



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de una
peroxigenasa fúngica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A:
JOAQUÍN RAMÍREZ RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS, ABRIL, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biocatálisis Redox bajo la dirección de la Dra. Marcela Ayala Aceves, que pertenece al departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de estudios de doctorado que otorgó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Asimismo, se agradece el financiamiento otorgado por el CONACyT y al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas para la realización de dos estancias de investigación en el extranjero y la asistencia a un congreso nacional y uno internacional.

Agradecimientos

A la doctora Marcela Ayala por haberme guiado todos estos años por el fascinante mundo de la investigación científica.

A la doctora Nina Pastor por sus propuestas que siempre fueron de mucha ayuda para explorar nuevas herramientas computacionales. Al doctor Lorenzo Segovia por su constante y sano escepticismo que me obligó a superarme en cada tutorial. A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la Biól. Rosa Román Miranda y a Fernando González que, con su ayuda técnica en el laboratorio, pude realizar muchos de los experimentos de esta tesis. A los miembros del Laboratorio de Biocatálisis Redox por su compañerismo y su contribución a un ambiente amigable en el día a día.

Al Dr. Miguel Alcalde Galeote del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC de España por recibirme en su laboratorio y junto con sus estudiantes por enseñarme lo relacionado con la expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la mutagénesis sitio-dirigida.

Al personal administrativo, técnico y de docencia en el Instituto de Biotecnología por todo el apoyo necesario durante mi tránsito por el posgrado. A la Dra. Georgina Ponce y al Dr. Enrique Galindo por haberme permitido colaborar en la revista Biotecnología en Movimiento.

A mi familia por todo su amor, comprensión y paciencia que me permitió concluir esta aventura llamada posgrado.

Esta tesis recibió financiamiento de los proyectos PAPIIT IN209116 y IN214619, así como del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la realización de las estancias.

Esta tesis utilizó recursos de la supercomputadora Miztli a través de los proyectos LANCAD-UNAM-DGTIC-293, SC16-1-S-24, SC15-1-S-29, and SC14-1-S-93.

Índice

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
El descubrimiento de la primera UPO.....	8
De peroxidasa inusual a peroxigenasa versátil	9
Una enzima eficiente y selectiva	11
La estructura de la UPO	11
Ciclo catalítico	12
Factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de las hemo-peroxidases	14
Avidez por los electrones: el potencial redox.....	14
Avidez por el átomo de hidrógeno: basicidad del compuesto II	17
El tamaño, la forma y la composición del canal del hemo: el papel de la topografía	19
PaDa-I: un modelo para estudiar la capacidad oxidante de una peroxigenasa.....	21
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares.....	23
5. Métodos computacionales y experimentales.....	24
Métodos computacionales.....	24
Preparación del sistema	24
Simulaciones de dinámica molecular.....	25
Métodos experimentales.....	25
Plásmidos pJRoC30-PaDal y pJRoC30-PM1	25
Linearización del plásmido pJRoC30-PM1 y purificación	26
Mutagénesis sitio-dirigida de pJRoC30-PaDal	26
Preparación de células competentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	29
Selección de colonias y cultivo en microplacas	31
Medición de la actividad en microplaca	32
Rescate de colonias que muestran actividad	34
Extracción de plásmido de las células de levadura y transformación de <i>E. coli</i>	34
Purificación de plásmido de <i>E. coli</i> y cuantificación de DNA.....	34
Producción de enzima PaDa-I y variantes en matraces	34
Purificación de la AaeUPO.....	36

Ensayos de actividad enzimática en celda de 1 mL	37
Determinación de parámetros cinéticos	38
Determinación del número de recambio total	38
Estabilidad de las variantes enzimáticas en presencia de peróxido de hidrógeno.....	39
6. Resultados y discusión.....	39
Otras observaciones	60
8. Conclusiones	61
9. Perspectivas	62
Referencias	62
Anexo I	66

Siglas

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin- 6-sulfónico)

DMP – 2,6-dimetoxifenol

E° – Potencial redox

E.C. – Enzyme Commission

k_{cat} – Constante catalítica

K_m – Constante de Michaelis-Menten

NAD(P)H – Dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato)

NBD – 5-nitro-1,3-benzodioxol

PAH – Hidrocarburos policíclicos aromáticos

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

SDS-PAGE- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

UPO – Peroxigenasa inespecífica

Resumen

Las peroxigenasas inespecíficas (UPO) son oxidorreductasas capaces de catalizar la transferencia de un átomo de oxígeno a una gran diversidad de sustratos orgánicos utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Estas enzimas de origen fúngico tienen un gran potencial biotecnológico en el área de síntesis orgánica y la biorremediación. Entender los factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de las UPO es de gran ayuda para poder diseñar procesos eficientes en aplicaciones industriales o de campo. La capacidad oxidante de este tipo de enzimas está determinada por diversos factores, que podemos clasificar en topográficos (forma y composición del sitio activo) y fisicoquímicos (reactividad de la enzima). En este trabajo, el objetivo fue explorar el papel que tiene la topografía del sitio activo de una UPO en la modulación de la actividad enzimática con diferentes sustratos modelo que pueden ser oxidados a través de oxidaciones que involucran uno o dos electrones. Además, se utilizaron sustratos recalcitrantes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y fenantreno para estudiar el efecto de la topografía del sitio activo en la capacidad catalítica de la enzima. Al realizar una inspección visual de la estructura de una UPO modelo, la del basidiomiceto *Agrocybe aegerita*, fue posible identificar dos residuos de fenilalanina que se orientan hacia el interior del canal y cuyo papel en la modulación de la actividad aun se desconoce.

Mediante mutagénesis sitio-dirigida de estos dos residuos (Phe76 y Phe191), se generaron las variantes sencillas F76A, F191A, F76L y las dobles F76A/F191A y F76L/F191A. En general, se observó que las mutaciones reducían la actividad con sustratos modelo como el naftaleno y el 5-nitro-1,3-benzodioxol, y sustratos voluminosos como el antraceno y fenantreno. Estas mutaciones no modificaron significativamente el comportamiento de las variantes con respecto a su estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno o con relación a sus propiedades electrónicas (espectros de UV-Vis y resonancia paramagnética electrónica). Lo anterior nos permite interpretar los cambios observados en la actividad enzimática como consecuencia del cambio en la topografía del canal y no debido a cambios en la reactividad o estabilidad de la enzima. Mediante un estudio de dinámica molecular, se encontró que las variantes mostraron una mayor flexibilidad en regiones importantes del canal. Además, la topografía se altera drásticamente en algunas variantes, por lo que esto estaría impidiendo una interacción favorable entre el sustrato y la enzima. Dado que estos residuos están conservados en esta familia de enzimas, se propone que el papel principal de los residuos aromáticos en el canal de acceso del sustrato, específicamente Phe76 y Phe191, sería el de mantener la topografía del canal y conferir cierta rigidez para una interacción favorable con el sustrato.

1. Introducción

El descubrimiento de la primera UPO

En Alemania, Martin Hofrichter y colaboradores descubrieron que el basidiomiceto *Agrocybe aegerita* TM A1 (familia Strophariaceae) producía seis isoformas de una enzima extracelular de 46 kDa cuando se cultivaba en un medio líquido con harina de soya. Estas enzimas eran capaces de catalizar la oxidación de alcohol veratrílico en presencia de peróxido de hidrógeno a pH 7.0 (Ullrich *et al.*, 2004). Esto era algo inusual, pues las peroxidasas conocidas hasta ese momento, como la lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*, lo hacían a un pH ácido (Tien & Kirk, 1988).

La enzima, ahora conocida como peroxigenasa inespecífica (UPO), era capaz de transformar alcoholes bencílicos (alcohol bencílico, alcohol anisílico y alcohol veratrílico) en sus respectivos aldehídos y posteriormente en sendos ácidos benzoicos (Figura 1A). Otros sustratos típicos de peroxidasa también fueron transformados por esta enzima: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin- 6-sulfónico) (ABTS) y 2,6-dimetoxifenol (DMP) (Figura 1B).

Por otra parte, se demostró que la enzima tenía actividad halogenasa en presencia de cloruro y bromuro, mas esta era de 10 a 20 veces menor comparada con la de la cloroperoxidasa de *Leptoxyphium fumago* (ahora reconocida también como una peroxigenasa, *LfuUPO*) (Figura 1C). Además, se observó la generación de burbujas cuando se incubó la enzima únicamente con H₂O₂ como sustrato, lo cual sugirió que la enzima podría tener actividad catalasa (algo que se había observado también para la *LfuUPO*) (Figura 1D). El pico de máxima absorbancia a los 420 nm (banda Soret) indicó que se trataba de una proteína con un grupo prostético hemo (Ullrich *et al.*, 2004). De esta manera, se había descubierto una nueva hemo-peroxidasa con gran versatilidad y que podría estar relacionada con la cloroperoxidasa, la cual durante muchos años había sido considerada como una peculiaridad de la naturaleza (Welinder, 1992).

de 2-naftol). También se detectaron trazas de 1,4-naftoquinona (1.3%), lo que indica que el 1-naftol puede ser transformado posteriormente mediante la actividad peroxidasa de la enzima (Figura 2B). Mediante experimentos de peróxido de hidrógeno marcado isotópicamente ($H_2^{18}O_2$), se demostró que el oxígeno que se incorporaba a los sustratos provenía del peróxido de hidrógeno (Ullrich y Hofrichter, 2005).

Estos descubrimientos abrieron la puerta para que esta enzima fuera considerada de gran interés en el área biotecnológica, pues podría usarse en la hidroxilación de diversos compuestos con requerimientos de reacción simples y amigables (solo peróxido de hidrógeno y una solución amortiguadora a pH neutro) (Hofrichter y Ullrich, 2006).

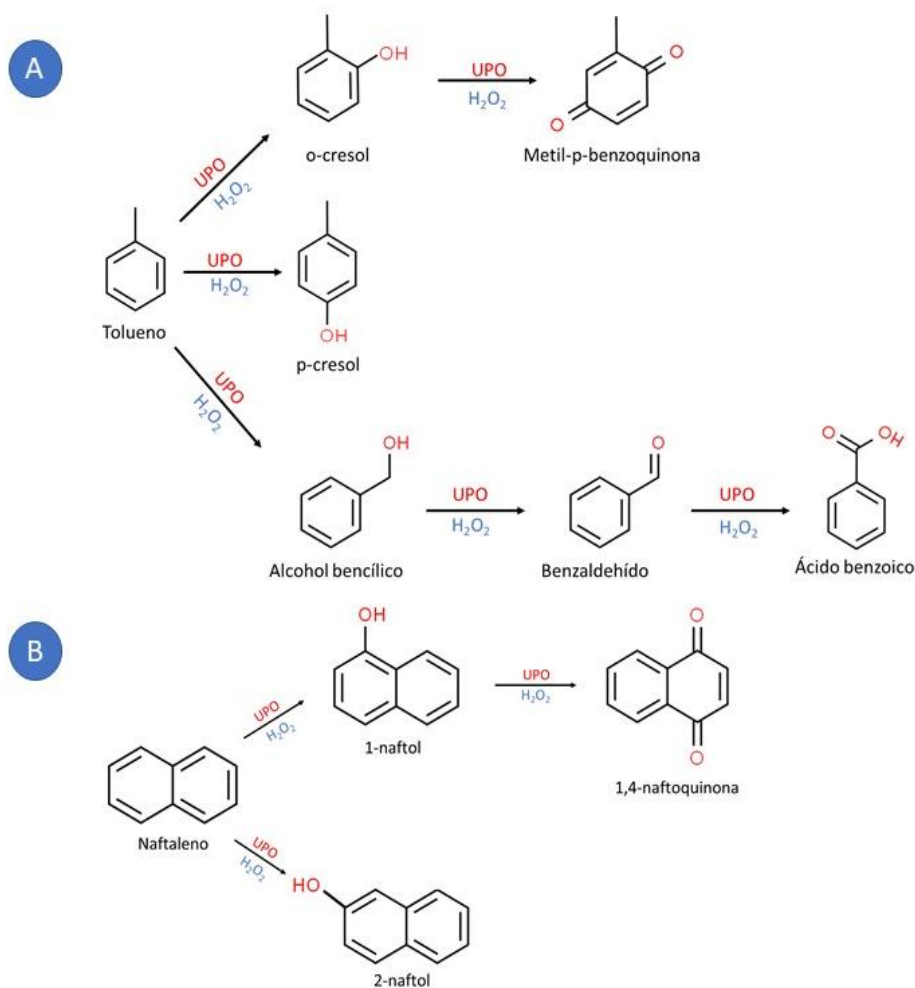


Figura 2. La AaeUPO cataliza reacciones de peroxigenación en compuestos aromáticos como el tolueno (A) y el naftaleno (B). Además, la enzima puede oxidar los productos de reacción mediante su actividad de peroxidasa clásica.

Una enzima eficiente y selectiva

La UPO de *A. aegerita* (*AaeUPO*) cataliza reacciones de hidroxilación más eficientemente que otras hemo-proteínas. Por ejemplo, la *AaeUPO* tiene una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de $5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la hidroxilación de metil-3,4-dimetoxibenciléter (Kinne *et al.*, 2009); por su parte, los citocromos P450 tienen una eficiencia catalítica de $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las cumarinas, que son estructuralmente similares (Yun *et al.*, 2005). Por otra parte, la *LfuUPO* y la *AaeUPO* son capaces de catalizar la hidroxilación de tolueno; sin embargo, la *AaeUPO* es un mejor catalizador para esta reacción, ya que la *LfuUPO* transforma tolueno a alcohol bencílico con una actividad de tan solo $1.67 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ (Miller *et al.*, 1995), mientras que la *AaeUPO* tiene una actividad específica de $5,857 \text{ min}^{-1}$ (Ullrich y Hofrichter, 2005). Además, la UPO sí es capaz de hidroxilar directamente el anillo aromático del tolueno, ya que se ha detectado que alrededor de un 30% del tolueno se transforma en derivados fenólicos (*p*-cresol, *o*-cresol) (Ullrich y Hofrichter, 2005). Otra característica importante de esta enzima es que produce alcoholes secundarios a partir de alcanos con una alta esteréoselectividad: produce el enantiómero (*R*) del 3-heptanol y 3-octanol casi en un 100% (Peter *et al.*, 2011).

La estructura de la UPO

La *AaeUPO* está conformada por 325 residuos de aminoácidos y tiene un grupo prostético protoporfirina IX (hemo), cuyo ligante proximal al hierro es un grupo tiolato ($-S^-$) de un residuo de cisteína (Ullrich y Hofrichter, 2005). En la Figura 3 se muestra un modelo de la estructura de la *AaeUPO*, la cual se obtuvo mediante cristalografía de rayos X (Piontek *et al.*, 2013). Un canal de acceso del sustrato al sitio activo está bien definido por dos hélices y dos asas (Figura 3A y 3B). En la región distal del grupo hemo se encuentran tres fenilalaninas (Phe69, Phe121 y Phe199) que ayudan al correcto posicionamiento de los sustratos (Figura 3C). El ligante

proximal al hierro es una cisteína (Cys36). En la hélice 2 del canal, se encuentran dos residuos importantes para la reducción del peróxido de hidrógeno: una arginina (Arg189) y un glutamato (Glu196) (Figura 3D). La cavidad donde se encuentra el hemo tiene forma de cono truncado y sus paredes están conformadas por varios residuos de fenilalanina. De acuerdo con los datos cristalográficos, esta enzima posee 34 grupos glicosilo del tipo manosa. Además, contiene un enlace disulfuro en la región del carboxilo terminal (Cys278-Cys319) (Piontek *et al.*, 2013).

