new electronic environment profile (~80% high spin iron).

Interestingly, CYC-3 displays a mixture of low spin iron signals at $g_x = 2.2940$; $g_y = 2.1892$; $g_z = 1.9279$ after mixing with H_2O_2 and an amino acid based free radical at $g = 2.0046$. As showed in Fig. 1D, the simulation of the radical signal suggests the presence of Cpd 0-like specie. This signal is similar to the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{---OOH}$ (Cpd 0) signal from myoglobin [28,39], unfolded cytochrome c_{550} [40], and cytochrome P450_{cam} D251N mutant with hampered proton delivery system responsible of Cpd I formation [29]. This specie is the first formed intermediate during peroxidase mechanism, which originate the compound I ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O} - \text{porphyrin}^{*\ast}$). The intrinsic reactivity of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{---OOH}$ or Cpd 0 in cytochromes P450 is still a matter of debate. We propose that formation Cpd 0 could also account for the increase of catalytic activity, because Cpd 0 constitutes the last state of the enzyme prior the oxidation of an organic compound, and it seems to be implicated as the second oxidant capable of olefin epoxidation [5,41]. Detection of Cpd 0 in cytochrome c is key fact, because the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{---OOH}$ can undergo homolytic or heterolytic cleavage of the O—O bond resulting into other important catalytic intermediates. Heterolytic cleavage of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{---OOH}$ intermediate should generate the typical Cpd I ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O} - \text{porphyrin}^{*\ast}$) of peroxidases. While the homolytic cleavage should produce the EPR silent species Cpd II ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O} - \text{porphyrin}$) and hydroxyl radical. Subsequently this hydroxyl radical would produce secondary protein radical Cpd I* ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O} - \text{porphyrin}(\text{aa}^{\ast})$), which has been detected in the reaction between a mutant of horseradish peroxidase (HRP-His42Leu) with hydrogen peroxide [42].

It is well known that DMPO reacts with hydroxyl radical and superoxide radicals. This reaction increases the quartet signal of DMPO. The homolytic cleavage of H_2O_2 by cytochrome c should lead to OH^{\ast} formation, while in the heterolytic cleavage of H_2O_2 by cytochrome c no signal of the $\text{DMPO}^{\ast}\text{---OH}$ adduct should be detected. Both, Wt-16 and CYC-3 showed a decreased DMPO^{\ast} signal intensity when reacted with H_2O_2 (Fig. 2). These experiments demonstrate that wild type enzyme (Wt-16) and CYC-3 variant produce hydroxyl radical, that is consistent with previous reports [30]. Thus, our results showed the presence of multiple species in CYC-3 [43]. First, H_2O_2 can undergo the lost of the proximal proton in the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{---H}_2\text{O}_2$ complex generating Cpd 0 that could reacts to form Cpd I* and OH^{\ast} radical and contributing with increased activity

[44]. Thus, H_2O_2 can undergo homolytic O—O bond cleavage, generating OH^{\ast} (Fig. 2) that diffuses outside of the active site or that could react *in situ*, oxidizing the heme vicinity [29], generating a ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O} - \text{porphyrin}(\text{aa}^{\ast})$) intermediate [42,45].

On the other hand, the second signal in the low spin region of CYC-3 showed different g value ($g = 2.0046$) than Wt-16 amino acid free radical ($g = 2.0032$). The g broad value of the amino acid based free radical in Wt-16 (g broad = 8.7 G) has been previously assigned to an oxygen atom of a tyrosine residue [27]. Since Y67 is absent in CYC-3, the location of the free radical should be different. The free radical amino acid specie in CYC-3 could be allocated on a nitrogen atom (g broad = 20.7 G), probably the N atom of indole ring of tryptophan 59 (W59). This residue is located at 3 Å from heme propionate A being the closest indolic nitrogen atom.

The M80 loop showed two different conformations due to the absence of axial ligand methionine (Fig. 3). The displacement of M80 loop seems to be an important modulator of the peroxidase activity, as it has been demonstrated by the activity increase of unfolded [20] and hypochlorous acid oxidized [46] cytochrome c, where the S—Fe coordination is broken.

Another important conformational change of CYC-3 is the rotation of the D-ring propionate toward heme iron (Fig. 4). The propionate rotation has been observed in others proteins, such as cytochromes and haloperoxidases [47–50]. In the crystal structure of dehaloperoxidase of *Amphitrite ornata* (pdb code 3DR9) there are water molecules at hydrogen bond distance (2.2–2.9 Å) next to the switched A ring propionate group. Consistently, the simulation agreed with experimental determined structures (Scheme 1S, supplementary material). The D-ring propionate from wild-type protein (Wt-16) showed poor rotation toward iron heme during the simulation. This is attributed to the fact that heme propionate is hydrogen bonded with N52 and Y67 residues. When the residues N52I and Y67F are mutated (CYC-3) free rotation of propionate is observed. This conformational change could promote the activation of heme group, because the carboxylate could participate in the proton abstraction of H_2O_2 [51]. The iron activation through a carboxylate has been observed in chloroperoxidase, where carboxylate of E183 participates in proton transfer of H_2O_2 during the formation of compound I (Cpd I) [52]. The distance of propionate oxygen to iron (5.7 ± 1.6 Å) in CYC-3 imposes an apparent restriction for activation of Fe^{III} to $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$, since there are not other groups around the heme pocket that can promote a proton transfer. It is proposed that the carboxylate group needs the assistance of a water molecule, due to the long average distance between iron and D-propionate. As reported from theoretical calculations in horseradish peroxidase (HRP), a water molecule seems participate in the proton transfer of the H_2O_2 , facilitating the conversion of the Cpd 0 to Cpd I through the pK_a reduction of H_2O_2 [53]. Our MD calculations showed transient water molecules inside the active site of CYC-3 sharing hydrogen bonds with the D-propionate oxygen as depicted in Fig. 5.