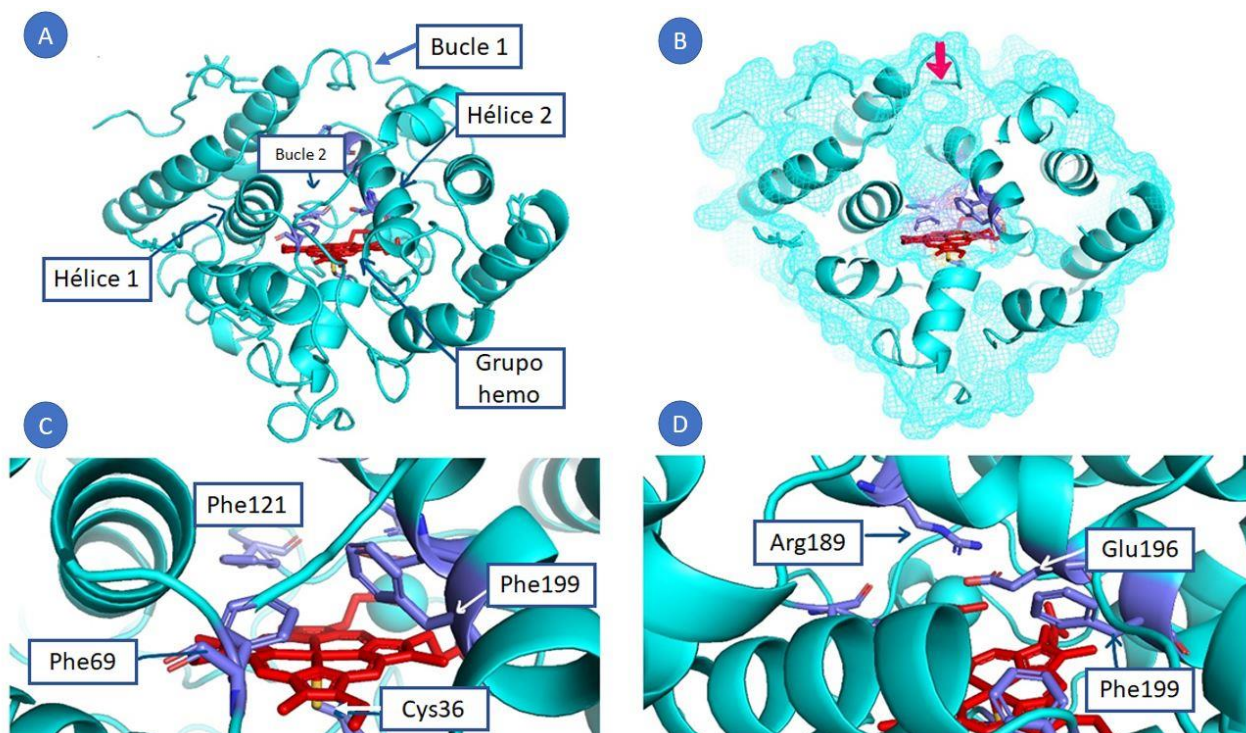


Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* (variante PaDa-I). El canal de acceso del sustrato al sitio activo (grupo hemo, en rojo) está delimitado por dos hélices y dos asas (A y B). Alrededor del grupo hemo hay tres fenilalaninas que ayudan a orientar el sustrato hacia el hierro (C). Un par ácido-base (Glu196-Arg189) participa en la ruptura del peróxido de hidrógeno (D).

Ciclo catalítico

La AaeUPO cataliza reacciones típicas de las peroxidasas (v.g., oxidación de fenoles), y también reacciones de hidroxilación de compuestos aromáticos, al igual que los citocromos P450 (Hofrichter y Ullrich, 2014). Además, en ciertas condiciones, presenta actividad catalasa

y halogenasa. El tipo de reacción depende de los sustratos presentes y del pH (ácido para reacciones de halogenación, ácido o neutro para reacciones de oxidación y peroxigenación). El ciclo catalítico de esta enzima se esquematiza en la Figura 4. La enzima en su estado basal contiene un ion férrico (Fe^{III}). El primer paso en el ciclo catalítico es la interacción del peróxido de hidrógeno con el grupo hemo (Figura 4, ruta 1). Tras el rompimiento heterolítico del enlace O-O del peróxido de hidrógeno, se forma un intermediario oxidante llamado Compuesto I, el cual es un catión radical oxoferrilo ($[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^+$) (Wang *et al.*, 2012).

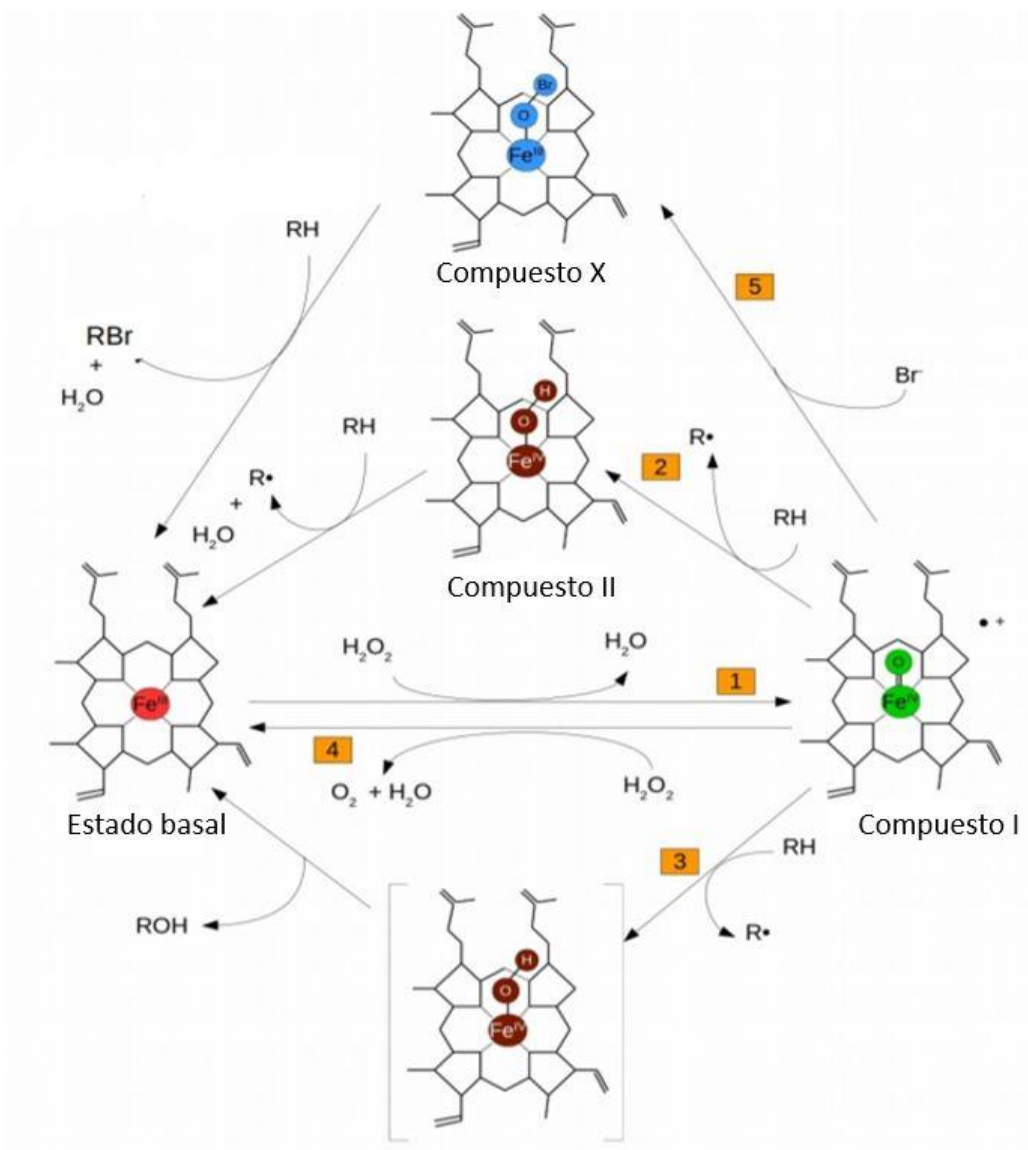


Figura 4. Ciclo catalítico de la AaeUPO. Formación del Compuesto I (1); ruta clásica de peroxidasa (2); ruta de peroxigenación (3); actividad catalasa o de rompimiento del peróxido de hidrógeno (4); vía de halogenación (5).

Si se está llevando a cabo una reacción de oxidación que involucra a un solo electrón (v.g., oxidación de un compuesto fenólico), el Compuesto I reacciona con el sustrato y forma el Compuesto II, que es un oxoferrilo protonado ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{—O—H}$) (Wang *et al.*, 2012) (Figura 4, ruta 2); el sustrato oxidado se convierte en un radical libre fenoxilo que puede reaccionar con otros radicales libres para formar dímeros y polímeros u oxidar a otra molécula (Reihmann y Ritter, 2006). El Compuesto II puede reaccionar con otra molécula de sustrato para regresar al estado basal (Dunford, 1999). Por otra parte, si se trata de una reacción de hidroxilación (v.g., ciclohexano), se cree que el Compuesto I hidroxila un compuesto orgánico (R-H) mediante la sustracción de un hidrógeno con el subsecuente rebote de un equivalente de $\cdot\text{OH}$ (Peter *et al.*, 2011). Así, la enzima regresa a su estado basal y se libera el producto hidroxilado (R-OH) (Figura 4, ruta 3). En ausencia de un sustrato reductor, la enzima puede romper el peróxido de hidrógeno mediante su actividad de catalasa (Figura 4, ruta 4). Finalmente, en presencia de un halógeno (cloruro o bromuro), la enzima puede halogenar un sustrato mediante la formación de un hipohaluro (Figura 4, ruta 5).

Factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de las hemo-peroxidasas

La capacidad oxidante de una enzima se refiere a si es posible que ocurra la oxidación de un sustrato específico y qué tan eficientemente lo hace. Podemos clasificar estos factores en dos grandes grupos: (1) reactividad del sitio activo y (2) topografía de este.

Avidez por los electrones: el potencial redox

Uno de los factores moleculares más importantes que determinan la capacidad oxidante de las peroxidasas es el potencial redox (E°) (Ayala, 2010). El E° es la tendencia de una molécula a

reducirse. En principio, una enzima no puede oxidar sustratos de mayor potencial redox que el de sus especies catalíticas (i.e., Compuesto I y Compuesto II).

El E° de las peroxidasas está modulado a su vez por una serie de factores que tienen que ver con el ambiente químico que rodea al hierro (Cusanovich *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1989). La identidad y el ambiente del ligante proximal al hierro determinan en gran medida su reactividad. El concepto básico que rige estas interacciones es la capacidad electrodonadora del ligante. En muchas hemo-peroxidasas, el ligante proximal es una histidina que forma un puente de hidrógeno con un aspartato cercano; esto le confiere un mayor carácter electrodonador. Mutantes His→Gln no pueden formar este puente de hidrógeno, lo que ocasiona que el carácter electrodonador del ligante disminuya, por lo que el hierro se encuentra más deficiente de electrones y esto se refleja en un mayor E° (Choudhury *et al.*, 1994).

Por otra parte, el ambiente alrededor del ligante puede modular su carácter electrodonador. Por ejemplo, en el caso de las hemo-peroxidasas de plantas, el ligante proximal de histidina se encuentra rodeada de residuos cargados negativamente, mientras que en el caso de la *LfuUPO* y los citocromos P450 la cisteína está rodeada de cargas positivas (Poulos, 1996). Se ha propuesto que este ambiente positivo alrededor de la cisteína es un factor que reduce el carácter electrodonador del grupo tiolato, lo que se refleja en un mayor E° para las hemo-tiolato-peroxidasas con respecto a las peroxidasas «clásicas» (histidina como ligante).

El grado de exposición del hierro al solvente también contribuye al E° de la enzima. Un grupo hemo muy expuesto al solvente tendrá un ambiente más polar que uno que se encuentra más alejado y protegido en el interior de la enzima; el ambiente polar estabiliza al ion férrico, lo que

ocasiona una disminución en el potencial redox (Kasner, 1973; Shifman *et al.*, 2000). En ese sentido, las interacciones electrostáticas provenientes de los residuos de aminoácidos de la proteína en la vecindad del grupo hemo tienen un efecto similar (Zheng y Gunner, 2009). Por ejemplo, en una hemo-proteína sintética, la presencia de un glutamato (carga negativa) en sustitución de una leucina (apolar) estabiliza al ion férrico y el E° disminuye; al quitar una carga negativa en otra posición (Glu→Gln) el ion férrico se desestabiliza y aumenta el E° (Shifman *et al.*, 2000). En suma, el E° de las peroxidasas está modulado por una serie de factores (ligante proximal, interacciones electrostáticas y exposición al solvente), que estabilizan o desestabilizan al ion férrico, lo cual se refleja en su avidez por los electrones, y por lo tanto en su capacidad oxidante.

Un ejemplo de cómo influye el E° sobre la capacidad oxidante de las peroxidasas se encuentra en las reacciones de oxidación que involucran a un solo electrón. Se sabe que la diferencia de E° entre la enzima y sustratos como fenoles y anilinas está relacionada con la eficiencia catalítica de las peroxidasas (Xu, 1996; Ayala *et al.*, 2007), siguiendo la teoría de Marcus de transferencia de electrones de capa externa (Marcus, 1956). Por ejemplo, la peroxidasa de rábano blanco tiene un E° del par Compuesto II/Fe^{III} de 0.89 V; la actividad específica de la enzima con un sustrato de bajo E° como el 4-metoxifenol (0.72 V) es de 52,742.6 min⁻¹, mientras que con uno de alto E° como el 4-hidroxibenzonitrilo (1.17 V) es tan solo de 109.0 min⁻¹ (Ayala *et al.*, 2007).

La *LfuUPO* es considerada una peroxidasa de alto E° (Compuesto I/Fe³⁺, 1.3 V) y se le ha atribuido su gran versatilidad catalítica a esta característica (Green *et al.*, 2004). El E° del Compuesto I de la *AaeUPO* se ha estimado en 1.4 V (Wang *et al.*, 2013). Si tanto la *LfuUPO*

como la *AaeUPO* tienen un E° similar, ¿por qué la *AaeUPO* sí es capaz de oxidar eficientemente enlaces C-H poco reactivos (por ejemplo, los del anillo aromático del tolueno), y la *LfuUPO* no? Otros factores moleculares podrían estar determinando la capacidad oxidante de la *AaeUPO*.

Avidez por el átomo de hidrógeno: basicidad del compuesto II

La basicidad del Compuesto II podría ser un factor molecular importante en la capacidad oxidante de las peroxidases. Se ha demostrado que el Compuesto II en la *LfuUPO* está protonado ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{—O—H}$), a diferencia de otras peroxidases que tienen un Compuesto II del tipo $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ (Green *et al.*, 2004). Este Compuesto II tiene la misma estructura que el intermediario que se forma durante la hidroxilación de compuestos orgánicos (Figura 4). Se ha propuesto que la basicidad del Compuesto II está relacionada con la capacidad oxidante de la enzima (Green *et al.*, 2004). Los autores consideran que la fuerza del enlace O-H del Compuesto II es un buen indicador de esta capacidad. Se puede determinar la energía del enlace mediante la siguiente ecuación (Mayer, 1998):

$$D(\text{O-H}) = 23.06 E^\circ_{(I)} + 1.37 \text{p}K_{a(II)} + 57 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$$

donde $E^\circ_{(I)}$ es el potencial redox del Compuesto I y $\text{p}K_{a(II)}$ es el $\text{p}K_a$ del Compuesto II. El $\text{p}K_{a(II)}$ de la *LfuUPO* se ha estimado en 8.2 (Green *et al.*, 2004). Con base en esta ecuación, determinaron que la energía del enlace $D(\text{O-H})$ de la enzima era de $98 \pm 4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este valor de energía se puede relacionar con la energía del enlace C-H de un carbono bencílico (90 kcal mol^{-1}), y se observa que la energía del enlace O-H es mayor que la del enlace C-H del sustrato, lo cual permite que ocurra la hidroxilación. Al realizar este mismo análisis para la

peroxidasa de rábano blanco (HRP), se obtuvo una energía de enlace O-H de 84 kcal mol^{-1} , lo cual concuerda con la evidencia experimental de que la HRP no es capaz de hidroxilar carbonos bencílicos (Green *et al.*, 2004). De hecho, el $pK_{a(\text{II})}$ estimado para la HRP es tan solo de 3.5. Para poder realizar una reacción de hidroxilación, se tendría que aumentar el potencial redox del Compuesto I de la HRP de 0.97 V a 1.6 V para compensar el bajo $pK_{a(\text{II})}$. Así, los autores concluyen que la basicidad del Compuesto II (propiedades del intermediario catalítico que se forma durante la hidroxilación) es otro de los factores moleculares importantes que determinan la capacidad oxidante de una peroxidasa.

¿Pero por qué el $pK_{a(\text{II})}$ de la *LfuUPO* es tan alto? Se ha demostrado que el ligante proximal al hierro modula este carácter básico (Rydberg *et al.*, 2004; Udit y Gray, 2005). En la HRP y en la mayoría de las peroxidasas este ligante es una histidina (Battistuzzi *et al.*, 2010); en el caso de la *LfuUPO* (y de la *AaeUPO*), el ligante es una cisteína. Esta cisteína de carácter aniónico es un buen electrodonador para el hierro, y al tener una mayor densidad electrónica favorece la basicidad del hierro. Por otra parte, la distancia del enlace cisteinato-hierro (S^--Fe) es importante, ya que esto se relaciona directamente con la densidad electrónica que se puede donar al hierro; si la distancia es pequeña, el hierro tendrá una mayor densidad electrónica (Veitch, 2004). De hecho, experimentalmente se ha determinado que la distancia S^--Fe en el Compuesto II de la *LfuUPO* es menor (2.39 \AA) que en el Compuesto I (2.7 \AA), lo cual concuerda con un mayor carácter básico del hierro durante la sustracción del hidrógeno en las reacciones de hidroxilación (Green *et al.*, 2004). Así, la capacidad oxidante de la *AaeUPO* podría modularse aumentando la basicidad del Compuesto II mediante la modificación de la distancia entre el grupo tiolato de la Cys36 y el hierro. De acuerdo con los datos cristalográficos de la *LfuUPO* y la *AaeUPO* en el estado basal, la distancia $\text{S}-\text{Fe}$ es similar en ambas enzimas (2.4

Å y 2.3 Å, respectivamente) (Sundaramoorthy *et al.*, 1995; Piontek *et al.*, 2013), lo cual podría estar relacionado directamente con la basicidad del Compuesto II de la *AaeUPO*. En suma, la reactividad del Compuesto I (que es la principal especie catalítica con la que interaccionan los sustratos) podría estar modulada por una combinación entre el E° (afinidad por los electrones) y por la basicidad del Compuesto II (afinidad por los protones).

El tamaño, la forma y la composición del canal del hemo: el papel de la topografía

La topografía del sitio activo podría ser también un factor importante para que ocurra la oxidación eficiente de los sustratos. Esto implica no solo el tamaño del canal de acceso a los sustratos, sino también su composición. La mayoría de las peroxidasas no son capaces de hidroxilar enlaces C-H (Conesa *et al.*, 2002). Las peroxidasas generalmente oxidan sustratos mediante la sustracción de un electrón (v.g., oxidación de fenoles), en lugar de llevar a cabo procesos de que involucran dos electrones, como en el caso de la reacción de hidroxilación. Se ha visto que en la oxidación de fenoles (oxidaciones que involucran solo un electrón) el sustrato no requiere acercarse mucho al grupo hemo para que ocurra la oxidación, debido a que la transferencia del electrón se lleva a cabo por un efecto túnel (Berglund *et al.*, 2002). De hecho, al analizar la estructura tridimensional de la HRP (una peroxidasa clásica) se observa que no existe una cavidad como tal en la enzima donde el sustrato pueda meterse. Mediante experimentos que utilizan una fenilhidrazina (un sustrato que al oxidarse forma aductos rápidamente con el grupo hemo), se ha observado que la oxidación se favorece a través de uno de los bordes de la porfirina que está relativamente expuesto al solvente (Ortiz De Montellano, 1992); un residuo de fenilalanina podría ser el responsable de restringir el acceso directo hacia el grupo hemo en las peroxidasas de plantas (Schuller *et al.*, 1996). Por el contrario, en la *LfuUPO* y en la *AaeUPO* sí se puede observar una cavidad como tal en la

enzima, y por experimentos con peróxido de hidrógeno marcado isotópicamente en el oxígeno, se ha demostrado que el oxígeno que se inserta en el sustrato proviene del peróxido (Kinne *et al.*, 2009). Esto implica que el sustrato debe de acercarse lo suficiente al grupo hemo para que ocurra la transferencia del átomo de oxígeno y, en consecuencia, la hidroxilación del sustrato. Por consiguiente, las dimensiones del canal de acceso juegan un papel importante en la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima. Al analizar el diámetro de las cavidades de estas enzimas, se observa que la *AaeUPO* tiene una cavidad más amplia que la *LfuUPO* (~9.0 Å y ~7.4 Å, respectivamente) (Sundaramoorthy *et al.*, 1995) (Piontek *et al.*, 2013). Esto podría ser un factor importante que facilita que la *AaeUPO* tenga una mayor capacidad oxidante que la *LfuUPO* y las demás peroxidasas clásicas.

El segundo aspecto del factor topográfico es la constitución del canal de acceso. Esto está relacionado directamente con el posicionamiento adecuado del sustrato en la cavidad, pues es un requisito para que la reacción ocurra eficientemente (Smith y Veitch, 1998). En la *LfuUPO*, se ha propuesto que la presencia de dos residuos de fenilalanina (Phe103 y Phe186), contribuyen al acomodo de sustratos como la ciclopentanodiona. Cuando interacciona con el sitio activo, este sustrato queda flanqueado por los dos residuos de fenilalanina a una distancia de 3.5 Å de cada uno. La Phe103 sufre un ligero cambio conformacional (~0.5 Å) cuando se forma el complejo enzima-sustrato con respecto a la conformación en el estado basal (Kühnel *et al.*, 2006). La importancia de otros residuos en la cavidad de la *LfuUPO* se ha demostrado mediante mutagénesis sitio-dirigida. Una mutante N74V muestra una mayor actividad (10 veces más en cuanto a actividad de epoxidación) hacia sustratos no polares, como el estireno. La Asn74 se encuentra a 5.1 Å de la Phe103; la presencia de un residuo no polar (Val) en este sitio podría estar favoreciendo la interacción de sustratos no polares en el sitio activo (Jiang,

2012). Esta mutante tuvo una disminución mayor al 90% de la actividad halogenasa y catalasa, lo cual se le puede atribuir a una disminución en la polaridad del sitio activo. En este mismo trabajo, Jiang (2012) demostró que la mutación H105A, cuyo residuo se encuentra en la zona distal de la cavidad del grupo hemo, le daba la capacidad a la enzima de transformar derivados del estireno con cadenas laterales más grandes, como el trans- β -metilestireno. El cambio podría deberse a que se genera un espacio mayor en la cavidad al sustituir la histidina por la alanina, además de que esta última es un residuo menos polar que la histidina, lo cual favorece la interacción con sustratos no polares. En otro trabajo se obtuvo una mutante F103A de la *LfuUPO* que presentó una actividad de epoxidación 10 veces mayor con el estireno, además de que la mutante era capaz de transformar sustratos con cadenas laterales más grandes, como el etilestireno (Wang, 2011). En el caso de la *AaeUPO*, la enzima posee residuos en posiciones equivalentes a las de la *LfuUPO* que podrían modular la actividad. Por ejemplo, las Phe121, Phe69 y Phe199 se encuentran en la vecindad del grupo hemo y tienen un papel importante en la interacción con los sustratos (Piontek *et al.*, 2013). Además, el Asp70 y la Ser240 se encuentran cerca de las Phe69 y Phe199, a 6.5 y 4.9 Å, respectivamente. En cuanto a la posición que ocupa la His105 en la *LfuUPO*, en la *AaeUPO* se encuentra una Arg que cumple el papel de estabilización de la carga durante la formación del Compuesto I.

PaDa-I: un modelo para estudiar la capacidad oxidante de una peroxigenasa

¿Cómo podemos estudiar el papel de residuos específicos en la *AaeUPO*? Esta enzima ha sido expresada heterológicamente en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta variante recombinante (conocida como PaDa-I) es producto de un proceso de evolución dirigida que permite su expresión funcional y se pueden obtener hasta 8 mg de enzima por litro de cultivo (Molina-Espeja *et al.*, 2014). Esto es sumamente útil para poder realizar mutaciones sitio-dirigidas que

permitan estudiar la relación estructura-función de la enzima. La variante evolucionada adquirió cuatro mutaciones en el péptido señal (F12Y, A14V, R15G y A21D) y cinco mutaciones en el péptido maduro (V57A, L67F, V75I, I248V y F311L). Estas mutaciones se encuentran alejadas del sitio activo y tras una caracterización cinética se observó que conserva las mismas propiedades catalíticas que la enzima parental, por lo que es un buen modelo para estudiar el funcionamiento de estas enzimas (Molina-Espeja *et al.*, 2014).

Una inspección visual de la estructura cristalográfica de PaDa-I (PDB: 5OXU) muestra el canal que conecta el lado distal del grupo prostético hemo con el seno de la solución (Figura 5). Entre los residuos que conforman este canal, se pueden identificar claramente dos residuos de fenilalanina que orientan su cadena lateral hacia el canal: Phe76 y Phe191, ubicados a 10 Å y 14 Å del hierro del grupo hemo, respectivamente (Figura 5).

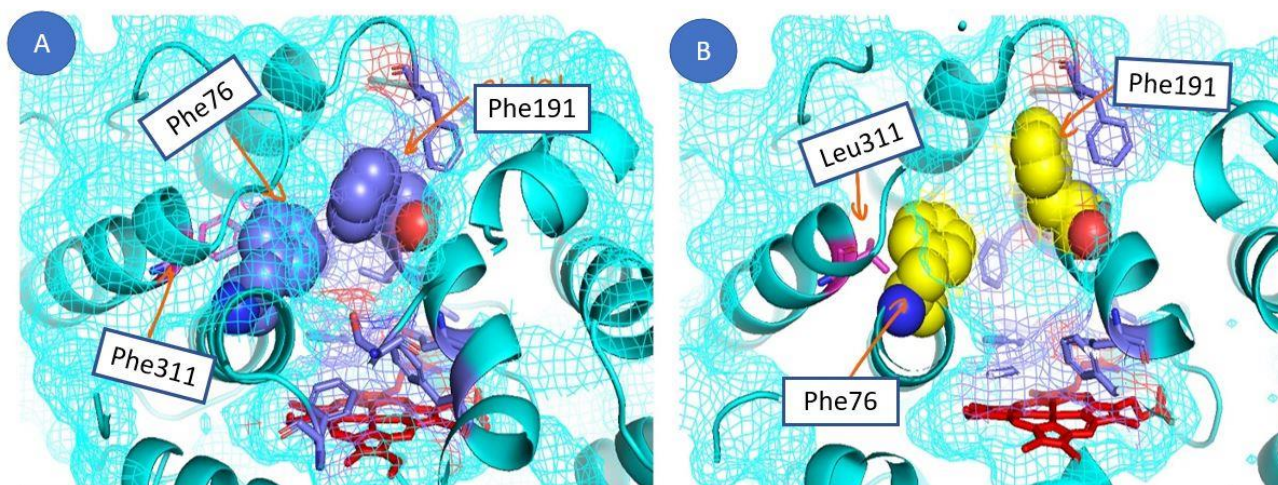


Figura 5. Disposición de los residuos Phe76 y Phe191 en la UPO silvestre de *A. aegerita* (A) y en la variante evolucionada PaDa-I (B). PDB: 2YOR (silvestre), 5OXU (PaDa-I). Se muestra el grupo hemo en rojo y el residuo 311 en rosa.

Se ha sugerido que estos residuos regulan la entrada de sustratos al canal y pueden limitar el tamaño de los sustratos que pueden acceder al sitio activo (Piontek *et al.*, 2013). Por lo tanto, sugieren los autores, la *AaeUPO* no oxida los sustratos voluminosos, como el pentaceno y el fluoreno del grupo de los PAH, probablemente porque no pueden acomodarse cerca del grupo

hemo, según las simulaciones de acoplamiento molecular (Piontek *et al.*, 2013). De acuerdo con los datos cristalográficos, el residuo Phe191 es más flexible en la variante PaDa-I, con respecto a la *AaeUPO* silvestre, debido al efecto de la mutación F311L; aparentemente, la cadena lateral más pequeña de Leu desplaza la cadena lateral de Phe76 y esto debilita la interacción con Phe191 (Ramírez-Escudero *et al.*, 2018). Una pregunta que surge es si es posible modular la actividad de la enzima al mutar estos residuos. ¿Qué ocurriría si sustituimos estas fenilalaninas por residuos más pequeños? ¿Será posible oxidar sustratos más grandes? ¿O estos residuos son esenciales para mantener la estructura del canal? En este trabajo se abordaron estas preguntas mediante mutación sitio-dirigida y dinámica molecular.

3. Hipótesis

La capacidad oxidante de la *AaeUPO* es mayor que la de otras peroxidasas porque está modulada principalmente por la topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo.

4. Objetivos

Objetivo general

Estudiar el papel de la topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo y de factores como el potencial redox y la basicidad del Compuesto II de la *AaeUPO* en la modulación de su actividad peroxigenasa.

Objetivos particulares

1. Diseñar mutantes de *AaeUPO* que tengan una alteración en su potencial redox, basicidad y topografía.
2. Estudiar el comportamiento dinámico de los residuos que conforman el canal de acceso del sustrato al sitio activo.

3. Evaluar el efecto de los cambios en la topografía y otras propiedades de la enzima con relación a la eficiencia catalítica.
4. Proponer un modelo del papel de la topografía del sitio activo en la modulación de la capacidad oxidante de las peroxigenasas.

5. Métodos computacionales y experimentales

Métodos computacionales

Preparación del sistema

El modelo de partida utilizado fue el de la peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita*, variante PaDa-I, el cual se encuentra depositado en la base de datos del Protein Data Bank bajo el código de identificación 5OXU. El modelo se preparó en el software Schrödinger Maestro 9.8 (versión 2014-2) con la herramienta Protein Preparation Wizard. Las glicosilaciones y moléculas de agua originales fueron omitidas del modelo. El estado de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos se asignó manualmente, pero tomando en cuenta los valores de pKa predichos por el servidor PropKa 3.0. Así, todos los ácidos glutámicos y aspárticos se modelaron desprotonados, a excepción del Asp85. Los residuos de histidina se protonaron en el nitrógeno δ (solo la His82 se protonó en ϵ), y las His118 y His251 se protonaron en ambos nitrógenos. El estado basal de la enzima se modeló con un grupo hemo con un ion de hierro en estado de oxidación +3. Las variantes de PaDa-I (F76A, F76L, F191A, F76A/F191A y F76L/F191A) se generaron con la herramienta Build Fragments que se encuentra en el software Maestro antes mencionado. Posteriormente se añadió un modelo de solvente explícito con condiciones periódicas de frontera. El modelo de solvente utilizado fue el SPC (moléculas de agua explícitas) y se seleccionó un tipo de caja cúbica de 10 Å a partir de la superficie de la proteína. El sistema se neutralizó con 4 iones de

sodio. Los distintos modelos fueron minimizados con el programa Desmond a través de un *steepest descent* con un criterio de convergencia de 0.01 kcal/mol/Å. Las interacciones coulómbicas se calcularon con un radio de corte de 12 Å.