Finally, the complex rearrangement of hydrogen bonding patterns inside heme cavity, imposed by N52I, Y67F and M80A mutations, promotes drastic changes at local level, such as conformational changes associated to an increase in flexibility of M80 loop, loss of hydrogen bonding on D propionate that facilitated its free rotation and inclusion of water molecules next to reactive groups.

5. Conclusion

We can conclude, that variant CYC-3 showed an increased activity due to three key mutations (N52I, F67Y, M80A), which promotes the displacement from low spin to high spin iron species in its resting state. These mutations induce conformational changes that

derive in the formation of an intermediate specie similar to Cpd 0 ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{—OOH}$) of peroxidases during its reaction with H_2O_2 . The presence of this state could account for activity increase, despite that a mixture of O—O cleavage mechanisms was found. Different local conformational changes on M80 loop could be also associated to loss of sixth coordination (M80A). Finally, the N52I and Y67F mutations promote the rotation of D ring propionate toward heme iron. The presence of transient water molecules inside heme cavity reduces the distance between D ring propionate and heme iron, explaining the formation of Cpd 0 intermediate.

Acknowledgements

This work was funded by PhD scholarships; (S.A.) AT-24080115 CONICYT (Chile) and (A.V.-L.) CONACYT (México). This work was also supported by an international cooperation Chile-México (CONICYT-CONACYT). We thank Biol. Rosa Román Miranda and Dr. Lucia Perezgasga Ciscomani for technical assistance in enzymology and molecular biology techniques. We also thank Dr. Alejandro Solano-Peralta and Q. Juan Pablo Saucedo-Vázquez from EPR laboratory at the “Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación” (USAI).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.009>.