Simulaciones de dinámica molecular

Para estas simulaciones se utilizaron los sistemas preparados en el estado basal de PaDa-I y las mutantes F76A, F76L, F191A, F76A/F191A y F76L/F191A. La dinámica molecular se corrió con el programa Desmond en la supercomputadora Miztli de la UNAM. El tiempo de simulación fue de 50 ns utilizando el campo de fuerza OPLS_2005. Se simuló un ensamble NPT (número de átomos, presión y temperatura constantes). La temperatura de simulación se mantuvo en 300 K con la ayuda de un termostato Berendsen y la presión se controló con el algoritmo Berendsen a 1 atm. Las ecuaciones de movimiento se resolvieron con el integrador RESPA con un intervalo de 2 fs. Las interacciones de corto alcance tuvieron un radio de corte de 12 Å, mientras que el componente coulóbico se modeló utilizando el método de *particle-mesh* Ewald con una tolerancia de 10^{-9} . Las distancias atómicas y los movimientos de residuos fueron analizados con el programa de visualización molecular VMD. Los residuos que conforman el canal del hemo son los siguientes: Phe69, Asp70, Gln72, Ala73, Phe76, Ala77, Thr78, Ala80, Ala81, Phe121, Phe188, Arg189, Phe191, Thr192, Glu196, Phe199, Leu203, Ser240, Phe274, Ala316, Ala317.

Métodos experimentales

Plásmidos pJRoC30-PaDaI y pJRoC30-PM1

Los plásmidos pJRoC30-PaDaI y pJRoC30-PM1 fueron facilitados amablemente por el Dr. Miguel Alcalde del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del Consejo Superior de

Investigación Científica con sede en Madrid, España. Estos plásmidos contienen un marcador de selección de resistencia a ampicilina y un promotor inducible con galactosa. Estos plásmidos pueden utilizarse para transformar *E. coli* y *S. cerevisiae*. El plásmido pJRoC30-PM1 contiene un gen que codifica para una lacasa inactiva y el plásmido pJRoC30-PaDal (11,577 bp), contiene el gen de la peroxigenasa inespecífica de *A. aegerita*, pero con las cinco mutaciones necesarias para su expresión funcional en levadura (V57A, L67F, V75I, I248V, F311L); además, contiene cuatro mutaciones en el péptido señal nativo de *A. aegerita* (F12Y, A14V, R15G, A21D). Esta variante es la que se conoce como PaDa-I.

Linearización del plásmido pJRoC30-PM1 y purificación

El plásmido pJRoC30-PM1 (10 µg) se digirió con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de las enzimas (New England Biolabs). El producto de digestión se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se realizó una electroforesis a 4°C con un voltaje de 50 V durante 2 h. Una parte del gel se tiñó con el colorante GelRed (Biotium) para usarlo como referencia para localizar la banda correspondiente al peso molecular del plásmido linearizado. La banda de ~10 kbp se cortó y se fragmentó. Cada fragmento de la banda fue purificado mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up de Macherey Nagel. Se cuantificó la cantidad de DNA en el equipo Infinite 200 NanoQuant de Tecan.

Mutagénesis sitio-dirigida de pJRoC30-PaDal

Se diseñaron cebadores de aproximadamente 40 bp que contienen un cambio en un codón específico y se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) usando el plásmido pJRoC30-PaDal como templado. La reacción se realizó en 50 µL e incluyó los siguientes

cebadores:

PCR1

F76A Dir Tm 68.2°C

C-GAC-AAT-CAA-GCC-GCA-ATC-GCT-GCC-ACA-TAT-GCG-GCC-CAC-C

RMLC Tm 58.1°C

GCTTACATTACGCCCTCCC

Tamaño esperado: 855 pb

PCR2

F76A Rev Tm 68.2°C

G-GTG-GGC-CGC-ATA-TGT-GGC-AGC-GAT-TGC-GGC-TTG-ATT-GTC-G

RMLN Tm 51.8°C

CCT-CTA-TAC-TTT-AAC-GTC-AAG-G

Tamaño esperado: 425 pb

F191A Dir Tm 66.5°C

CC-TTT-GTT-GAC-TTT-AGG-TTC-GCT-ACT-GCT-TAC-GGC-GAG-ACC-ACC

Tamaño esperado: 511 bp

F191A Rev Tm 66.5°C

GGT-GGT-CTC-GCC-GTA-AGC-AGT-AGC-GAA-CCT-AAA-GTC-AAC-AAA-GG

Tamaño esperado: 772 bp

S240A Dir Tm 73.7°C

C-GAT-TTC-TTC-CGC-GCA-CCC-AGC-CCG-AGA-GCT-GGC-ACA-GGA-GTC-G

Tamaño esperado: 372 bp

S240A Rev Tm 73.7°C

C-GAC-TCC-TGT-GCC-AGC-TCT-CGG-GCT-GGG-TGC-GCG-GAA-GAA-ATC-G

Tamaño esperado: 911 bp

T192V Dir Tm 66.3°C

GAC-TTT-AGG-TTC-TTT-**GTT**-GCT-TAC-GGC-GAG-ACC-ACC-TTC-C

Tamaño esperado: 503 bp

T192V Rev Tm 66.3°C

G-GAA-GGT-GGT-CTC-GCC-GTA-AGC-**AAC**-AAA-GAA-CCT-AAA-GTC

Tamaño esperado: 776 bp

L39 SatDir Tm 69.2°C

CGT-GGA-CCT-TGC-CCT-GGT-**NNS**-AAT-ACT-CTG-GCA-TCT-CAC-G

Tamaño esperado: 965 bp

L39 SatRev Tm 69.2°C

C-GTG-AGA-TGC-CAG-AGT-ATT-**SNN**-ACC-AGG-GCA-AGG-TCC-ACG

Tamaño esperado: 314 bp

Las PCR contuvieron los siguientes componentes (Tabla 1):

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR para generar las mutantes de PaDa-I

Componente	Stock	Volumen	Concentración final
Agua		37 µL	
DNA templado	300 ng/µL	0.333 µL	2 ng/µL
RMLC/RMLN	10 µM	1.25 µL	250 nM
CebadorDir/ CebadorRev	10 µM	1.25 µL	250 nM
dNTPs	40 mM	1.25 µL	1 mM
DMSO	50 % v/v	3 µL	3 % v/v
Buffer Pfu Ultra	10 x	5 µL	1 x
Polimerasa Pfu Ultra	2.5 U/µL	1 µL	0.05 U/µL

La reacción se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: un tiempo de desnaturalización de 2 min a 95°C, un tiempo de alineamiento de 1 min a una temperatura de entre 50 y 55 °C, y un tiempo de extensión de 1 min a 72°C. Este proceso se repitió por 30 ciclos. Finalmente, se dejó un tiempo final de extensión de 10 min a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V durante 1 h. Las bandas del tamaño esperado se cortaron y se purificaron con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up de Macherey Nagel. Se cuantificó la cantidad de DNA en el equipo Infitine 200 NanoQuant de Tecan.

Preparación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*

Se colocó un cultivo de 20 mL de *S. cerevisiae* BJ5465 en medio YPD (Extracto de levadura, glucosa y bactopectona), con 25 mg/L de cloranfenicol a 30°C con agitación de 250 rpm durante 2 días. Después, se realizó un refresco en 100 mL de YPD+cloranfenicol a una densidad óptica (600 nm), de 0.3. Luego de 6 h, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de entre 1.0-1.2, se centrifugaron las células durante 5 min a 5,000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con agua MiliQ estéril. Se quitó el agua y se resuspendieron las células en 1 mL de la solución amortiguadora de transformación del Yeast Transformation Kit de Sigma. Las células competentes se guardaron un día a 4°C.

Transformación de *S. cerevisiae*

En un microtubo de 1.5 mL, se colocaron 10 µL de DNA de testículo de salmón (Yeast Transformation Kit de Sigma), 100 ng del plásmido pJR0C30-PM1 linearizado, 200 ng del

producto de PCR Directo, 200 ng del producto de PCR Reverso, 100 μ L de células competentes y 600 μ L del amortiguador de plaqueo del kit de transformación. Se incubaron los tubos a 30°C durante 30 min con agitación de 700 rpm. Posteriormente, se añadieron 71 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubaron los tubos durante 15 min a 42°C. Inmediatamente después, se colocaron los tubos en hielo durante 2 min. Después, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 3 s. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 μ L de agua MiliQ estéril. Se plaquearon 100 μ L en cada caja con medio sólido sintético completo, conocido como SC (Synthetic Complete, en inglés). Este medio se utilizó para seleccionar las colonias recombinantes que sí estaban transformadas con el plásmido pJRoC30, que le confiere la capacidad de sintetizar su propio uracilo a *S. cerevisiae*. Las células sin transformar no crecen, ya que requieren que se les suplemente el uracilo en el medio.

Para preparar el medio SC se siguió el siguiente protocolo (Tabla 2):

Soluciones *stock*

- Medio YNB (Yeast Nitrogen Base) al 6.7% (67 g/L). Esterilizado por filtración.
- Suplemento de aminoácidos sin uracilo 10x (19.2 g/L). Esterilizado por filtración.
- Glucosa al 20% (200 g/L). Esterilizado por filtración.
- Cloranfenicol 25 g/L en etanol. Esterilizado por filtración.

Tabla 2. Preparación del medio sólido SC.

Componente	100 mL	250 mL	500 mL	1 L	Concentración final
Bacto agar	2 g	5 g	10 g	20 g	20 g/L
Medio YNB	10 mL	25 mL	50 mL	100 mL	6.7 g/L

Suplemento de aminoácidos	10 mL	25 mL	50 mL	100 mL	1.92 g/L
Glucosa	10 mL	25 mL	50 mL	100 mL	20 g/L
Cloranfenicol	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL	1 mL	25 mg/L
Agua MiliQ	70 mL	175 mL	350 mL	700 mL	

Se esterilizó en autoclave solo la mezcla de agua con agar durante 15 min a 121°C.

El resto de los componentes se esterilizaron por filtración y se añadieron una vez que el agar se enfrió a ~55-60°C. Se prepararon inmediatamente las cajas Petri con 30 mL/placa. Una vez que se plaquearon las células, las cajas se dejaron en incubación durante 3 días a 30°C.

Selección de colonias y cultivo en microplacas

Las colonias individuales recombinantes fueron picadas con palillos estériles y se colocaron en microplacas de 96 pocillos. Cada pocillo contuvo 210 µL de medio mínimo de expresión, el cual tiene, entre otros componentes, galactosa como inductor de la expresión del gen de la AaeUPO, magnesio como ion necesario para el funcionamiento de la enzima, y etanol para facilitar la secreción de la proteína. Cada pocillo contuvo los siguientes componentes (Tabla 3):

Tabla 3. Preparación del medio mínimo de expresión.

Componente	Stock	Volumen (µL)	Concentración final
Agua		123.69	
Buffer fosfato potásico pH 6	1 M	12.6	60 mM
Yeast Nitrogen Base	67 g/L	21	6.7 g/L

Suplemento de aminoácidos	de 19.2 g/L	21	1.92 g/L
MgSO ₄	100 mM	4.2	2 mM
Galactosa	20% m/v	21	2%
Etanol	100%	6.3	3%
Cloranfenicol	25 mg/mL	0.21	25 µg/mL

Las microplacas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 30°C durante 3 días a 200 rpm con 80% de humedad.

Medición de la actividad en microplaca

Las microplacas se centrifugaron durante 15 min a 3,500 rpm a 4°C. Se transfirió un volumen de 20 µL de manera automatizada por un equipo Freedom EVO de Tecan de las microplacas a unas nuevas. Se midió la actividad enzimática de los extractos con diferentes sustratos. La actividad con ABTS se determinó de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Mezcla de reacción para la medición de actividad enzimática con ABTS en microplaca.

Componente	Stock	Volumen (µL)	Concentración final
Agua		139	
Amortiguador fosfato-citrato pH 4.0	1 M	20	100 mM
ABTS	60 mM	1	0.3 mM
H ₂ O ₂	20 mM	20	2 mM

Se midió el cambio de absorbancia a 418 nm durante 5 min de reacción.

La actividad con 5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD), un sustrato que es hidroxilado por la AaeUPO,

se midió de la siguiente manera (Tabla 5):

Tabla 5. Mezcla de reacción para la medición de actividad enzimática con NBD en microplaca.

Componente	Stock	Volumen (μL)	Concentración final
Amortiguador fosfato potásico pH 7.0	100 mM	130	66 mM
H ₂ O ₂	20 mM	10	1 mM
5-nitro-1,3-benzodioxol	5 mM en acetonitrilo	40	1 mM

Se midió el cambio de absorbancia a 425 nm durante 5 min de reacción.

La actividad enzimática con naftaleno, un compuesto que es epoxidado por la *AaeUPO*, se midió de la siguiente manera (Tabla 6):

Tabla 6. Mezcla de reacción para la medición de actividad enzimática con naftaleno en microplaca.

Componente	Stock	Volumen (μL)	Concentración final
Agua		130	
Amortiguador fosfato potásico pH 7.0	1 M	20	100 mM
H ₂ O ₂	20 mM	10	1 mM
Naftaleno	5 mM en acetonitrilo	20	0.5 mM

Se midió la absorbancia inicial de la mezcla a 520 nm. Después de 10 min de reacción se añadieron 20 μL del reactivo FastRed y se incubó hasta que apareció color. Se midió de nuevo la absorbancia a 520 nm.

Rescate de colonias que muestran actividad

-Cultivo para extracción de plásmido

Se tomaron 20 μ L de una colonia crecida en microplaca y se colocaron en 3 mL de medio YPD en tubos Falcon de 15 mL. Se incubaron a 30°C con agitación de 220 rpm durante 1.5 días.

-Cultivo para reservar en ultracongelador

Se tomaron 20 μ L de una colonia crecida en microplaca y se colocaron en 5 mL de medio SC en tubos Falcon de 50 mL. Se incubaron a 30°C con agitación de 220 rpm durante 1.5 días. Las células se preservaron a -80°C con 30% de glicerol.

Extracción de plásmido de las células de levadura y transformación de *E. coli*

Para obtener el plásmido de *S. cerevisiae* se siguió el protocolo del kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep I de Zymo Research. Los productos de la purificación se transformaron en células de *E. coli* quimiocompetentes. En este trabajo se utilizaron células de *E. coli* MC1069, donadas amablemente por la M. en C. Leticia Olvera, del laboratorio de la Dra. Gloria Saab (IBt-UNAM).

Purificación de plásmido de *E. coli* y cuantificación de DNA

Se purificaron los plásmidos mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up de Macherey Nagel y se cuantificó la cantidad de DNA en el equipo Infinite 200 NanoQuant de Tecan.

Producción de enzima PaDa-I y variantes en matraces

Los plásmidos purificados se utilizaron para transformar directamente *S. cerevisiae*. Se plaquearon las células transformadas en cajas de medio SC. De allí se picaron colonias individuales para colocarlas en medio líquido SC-rafinosa. Este medio se preparó de la

siguiente manera (Tabla 7):

Tabla 7. Preparación del medio SC-rafinosa para preparar a las levaduras transformadas para el medio de expresión.

Componente	Stock	Volumen	Concentración final
Agua		3.495 mL	
Yeast Nitrogen Base	67 g/L	500 µL	6.7 g/L
Suplemento de aminoácidos	19.2 g/L	500 µL	1.92 g/L
Rafinosa	20% m/v	500 µL	2%
Cloranfenicol	25 mg/mL	5 µL	25 µg/mL

Se utilizó rafinosa en lugar de glucosa para no inhibir la entrada del inductor (galactosa). El cultivo se realizó en tubos Falcon de 50 mL con 5 mL de medio de cultivo.

Se dejaron creciendo las células durante 2 días a 30°C con agitación de 220 rpm. Posteriormente, se realizó un refresco en 4 mL de SC-rafinosa a una densidad óptica (600 nm) de 0.3 y se dejó incubando en las mismas condiciones hasta que alcanzó una densidad óptica de 1.0. Se tomó 1 mL de este cultivo y se inoculó en 9 mL del Medio de Expresión con Hemoglobina (MEH) en un matraz de 250 mL. El medio MEH se preparó de la siguiente manera (Tabla 8):

Tabla 8. Preparación del medio de expresión con hemoglobina (MEH) para la producción de la AaeUPO.

Componente	Stock	Volumen	Concentración final
Agua		490 µL	
YP	1.55 x	6.45 mL	1 x

Amortiguador fosfato potásico pH 6	1 M	600 μ L	60 mM
Galactosa	20% m/v	1 mL	2%
MgSO ₄	100 mM	100 μ L	1 mM
Etanol	100%	300 μ L	3%
Hemoglobina	20 g/L	50 μ L	100 mg/L
Cloranfenicol	25 mg/mL	10 μ L	25 μ g/mL

Se incubaron los matraces a 25°C a 220 rpm durante 3-4 días, hasta que la densidad óptica no cambiara. Como alternativa a la hemoglobina, se utilizó cloruro de hierro(III) a 5 mM en el medio.

Purificación de la AaeUPO

Los matraces que mostraron actividad de peroxidasa y peroxigenasa fueron centrifugados durante 20 min a 8,000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó a 4°C con sulfato de amonio al 85%. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones y se recuperó esta vez la pastilla que quedó al fondo del recipiente. La proteína se resuspendió con 15 mL de amortiguador de succinato 10 mM pH 4.3. Se dializó contra el mismo amortiguador la muestra durante 12 h a 4°C a través de una membrana con un punto de corte de 10 kDa. Se cargó la muestra dializada en una columna que contenía la resina Macro-Prep High S (Biorad) para realizar una cromatografía de intercambio catiónico. La columna se equilibró con el amortiguador de succinato mencionado. Una vez cargada la muestra, se lavó la columna con 3 volúmenes del amortiguador. Posteriormente, se eluyó la muestra con el amortiguador de succinatos pero con una concentración de cloruro de sodio de 150 mM. Las fracciones que mostraron actividad con ABTS fueron colectadas y se concentraron por ultrafiltración (sistema

Amicon) con una membrana de punto de corte de 10 kDa. En este proceso se le realizó un cambio de amortiguador a uno a base de TRIS 10 mM pH 7.0. La muestra se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una resina Macro-Prep High Q (Biorad). La columna se lavó con 3 volúmenes del amortiguador y posteriormente se eluyó la muestra con 120 mM de cloruro de sodio. Las fracciones que mostraron actividad se colectaron, concentraron (Amicon) y se almacenaron en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0.

Ensayos de actividad enzimática en celda de 1 mL

Actividad de peroxidasa. La actividad con ABTS se midió mediante la aparición del producto de oxidación que involucra un solo electrón (un radical catiónico estable) a 418 nm (coeficiente de extinción molar: $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía H_2O_2 (2 mM) y ABTS (0.4 mM) en un amortiguador citrato/fosfato (100 mM, pH 4.4). La velocidad de reacción inicial se usó para calcular las unidades enzimáticas (la cantidad de enzima que genera 1 μmol de producto por minuto). Todas las mediciones se realizaron por triplicado en un sistema de espectroscopía UV-Visible Agilent 8453.

Actividad de peroxigenasa. El éter aromático 5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD) se utilizó como sustrato modelo para determinar la actividad de peroxigenasa. El aumento de la absorbancia del producto 4-nitrocatecol (coeficiente de extinción molar: $9,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se siguió a 425 nm en una mezcla de reacción que contuvo amortiguador de fosfato de potasio (50 mM, pH 7.0), H_2O_2 (1 mM) y NBD (5 mM). La mezcla de reacción contenía acetonitrilo (20% v / v) para solubilizar el NBD. Para la actividad de hidroxilación de naftaleno, se siguió la formación del producto principal (1-naftol) a 303 nm (coeficiente de extinción molar: $2,010 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción contuvo naftaleno (2 mM) y H_2O_2 (1 mM) en amortiguador de fosfato de potasio (50

mM, pH 7.0) con acetonitrilo (20% v / v). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Actividad catalasa. La conversión de H_2O_2 se midió mediante la disminución de la absorbancia a 240 nm (coeficiente de extinción molar: $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contuvo amortiguador fosfato de potasio (50 mM, pH 7.0) y H_2O_2 (10 mM). La reacción se inició agregando la enzima (400 nM). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se determinaron para PaDa-I y sus variantes utilizando ABTS, NBD y naftaleno. Las mezclas de reacción fueron preparadas como se mencionó en la sección anterior. Se midió la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato y los datos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten, utilizando el programa PRISM, para calcular los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m . Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Determinación del número de recambio total

El número de recambio total (TTN) es el número de moles de sustrato convertido (o moles de producto generado) por mol de enzima durante su vida útil operativa, independientemente del tiempo. En un experimento típico, el sustrato se monitoreó después de la adición de enzima y H_2O_2 . Una vez que la concentración del sustrato permaneció constante, se añadió H_2O_2 (1 mM) para evaluar si la conversión del sustrato no estaba limitada por el H_2O_2 y si la reacción se había detenido debido a la inactivación de la enzima. El TTN se calculó como la cantidad de sustrato convertido (o producto generado) dividido por la cantidad de enzima inicial añadida a la reacción. Se usó una pequeña cantidad de enzima para convertir solo una fracción del sustrato y asegurar una velocidad de reacción uniforme durante la conversión del sustrato. La

conversión del sustrato o la formación del producto se midió como se describe a continuación. El TTN se determinó en una reacción que contuvo el sustrato (naftaleno: 2 mM, antraceno y fenantreno: 250 μ M) y H₂O₂ (1 mM) en amortiguador de fosfato de potasio (50 mM, pH 7.0) con acetonitrilo (20% v / v) a 25 °C. La reacción se inició mediante la adición de enzima (10 nM). La conversión del PAH fue seguida por HPLC de fase reversa en un equipo Agilent Serie 1100 con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) usando el siguiente gradiente de acetonitrilo (ACN) en agua en % v / v: ACN: H₂O 30:70 durante 3 minutos, 7 minutos para llegar a ACN: H₂O 90:10 y luego 5 minutos a 90:10. El flujo fue de 0.4 ml min⁻¹. La absorbancia del sustrato se siguió a 250 nm y el área bajo la curva se usó para cuantificar el sustrato restante. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se realizó un ANOVA unidireccional y varias pruebas t de dos muestras suponiendo varianzas iguales ($\alpha = 0.05$) para determinar si había una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios del TTN para cada sustrato y las variantes de la enzima.

Estabilidad de las variantes enzimáticas en presencia de peróxido de hidrógeno

Cada variante enzimática (12 nM) se incubó en amortiguador de fosfato de potasio (50 mM, pH 7.0) y H₂O₂ (1 mM) a 25°C. Se extrajeron periódicamente alícuotas y se midió la actividad enzimática residual con el ensayo de actividad ABTS previamente descrito. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se ajustaron a un modelo de inactivación de primer orden para calcular la constante de inactivación, k_{inact} .

6. Resultados y discusión

La peroxigenasa inespecífica es una enzima hemo-tiolato capaz de catalizar la oxidación de una gran diversidad de moléculas orgánicas, ya sea por la vía de peroxidasa clásica (i.e., oxidación que involucra un solo electrón) o la vía de peroxigenasa (i.e., transferencia de un

átomo de oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. La capacidad oxidante de las UPO está determinada por una serie de factores moleculares, entre los que se encuentran el potencial redox del Compuesto I, la basicidad del Compuesto II, la topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo y la estabilidad operacional misma del biocatalizador. En este trabajo seguimos una estrategia que combinó herramientas computacionales y experimentales (mutagénesis sitio-dirigida) para estudiar cómo afectan algunos de estos factores la capacidad oxidante de la AaeUPO.

En un primer acercamiento al estudio de los factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de la AaeUPO, se seleccionaron dos sitios blanco de mutagénesis sitio-dirigida que podrían afectar el potencial redox del Compuesto I. Se ha propuesto que un ambiente hidrofóbico alrededor del grupo hemo favorece un incremento en el potencial redox del par Fe^{+3}/Fe^{+2} y este a su vez está relacionado con el potencial redox de los intermediarios catalíticos (Kasner, 1973; Ayala *et al.*, 2007). Tras una inspección visual del modelo tridimensional de la estructura de la UPO de *Agrocybe aegerita* (PDB: 2YOR), la Ser240 y Thr192 se seleccionaron por su localización en el canal de acceso del sustrato al sitio activo (a 11.1 y 8.5 Å del hierro, respectivamente) y por su naturaleza polar (Figura 6).

Otros residuos polares en el canal son Asp70 (13.0 Å), Asn72 (13.6 Å), pero estos se encuentran a mayor distancia del hemo y su efecto sobre este podría no ser significativo. Por otro lado, los residuos Glu196 (5.9 Å) y Arg189 (8.8 Å) se encuentran a una menor distancia, pero no fueron elegidos para la mutagénesis por tener un papel fundamental en la ruptura del peróxido de hidrógeno para formar el Compuesto I. Un caso especial de discusión es la Thr78, pues se encuentra a 8.9 Å del hierro, pero se localiza en el mismo plano horizontal que el hemo

y está a menos de 4 Å de uno de los grupos vinilo de este grupo prostético; de todos los residuos polares mencionados, la mutagénesis de la Thr78 podría tener el mayor efecto en el potencial redox por su cercanía, pero también podría afectarse el posicionamiento correcto del hemo, el cual es indispensable para que tenga la coordinación adecuada para la catálisis. Aunque en este trabajo no se eligió la Thr78 para mutarla, queda abierta la propuesta para explorar su papel no solo en el potencial redox sino también en cuestiones de plegamiento correcto de la proteína.

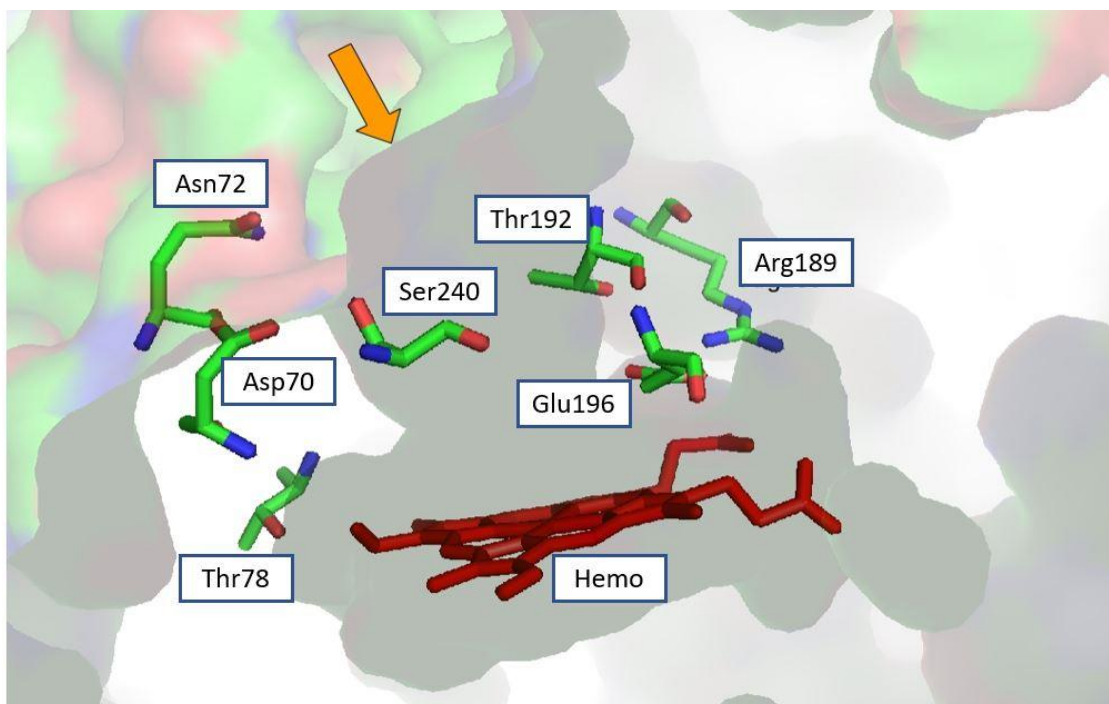


Figura 6. Residuos polares localizados en el canal de acceso del sustrato al sitio activo de la UPO de *A. aegerita* (PDB: 2YOR, cadena A). La flecha naranja señala la entrada del canal.

Las variantes S240A y T192V se expresaron heterológamente en *S. cerevisiae* y se logró detectar actividad peroxidasa y peroxigenasa en los extractos crudos (medida con ABTS y NBD, respectivamente). Sin embargo, la variante T192V mostró una marcada disminución en ambas actividades (por lo menos 10 veces menor con respecto a la enzima parental, PaDa-I), posiblemente por la cercanía del residuo Thr192 con el par ácido-base (Glu196 y Arg189),

necesario para la formación del Compuesto I (Figura 6). La baja actividad obtenida en los cultivos dificultó la purificación de cantidades suficientes de proteína para una caracterización amplia de esta variante. No obstante, se logró determinar la actividad específica con naftaleno (13.5 U mg^{-1} contra 151 U mg^{-1} de la enzima parental) y su estabilidad en peróxido de hidrógeno ($t_{1/2} = 0.82 \text{ min}$ contra 3.8 min de la enzima parental), lo cual confirmó que la mutación había afectado considerablemente su actividad y estabilidad. Por su parte, la variante S240A mostró niveles comparables de actividad en cultivo con respecto a PaDa-I y una actividad específica con naftaleno de 203 U mg^{-1} , lo que indica que la mutación mejoró la actividad para este sustrato con respecto a la enzima parental. Para evaluar si efectivamente las mutaciones habían alterado el potencial redox de la enzima, se intentó establecer un método de voltametría cíclica basado en el reportado para la peroxidasa de rábano blanco (HRP) (Chattopadhyay y Mazumdar, 1999); sin embargo, no fue posible detectar señales de oxidación y reducción, posiblemente porque el grupo hemo de la UPO de *A. aegerita* no se encuentra tan expuesto como en el caso de la HRP y esto limita la transferencia directa de electrones desde el hemo hasta el electrodo. Podría intentarse esta determinación mediante la inmovilización del biocatalizador en el electrodo por diversos métodos, como se ha probado para la *LfuUPO* (Díaz-Díaz *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008).

Para explorar el factor de basicidad del Compuesto II en las UPO, se seleccionó el residuo Leu39 para mutarlo. Este residuo se encuentra a 3.8 \AA del átomo de azufre de la Cys36, que coordina al hierro. Se ha demostrado que la identidad del ligante proximal al hierro —y por lo tanto su ambiente— modula el carácter básico de este (Udit y Gray, 2005; Rydberg *et al.*, 2004). Dada su cercanía con el ligante proximal (Cys36) al hierro, se optó por realizar una mutagénesis sitio-dirigida de Leu39 a saturación, es decir, cambiarlo por los 19 aminoácidos

restantes y evaluar cuál de ellos afectaba la basicidad del Compuesto II.