References

- [1] G.W. Bushnell, G.V. Louie, G.D. Brayer, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 585–595.
- [2] L.V. Basova, I.V. Kurnikov, L. Wang, V.B. Ritov, N.A. Belikova, I.I. Vlasova, A.A. Pacheco, D.E. Winnica, J. Peterson, H.I. Bayir, D.H. Waldeck, V.E. Kagan, *Biochemistry* 46 (2007) 3423–3434.
- [3] N.A. Belikova, Y.A. Vladimirov, A.N. Osipov, A.A. Kapralov, V.A. Tyurin, M.V. Potapovich, L.V. Basova, J. Peterson, I.V. Kurnikov, V.E. Kagan, *Biochemistry* 45 (2006) 4998–5009.
- [4] D.L. Brautigam, B.A. Feinberg, B.M. Hoffman, E. Margoliash, J. Preisach, W.E. Blumberg, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 574–582.
- [5] S. Jin, T.M. Makris, T.A. Bryson, S.G. Sligar, J.H. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3406–3407.
- [6] R. Vazquez-Duhalt, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7 (1999) 241–249.
- [7] S. Águila, R. Vazquez-Duhalt, C. Covarrubias, G. Pecchi, J.B. Alderete, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 70 (2011) 81–87.
- [8] W. Shang, J.H. Nuffer, V.A. Muniz-Papandrea, W. Colon, R.W. Siegel, J.S. Dordick, *Small* 5 (2009) 470–476.
- [9] M.A. Mohsin, F.-G. Banica, T. Oshima, T. Hianik, *Electroanalysis* 23 (2011) 1229–1235.
- [10] K. Kato, M. Suzuki, M. Tanemura, T. Saito, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 118 (2010) 410–416.
- [11] E. Castellini, A. Ranieri, D.A. Simari, G. Di Rocco, *Langmuir* 25 (2009) 6849–6855.
- [12] Z.Q. Feng, S. Imabayashi, T. Kakiuchi, K. Niki, *J. Electroanal. Chem.* 394 (1995) 149–154.
- [13] R. Vazquez-Duhalt, K.M. Semple, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 936–943.
- [14] Y. Lu, W. Lu, W. Wang, Q. Guo, Y. Yang, *Talanta* 85 (2011) 1621–1626.
- [15] E. Torres, J. Victor Sandoval, F.I. Rosell, A. Grant Mauk, R. Vazquez-Duhalt, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 1014–1020.
- [16] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 494–499.
- [17] R. Akasaka, T. Mashino, M. Hirobe, *Arch. Biochem. Biophys.* 301 (1993) 355–360.
- [18] N.L. Klyachko, A.M. Klibanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37 (1992) 53–68.
- [19] G. Battistuzzi, C.A. Bortolotti, M. Bellei, G. Di Rocco, J. Salewski, P. Hildebrandt, M. Sola, *Biochemistry* 51 (2012) 5967–5978.
- [20] R.E.M. Diederix, M. Ubbink, G.W. Canters, *ChemBioChem* 3 (2002) 110–112.
- [21] M.J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subjects* 964 (1988) 28–35.
- [22] B. Valderrama, H. Garcia-Arellano, S. Giansanti, M.C. Baratto, R. Pogni, R. Vazquez-Duhalt, *FASEB J.* 20 (2006) 1233–1235.
- [23] B. Miroux, J.E. Walker, *J. Mol. Biol.* 260 (1996) 289–298.
- [24] H. Garcia-Arellano, B. Valderrama, G. Saab-Rincon, R. Vazquez-Duhalt, *Bioconjugate Chem.* 13 (2002) 1336–1344.
- [25] F. Autenrieth, E. Tajkhorshid, J. Baudry, Z. Luthey-Schulten, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1613–1622.
- [26] G.G. Silkstone, C.E. Cooper, D. Svistunenko, M.T. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 92–99.
- [27] D.P. Barr, M.R. Gunther, L.J. Deterding, K.B. Tomer, R.P. Mason, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15498–15503.
- [28] C.E. Cooper, M. Jurd, P. Nicholls, M.M. Wankasi, D.A. Svistunenko, B.J. Reeder, M.T. Wilson, *Dalton Trans.* (2005) 3483–3488.
- [29] R. Davydov, T.M. Makris, V. Kofman, D.E. Werst, S.G. Sligar, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1403–1415.
- [30] D.P. Barr, R.P. Mason, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12709–12716.
- [31] L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, G. Varani, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 824–837.
- [32] A.M. Berghuis, J.G. Guillemette, M. Smith, G.D. Brayer, *J. Mol. Biol.* 235 (1994) 1326–1341.
- [33] A.M. Berghuis, J.G. Guillemette, G. McLendon, F. Sherman, M. Smith, G.D. Brayer, *J. Mol. Biol.* 236 (1994) 786–799.
- [34] H. Tai, T. Udagawa, S. Mikami, A. Sugimoto, Y. Yamamoto, *J. Inorg. Biochem.* 108 (2012) 182–187.
- [35] N.J. O’Reill, E. Magner, *Langmuir* 21 (2005) 1009–1014.
- [36] M. Borsari, M. Bellei, C. Tavagnacco, S. Peressini, D. Mollo, G. Costa, *Inorg. Chim. Acta* 349 (2003) 182–188.
- [37] D.C. Haines, D.R. Tomchick, M. Machius, J.A. Peterson, *Biochemistry* 40 (2001) 13456–13465.
- [38] J.A. Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.* 144 (1971) 678–693.
- [39] T. Brittain, A.R. Baker, C.S. Butler, R.H. Little, D.J. Lowe, C. Greenwood, N.J. Watmough, *Biochem. J.* 326 (1997) 109–115.
- [40] R.E.M. Diederix, M. Fittipaldi, J.A.R. Worrall, M. Huber, M. Ubbink, G.W. Canters, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 7249–7257.
- [41] A. Luthra, I.G. Denisov, S.G. Sligar, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 26–35.
- [42] J.N. Rodríguez-López, D.J. Lowe, J. Hernández-Ruiz, A.N.P. Hiner, F. García-Cánovas, R.N.F. Thorneley, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11838–11847.
- [43] E. Busi, B.D. Howes, R. Pogni, R. Basosi, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9 (2000) 39–48.
- [44] N.A. Belikova, Y.Y. Tyurina, G. Borisenko, V. Tyurin, A.K. Samhan Arias, N. Yanamala, P.G. Furtmüller, J. Klein-Seetharaman, C. Obinger, V.E. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 11288–11289.
- [45] R. Davydov, R.L. Osborne, M. Shanmugam, J. Du, J.H. Dawson, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 14995–15004.
- [46] Y.R. Chen, L.J. Deterding, B.E. Sturgeon, K.B. Tomer, R.P. Mason, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29781–29791.
- [47] Z. Chen, V. De Serrano, L. Betts, S. Franzen, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 65 (2009) 34–40.
- [48] Y. Yao, C. Qian, K. Ye, J. Wang, Z. Bai, W. Tang, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 539–547.
- [49] X. Morelli, M. Czjzek, C.E. Hatchikian, O. Bornet, J.C. Fontecilla-Camps, N.P. Palma, J.J.G. Moura, F. Guerlesquin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23204–23210.
- [50] M.W. LaCount, E. Zhang, Y.P. Chen, K. Han, M.M. Whitton, D.E. Lincoln, S.A. Woodin, L. Lebiada, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18712–18716.
- [51] X. Yi, A. Conesa, P.J. Punt, L.P. Hager, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13855–13859.
- [52] H. Chen, H. Hirao, E. Derat, I. Schlichting, S. Shaik, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 9490–9500.
- [53] E. Derat, S. Shaik, C. Rovira, P. Vidossich, M. Alfonso-Prieto, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6346–6347.