Se seleccionaron colonias que mostraban actividad peroxidasa o peroxigenasa y se secuenciaron para determinar la identidad de las mutaciones; sin embargo, todas las colonias que dieron positivo para el ensayo de actividad codificaban para la Leu que tenía la enzima parental. Esto podría indicar que este residuo es indispensable para el plegamiento de la proteína. De hecho, en un alineamiento múltiple de secuencias para otras peroxigenasas se observó que el residuo Leu39 está conservado en *Marasmius rotula*, *Leprospodium fumago* y *Coprinellus radians* (Figura 7); únicamente la UPO de *Chaetomium globosum* tiene una metionina en esta posición. Otras posiciones que podrían mutarse, dada su cercanía con la Cys36, son la Ile95 (7.9 Å) y Leu115 (6.0 Å) (Figura 8); no obstante, la Ile95 está conservada en *C. radians*, y en *M. rotula* se encuentra una Leu (de acuerdo con el alineamiento, no hay un residuo equivalente en el caso de *C. globosum* o *L. fumago*) (Figura 7).

Más aun, la posición que ocupa la Leu115 está perfectamente conservada en todas las UPO conocidas hasta ahora (Figura 7). Esto limita las posibilidades de modificar el ambiente alrededor del ligante proximal para estudiar cómo se ve afectada la basicidad del Compuesto II, al menos mediante mutaciones puntuales. Sería necesario explorar otras estrategias, como la evolución dirigida con mutagénesis al azar de dominios específicos (González-Pérez *et al.*, 2014), ya que permitiría explorar un mayor universo de mutaciones conjuntas enfocadas a la hélice que contiene al ligante proximal.



Figura 7. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencias de UPO caracterizadas experimentalmente. Las flechas señalan la posición correspondiente a los residuos de la UPO de *A. aegerita* (1) Leu39, (2) Ile95 y (3) Leu115.

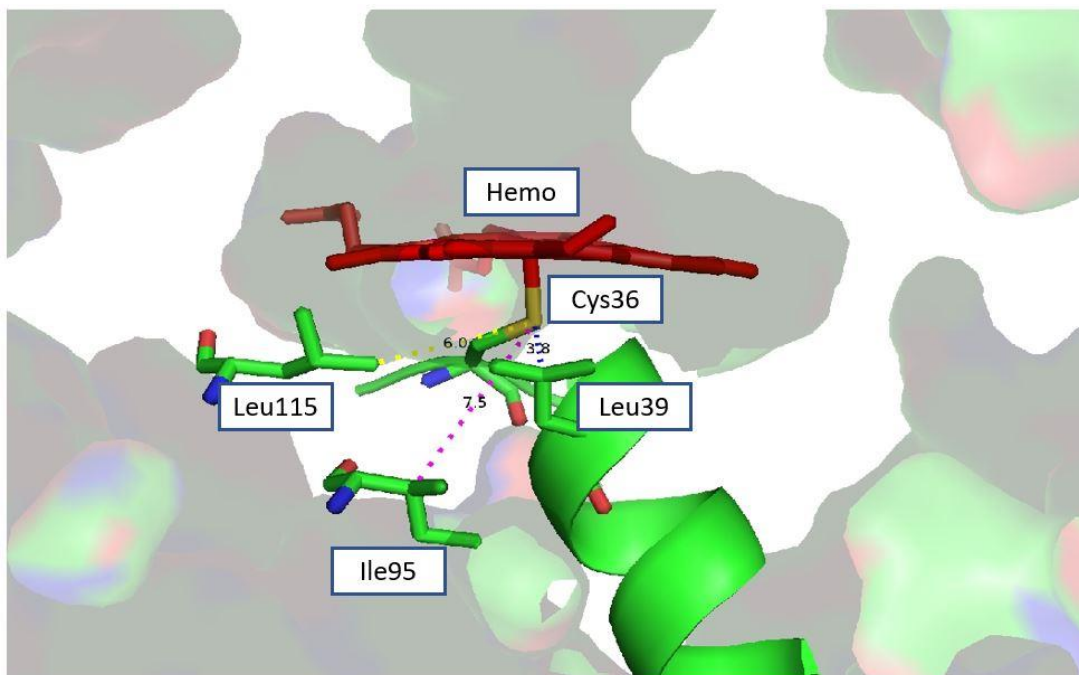


Figura 8. Residuos cercanos al ligante proximal (Cys36) en la región proximal del grupo hemo en la UPO de *A. aegerita* (PDB: 2YOR, cadena A). Se muestran las distancias en Å de los residuos Leu39, Ile95 y Leu115 al átomo de azufre de la Cys36.

En el caso del estudio de la topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo, se identificaron dos residuos de fenilalanina (Phe76 y Phe191) que tienen sus cadenas laterales orientadas hacia el interior del canal, localizadas a 10 y 14 Å del ion férrico del grupo hemo,

respectivamente. Se ha sugerido que estos residuos podrían impedir estéricamente el acomodo de sustratos voluminosos del tipo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (Piontek *et al.*, 2013). La variante PaDa-I es una UPO que se obtuvo mediante evolución dirigida a partir del gen silvestre de la UPO de *Agrocybe aegerita* (Molina-Espeja *et al.*, 2014). Las mutaciones de esta variante (V57A, L67F, V75I, I248V y F311L) se encuentran a por lo menos 10 Å del grupo hemo y ninguna está localizada en el canal de acceso del sustrato. Se ha reportado que estas mutaciones no afectan significativamente el comportamiento catalítico de la enzima comparada con la enzima silvestre de *A. aegerita* (Molina-Espeja *et al.*, 2014). Sin embargo, la estructura cristalográfica de la variante PaDa-I muestra que el residuo Phe191 es más flexible debido al efecto de la mutación F311L (PDB: 5OXU); aparentemente, la cadena lateral más pequeña de Leu permite el movimiento de la Phe76 y esto debilita la interacción con la Phe191 (Figura 9).

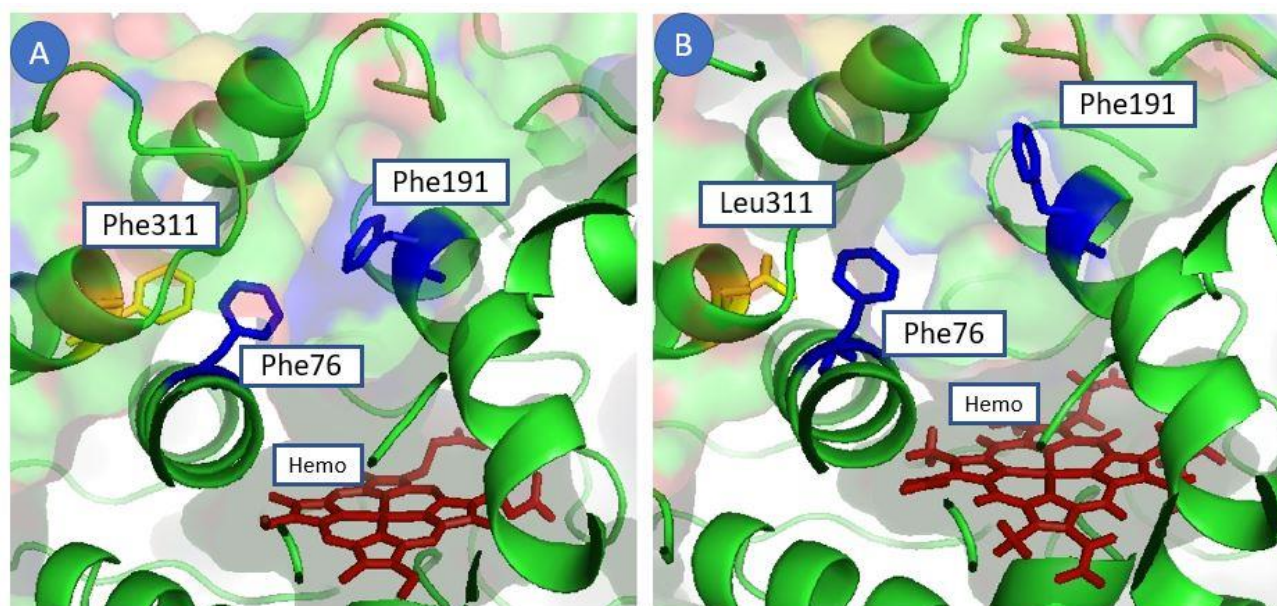


Figura 9. Vista del canal de acceso del sustrato al sitio activo en la UPO de *A. aegerita* (A) (PDB: 2YOR) y en la variante PaDa-I (B) (PDB: 5OXU). La mutación F311L debilita la interacción entre la Phe76 y Phe191, lo cual permite que esta última adopte otras conformaciones en PaDa-I.

PaDa-I y las variantes F76A, F191A, F76L, F76A/F191A y F76L/F191A se produjeron de forma

heteróloga en *S. cerevisiae*. Todas las variantes fueron activas y se expresaron en la levadura en cantidades similares de proteína total (1 mg de proteína pura). Las variantes purificadas tuvieron un valor Rz (razón de la absorbancia a 420 nm sobre 280 nm) de ~ 2.0, que se esperaba para una muestra pura (Molina-Espeja *et al.*, 2014). Se corroboró que las muestras con un Rz de 2.0 correspondían efectivamente a proteínas puras mediante un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Figura 10).

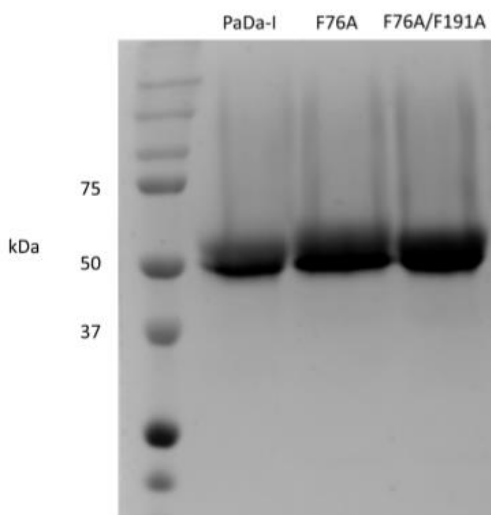


Figura 10. SDS-PAGE de variantes seleccionadas con una pureza de Rz=2.0. Se cargaron 5 μ g de proteína total en cada carril. El gel se tiñó con nitrato de plata. El marcador de peso molecular utilizado fue el Precision Plus Protein Standard (BioRad).

La caracterización cinética de los mutantes se realizó utilizando 5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD) como sustrato para el ensayo colorimétrico estándar de actividad peroxigenasa y naftaleno como modelo para sustratos aromáticos más complejos (Tabla 9). Con respecto a la oxidación de NBD por todas las mutantes, se observaron valores de k_{cat} similares o ligeramente superiores (1.6 veces). Sin embargo, en el caso de F76A y las mutantes dobles, se observó un aumento de alrededor de 2 veces en el valor de Km para la molécula relativamente pequeña de NBD, lo que resultó en una disminución del 40-50 % de la relación k_{cat} / K_m . Por otro lado, para las variantes F191A y F76L se observó una Km similar o ligeramente inferior (-30 %), lo

que resultó en un aumento del 30 % y 36 % en k_{cat} / K_m , respectivamente.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para PaDaI y variantes con los sustratos estándar NBD, ABTS y naftaleno.

Sustrato	Parámetros cinéticos*	PaDaI	F76A	F191A	F76L	F76A/F191A	F76L/F191A
NBD	k_{cat}	286 ± 18	356 ± 30	279 ± 18	454 ± 22	258 ± 15	332 ± 33
	K_m	736 ± 87	1386 ± 176	525 ± 73	890 ± 81	1389 ± 119	1552 ± 155
	k_{cat} / K_m	3.89×10^5	2.57×10^5	5.31×10^5	5.10×10^5	1.86×10^5	2.14×10^5
Naftaleno	k_{cat}	308 ± 25	305 ± 13	512 ± 28	341 ± 10	327 ± 17	485 ± 39
	K_m	289 ± 23	544 ± 58	740 ± 41	466 ± 36	627 ± 78	486 ± 39
	k_{cat} / K_m	1.07×10^6	5.61×10^5	6.92×10^5	7.33×10^5	5.22×10^5	9.98×10^5
ABTS	k_{cat}	1620 ± 67	751 ± 77	1039 ± 33	1122 ± 49	702 ± 15	926 ± 65
	K_m	186 ± 15	298 ± 51	93 ± 8	80 ± 9	136 ± 7	55 ± 12
	k_{cat} / K_m	8.71×10^6	2.52×10^6	1.12×10^7	1.40×10^7	5.16×10^6	1.68×10^7

*Unidades: k_{cat} , s^{-1} ; K_m , μM ; k_{cat}/K_m , $M^{-1} s^{-1}$.

Para otro sustrato aromático y más voluminoso como el naftaleno, se observó una disminución modesta en la eficiencia catalítica para las variantes F76L, F191A y F76L/F191A, mientras que hubo un efecto mayor para las variantes que contienen la mutación F76A, ya que hubo una disminución de hasta 2 veces en k_{cat}/K_m (Tabla 9). Está claro que el reemplazo de la Phe76 tiene un efecto negativo en la eficiencia catalítica de la enzima, específicamente en la afinidad del sustrato, que es más intensa si se reemplaza por un residuo pequeño y simple como la alanina, mientras que el reemplazo por un residuo más grande como la Leu amortigua este efecto. Por otro lado, el reemplazo de la Phe191 puede ser beneficioso para la oxidación del NBD, que es pequeño, pero reduce la afinidad por el naftaleno, que es más voluminoso. Por lo tanto, la eliminación de estos dos residuos aromáticos voluminosos (Phe76 y Phe191) aparentemente reestructura la topografía del canal de una manera que puede reducir la afinidad por algunos sustratos complejos.

Se ha propuesto que la actividad de peroxidasa (oxidación que involucra un solo electrón)

ocurre en la periferia de la proteína, independientemente de la interacción directa sustrato-hemo. Así, la caracterización cinética con ABTS --un sustrato típico de peroxidases-- también se realizó para PaDa-I y las variantes (Tabla 9). En este caso, el efecto de las mutaciones parece ser más uniforme. Las variantes que contienen la mutación F76A mostraron una eficiencia catalítica disminuida, principalmente debido a la baja en el valor de k_{cat} ; mientras que las variantes que contienen la mutación F191A o la mutación F76L mostraron una eficiencia catalítica ligeramente mayor, con el mayor efecto observado para la variante F76L/F191A, en la que se observó un aumento de 2 veces en k_{cat}/K_m . Inesperadamente, el efecto positivo en k_{cat}/K_m se debió principalmente a una disminución en el valor de K_m (Tabla 9). Esto podría indicar que el ABTS debe entrar, por lo menos parcialmente, al canal del hemo para poder ser oxidado.

Para comprender mejor el efecto de remodelar el canal de acceso al sustrato, se determinó el número de recambio total (TTN) para la oxidación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de tamaño creciente, como el antraceno y el fenantreno. Debido a las limitaciones de solubilidad, no se pudieron determinar las constantes cinéticas para estos compuestos. Sin embargo, el TTN es un indicador parecido a un rendimiento de la reacción, que tiene en cuenta diferentes fenómenos que rigen el comportamiento de la enzima durante la reacción, como la eficiencia catalítica pero también la estabilidad del catalizador; es un número adimensional (moles de producto generado por moles de enzima consumida) y relaciona el rendimiento del producto con la entrada de catalizador. Como se muestra en la Figura 11, solo se observan pequeñas diferencias en TTN para PaDa-I y las variantes en la oxidación de naftaleno; se observó una disminución del 20 % en el TTN para las variantes F76A y F191A, mientras que hubo un aumento del 12-16 % en el TTN para F76L, F76A/F191A y F76L/F191A. No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas en el TTN para la oxidación de antraceno entre las variantes. Para el fenantreno, todas las variantes mostraron valores de TTN similares o inferiores (hasta en un 30 %) que PaDa-I, aunque la reducción en el TTN fue estadísticamente significativa solo para la variante F191A. En el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos de gran tamaño (fluoreno, pentaceno), la principal limitación para su hidroxilación es su baja solubilidad. La accesibilidad al sitio activo no parece ser un problema, pues en condiciones de reacción donde la formación del compuesto I es lenta (usando tert-butilhidroperóxido como agente oxidante), se detectó la conversión de los sustratos por PaDa-I. Esto refuta la propuesta de Piontek *et al.* (2013) que dice que el pentaceno y perileno no son sustratos de la enzima porque no pueden entrar al sitio activo por el papel de los residuos Phe76 y Phe191 de limitar el tamaño de los sustratos que pueden entrar al sitio activo.

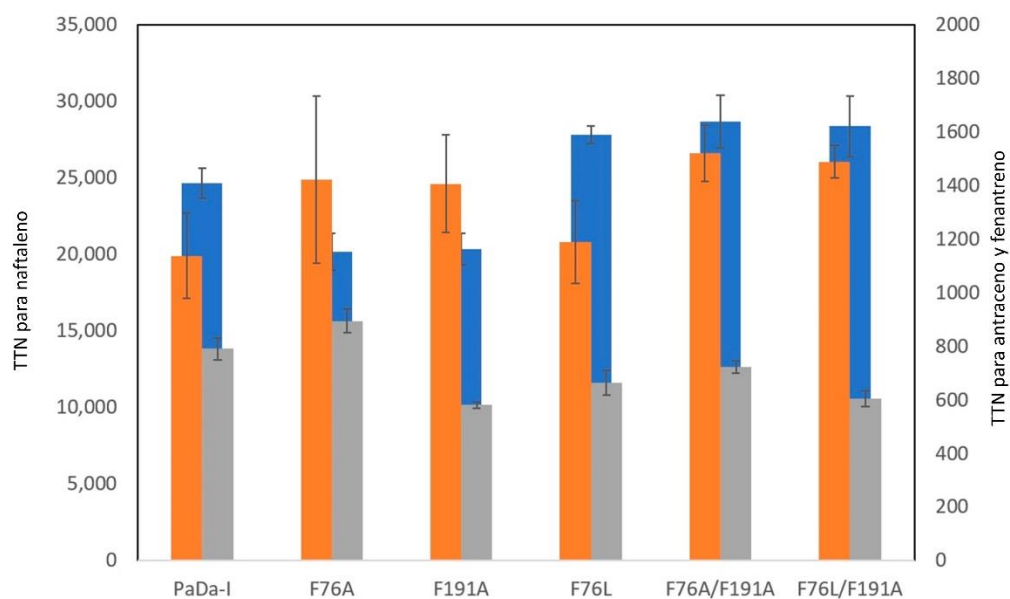


Figura 11. Número de recambio total (moles de sustrato transformado por cada mol de enzima durante su vida útil) para PaDa-I y las variantes con naftaleno (barras azules), antraceno (barras naranjas) y fenantreno (barras grises).

Uno de los factores que podría estar afectando la actividad de las variantes es su estabilidad

operacional. Es bien sabido que las hemo-peroxidasa pueden inactivarse en presencia de peróxido de hidrógeno si el sustrato reductor no es un buen donador de electrones o no es fácilmente accesible para el hemo. Se determinaron las constantes de inactivación de primer orden para las variantes en presencia de 1 mM de H₂O₂ y sin un sustrato reductor (Tabla 10). Los valores de vida media ilustran que todas las variantes se inactivan rápidamente. Sin embargo, está claro que las mutaciones en la posición 76 conducen a una inactivación ligeramente más rápida que podría estar relacionada con la menor actividad de catalasa de las variantes F76A o F76L (Tabla 10). Se observó una tendencia general en la que la actividad de catalasa estaba inversamente relacionada con la constante de inactivación, con la excepción del mutante F76L/F191A, que tiene una alta actividad de catalasa, casi 2 veces mayor que PaDa-I.

Tabla 10. Constantes de inactivación de pseudoprimer orden para PaDa-I y variantes cuando se incuban en H₂O₂, y su actividad específica de catalasa.

Variante	k_{inact} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	Actividad específica de catalasa (U mg ⁻¹)
PaDa-I	0.181 ± 0.014	3.8 ± 0.3	704 ± 4
F76A	0.368 ± 0.048	1.9 ± 0.3	517 ± 29
F191A	0.204 ± 0.012	3.4 ± 0.2	686 ± 32
F76L	0.322 ± 0.062	2.2 ± 0.4	518 ± 10
F76A/F191A	0.250 ± 0.014	2.8 ± 0.2	595 ± 7
F76L/F191A	0.267 ± 0.012	2.6 ± 0.1	1349 ± 234

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) de 50 ns y se analizó el comportamiento de los residuos dentro del canal para PaDa-I y las variantes construidas *in silico* F76A, F76L, F191A y las mutantes dobles F76A/F191A y F76L/F191A. La desviación cuadrática media (RMSD) de la proteína completa para PaDa-I y las mutantes mostró un comportamiento similar, con un promedio de RMSD entre 1.8 y 2.8 Å (Figura 12A). Además, la RMSD de los residuos que constituyen el canal del hemo mostró un comportamiento similar en todas las variantes (Figura 12B).

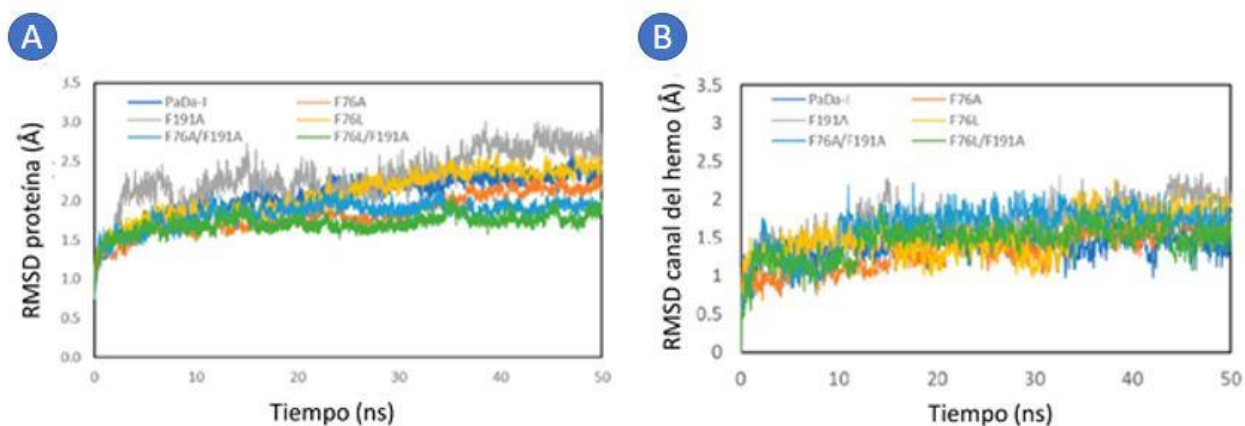


Figura 12. Desviación cuadrática media (RMSD) de la proteína (A) y del canal del hemo (B) durante la simulación de 50 ns de dinámica molecular de PaDa-I y las variantes.

El parámetro de fluctuación cuadrática media (RMSF) se usó para evaluar la movilidad de residuos de aminoácidos específicos. Los valores de RMSF se calcularon para los carbonos alfa de cada residuo en PaDa-I y las variantes, y el valor obtenido en PaDa-I se restó del de las variantes. Identificamos aquellos residuos con una diferencia RMSF mayor a una desviación estándar de la media de las diferencias entre PaDa-I y cada variante particular. Se considera que esos residuos tienen un cambio en la movilidad y se muestran en la Tabla 11 y la Figura 13. La movilidad de las cadenas laterales se evaluó observando específicamente los movimientos de los residuos del canal. El RMSF enfocado únicamente en las cadenas laterales no mostró diferencias significativas entre las variantes, por lo que los cambios en la flexibilidad de los residuos se dieron a nivel de cadena principal.

La variante F76A tuvo solo unos pocos cambios en la movilidad en residuos específicos (Tabla 11). Por otro lado, las variantes F191A y F76L mostraron una mayor movilidad en varios residuos que forman parte de una de las hélices alfa que constituyen el canal del grupo hemo (de la Asp187 a Tyr194 en F191A y de la Ala193 a Thr197 en F76L) (Tabla 11, Figura 13). La doble mutante F76A/F191A mostró algunas similitudes con la variante F191A, con mayor movilidad en los residuos Phe188, Ala191, Ala193 y Gly243 (Tabla 11, Figura 13).

Curiosamente, la combinación de las mutaciones F76L/F191A en la doble mutante provoca una disminución de la movilidad en varios residuos, en regiones que no están alteradas en las otras variantes de PaDa-I.

Tabla 11. Residuos con movilidad incrementada (+) o disminuida (-) de acuerdo con el Δ RMSF de las variantes con respecto a PaDa-I. Los residuos que tienen un cambio en su movilidad en más de una variante se resaltan en naranja (mayor movilidad) o en azul (menor movilidad).

F76A		F191A		F76L		F76A/F191A		F76L/F191A	
-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
								Pro2	
								Gly3	
						Ala21			
								Ser44	
								His45	
Gly46								Gly46	
								Asp91	
						Gly123		Gly123	
Ser126									
Gly130		Gly130		Gly130		Gly130		Gly130	
				Asn137					
	Glu142								
		Leu162		Leu162					
		Ala165							
		Gly166							
						Asn180			
						Asn182			
								Phe183	
								Ser184	
	Phe188								
		Asp187							
		Phe188						Phe188	
		Arg189							
		Phe190							
		Ala191						Ala191	
		Thr192							
		Ala193				Ala193		Ala193	
		Tyr194				Tyr194			
						Gly195			
						Glu196			
						Thr197			
						Asp210			
						Asp211			
									Gly241
								Gly243	
Val246									
	Pro252								
		Pro255							
		Thr270							
		Ser271							
		Ser272							
								Asp273	
		Thr276							
		Pro277							
		Cys278							
		Leu279							
	Met280								
Ala316		Met280							
	Gln321	Gln321		Gln321		Gln321		Gln321	
						Val322		Val322	
						Phe323			

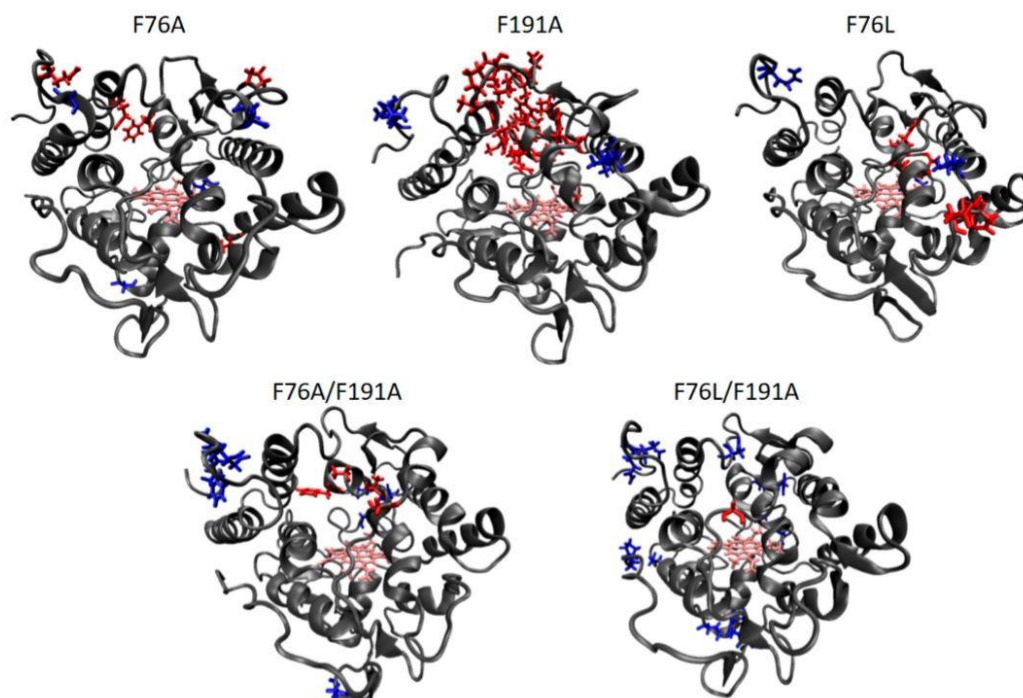


Figura 13. Localización de los residuos con mayor (rojo) o menor (azul) movilidad de las variantes con respecto a PaDa-I. El grupo hemo se muestra en rosa. Para el detalle de la identidad de los residuos consultar la Tabla III.

Para comprender mejor los cambios específicos de movilidad que pueden alterar la topografía del canal del hemo, se analizaron los cambios en los ángulos diedros de las Phe76 y Phe191 durante la simulación de dinámica molecular. Como se observa en la Figura 14, los movimientos de la cadena lateral debidos a los ángulos X_1 y X_2 no se vieron alterados para las variantes con respecto a PaDa-I. Únicamente se observa que en PaDa-I el anillo aromático de la Phe76 explora dos conformaciones que involucran un giro de aproximadamente 180° , lo cual no tiene repercusiones desde el punto de vista fisicoquímico; estos giros no se observan en la variante F191A.

Con respecto a otro tipo de movimientos, se observó que la distancia entre los carbonos alfa de los residuos 76 y 191 disminuía significativamente en la variante F76L (Figura 15A), al alcanzar distancias de 9-10 Å, cuando la enzima parental tenía su máximo de frecuencia de alrededor de 11 Å. Por su parte, en la variante F191A esta distancia podía llegar a ser de hasta

13-14 Å. Otras variantes eran capaces de explorar estas regiones, pero con una menor frecuencia (Figura 15A). Por otra parte, la variante F76L y las dos dobles mutantes fueron capaces de explorar distancias menores a 13 Å (valor más frecuente en la enzima parental) entre la Phe274 y el residuo 76 (Figura 15B). Por su parte, la variante F76A, al tener un residuo pequeño en esa posición, permite que la Phe274 se acomode en distintas posiciones y por eso su distribución de frecuencias de distancia está más dispersa, sin un máximo claro (Figura 15B). ¿Qué consecuencias en la topografía del canal tienen los cambios en las distancias entre estos residuos? Al analizar la disposición de otros residuos se logró identificar una red de interacciones que en PaDa-I forman Phe76-Met280-Pro277-Phe188-Phe191. Las mutaciones en las posiciones 76 y 191 provocan un reordenamiento de estas interacciones (Figura 16).

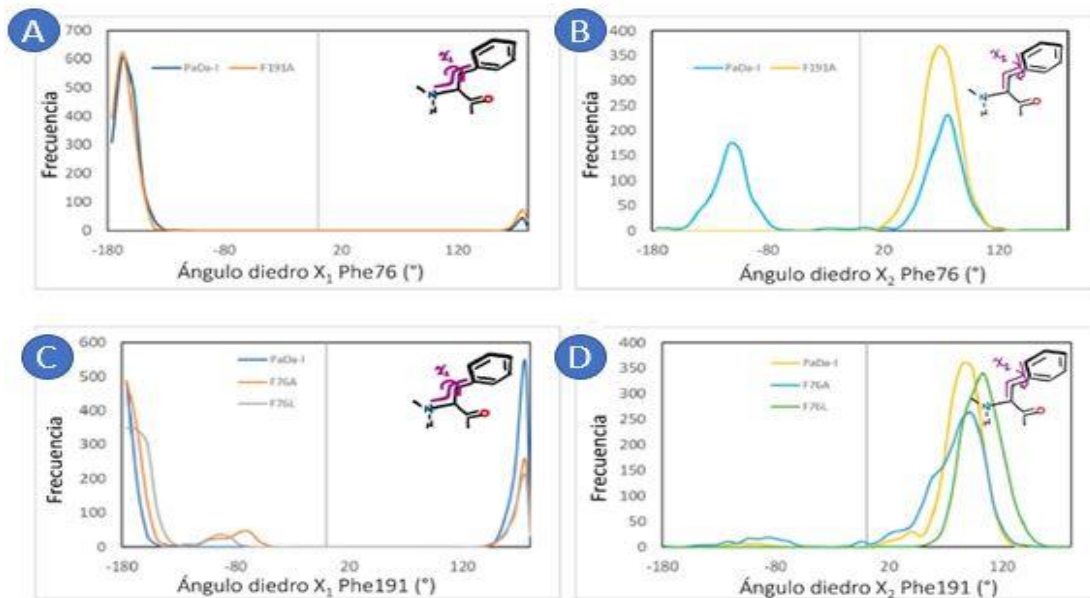


Figura 14. Distribución de frecuencias de los ángulos diedros X_1 de los residuos Phe76 y Phe191 (A y C, respectivamente), así como del movimiento en el ángulo X_2 (B y D), para PaDa-I y las variantes durante los últimos 40 ns de la simulación de dinámica molecular.

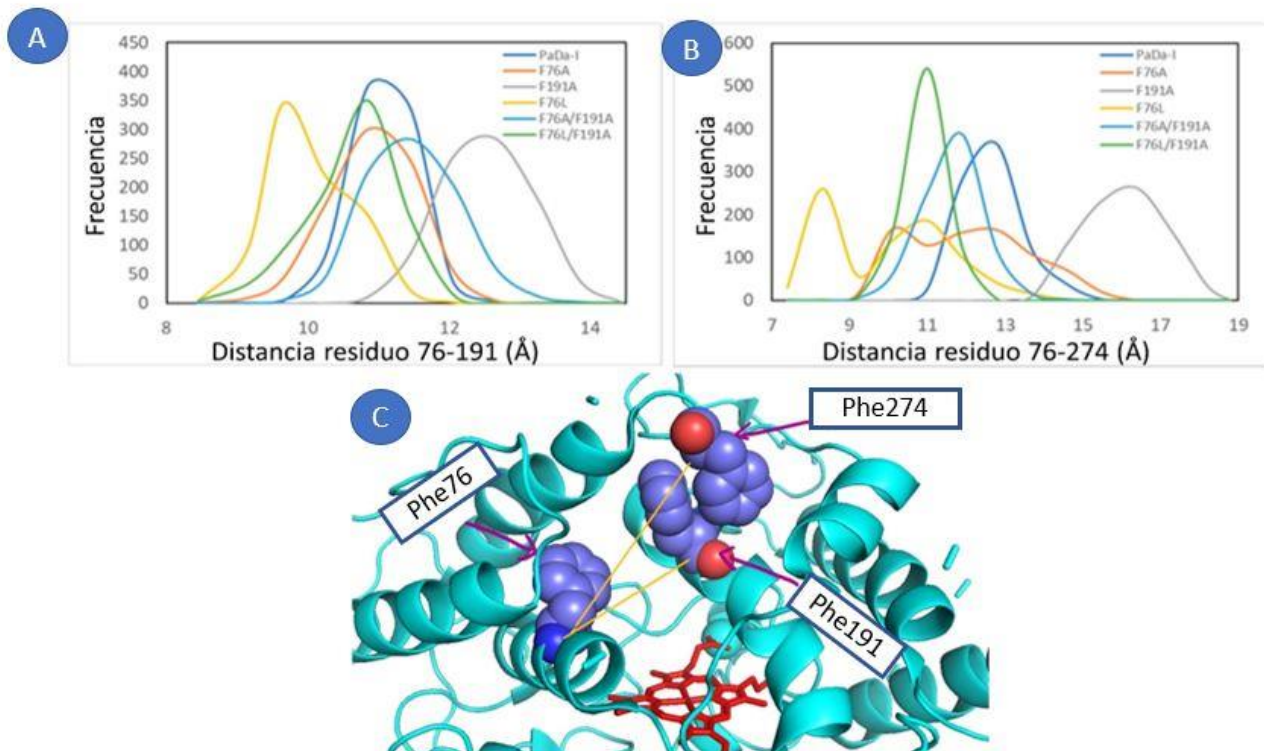


Figura 15. Distribución de frecuencias de la distancia entre los residuos 76-191 (A) y 76-274 (B) para PaDa-I y las variantes durante los últimos 40 ns de la simulación de dinámica molecular. En el panel C se muestra la ubicación de los residuos 76, 191 y 274 en PaDa-I. El grupo hemo se muestra en rojo. Las líneas amarillas indican que la distancia se midió desde los carbonos alfa.



Figura 16. Reordenamientos de la red de interacciones de los residuos 76-Met280-Pro277-Phe188-191 para PaDa-I y las variantes. Se muestran las conformaciones representativas donde las interacciones se ven más alteradas. El grupo hemo se muestra en rojo.

Como consecuencia de estos reordenamientos, la forma y volumen del canal del hemo se ve alterada. Se calculó el volumen del canal de las últimas 100 conformaciones de la simulación de dinámica molecular, que es una muestra representativa del sistema en equilibrio (Figura 17). El volumen del canal no cambió en la variante F76A, pero es capaz de explorar una topografía diferente. Las variantes F191A y F76A / F191A mostraron un aumento del 70 al 90 % en el volumen del canal, mientras que la mutación F76L condujo a una reducción.

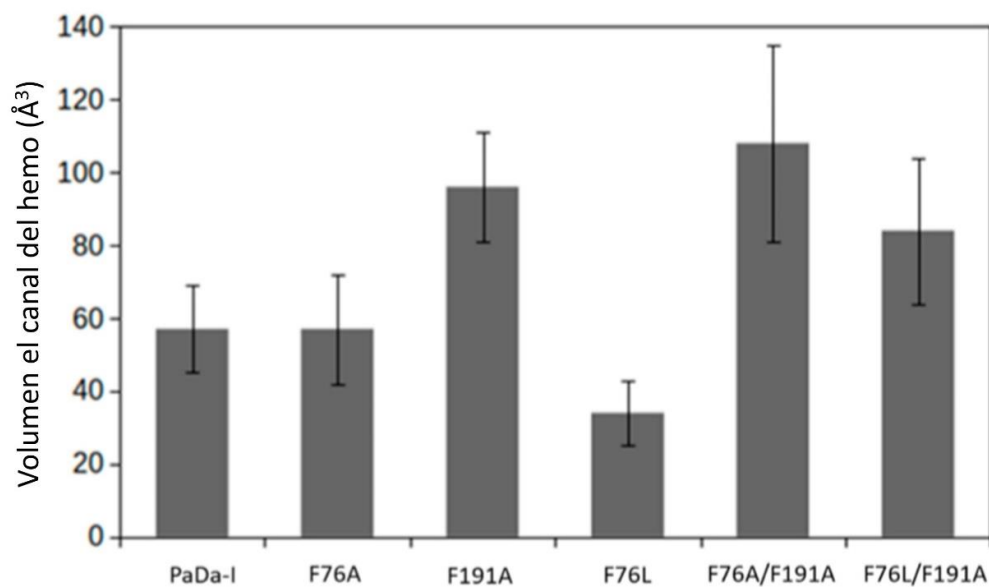


Figura 17. Volumen del canal del hemo calculado a partir de las últimas 100 conformaciones de la simulación de dinámica molecular para PaDa-I y las variantes.

En la Figura 18, se representa la topografía del canal en PaDa y las variantes. Los cambios en la topografía podrían estar relacionados en gran medida con una reordenación de los residuos del canal hemo mencionados anteriormente, porque el comportamiento rotacional y la conformación de las cadenas laterales de Phe no se altera en las mutantes. En algunas mutantes la topografía del canal está muy alterada, en comparación con PaDa-I. Para la variante F191A el canal adquiere una forma más irregular y en la variante F76L el volumen se reduce considerablemente; en ambos casos, el acceso del sustrato al canal podría estar

restringido, lo que podría explicar las disminuciones en la eficiencia catalítica de las mutantes con algunos sustratos.

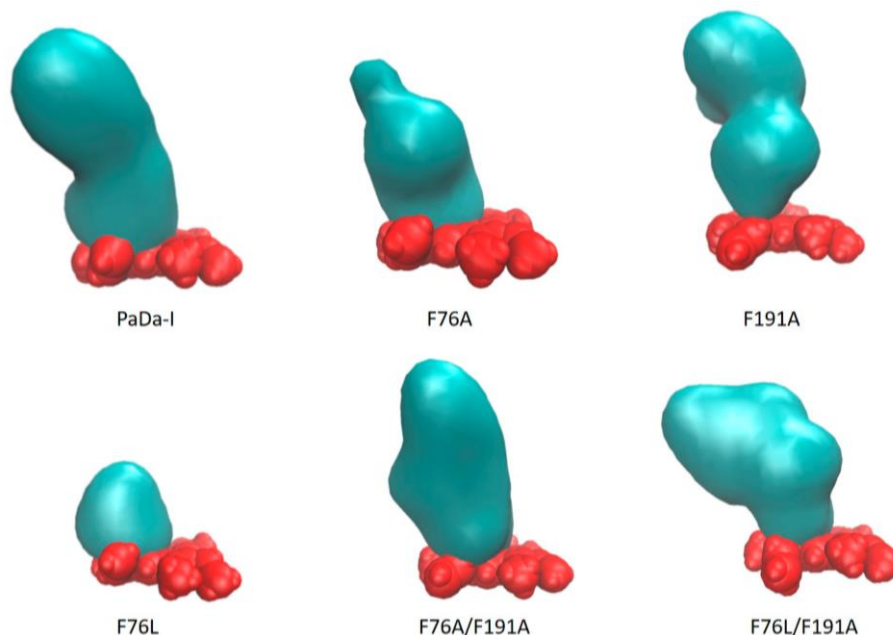


Figura 18. Representación gráfica de la forma del volumen que conforma el canal del hemo en PaDa-I y las variantes (azul). El grupo hemo se muestra en esferas rojas.

En suma, el residuo Phe76 parece tener un papel en la delimitación de la forma del canal hemo; su reemplazo por residuos simples y más pequeños conduce a una topografía alterada y a una mayor movilidad de algunos residuos de un bucle y una hélice alfa que da forma al canal hemo. En general, estos cambios son perjudiciales para la eficiencia catalítica, como se observa para los sustratos que deben acercarse al hemo para ser hidroxilados (naftaleno y NBD).

Por otro lado, la Phe191 tiene un papel más sutil que puede estar relacionado con la modulación del acceso de sustratos específicos. En este sentido, un estudio reciente sobre la filogenia de las UPO, basado en la minería de genomas, condujo a la clasificación de 113 secuencias putativas obtenidas de 35 especies de hongos diferentes (Faiza *et al.*, 2019). En

ese trabajo, se propone que las UPO se clasifiquen en 5 subfamilias, con la UPO de *A. aegerita* perteneciente a la subfamilia I. Según los alineamientos múltiples realizados en el trabajo mencionado, las posiciones 76 y 191 están altamente conservadas en la subfamilia I, mientras que en la subfamilia más cercana relacionada (subfamilia V) las posiciones correspondientes pueden estar ocupadas por residuos más pequeños como Ile en la posición 76 y Leu en la posición 191 (Figura 19).

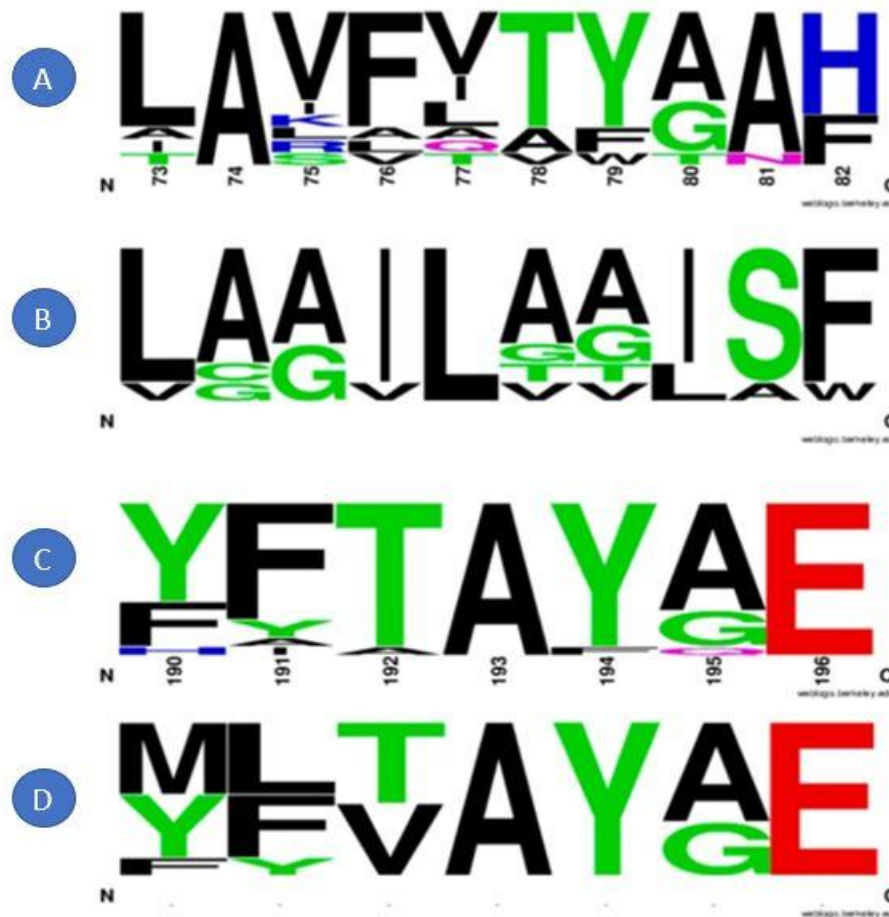


Figura 19. Representación gráfica de un fragmento de un alineamiento múltiple de la subfamilia I (A y C) y la subfamilia V (B y D), de acuerdo con la clasificación propuesta por Faiza y colaboradores (2019). La subfamilia I está representada por 12 secuencias putativas de UPO y la UPO de *A. aegerita*, mientras que a subfamilia V contiene 8 secuencias putativas de UPO. La numeración de los residuos corresponde a la de la UPO de *A. aegerita*. La imagen fue creada con el servidor WebLogo.

Para corroborar que el sitio activo se encontraba con la coordinación adecuada del grupo hemo y que las mutaciones no habían afectado el ambiente electrónico más cercano al hierro, se

obtuvo el espectro de absorbancia UV-Vis y el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de PaDa-I y las variantes. En el caso del UV-Vis, se detectó la señal esperada del hemo a 420 nm (banda Soret) y la señal asignada a la coordinación de tipo tiolato a 359 nm (banda δ) y dos señales adicionales en 540 y 572 nm (bandas α y β , respectivamente) (Figura 20). En el caso del EPR, todas las variantes conservan las señales del hierro en estado de bajo espín (valores $g = 2.57, 2.43, 2.25, 1.90$ y 1.85) (Figura 21). Así, la evidencia espectroscópica indica que el ambiente electrónico alrededor del hierro no fue alterado por las mutaciones F76A, F76L y F191A.

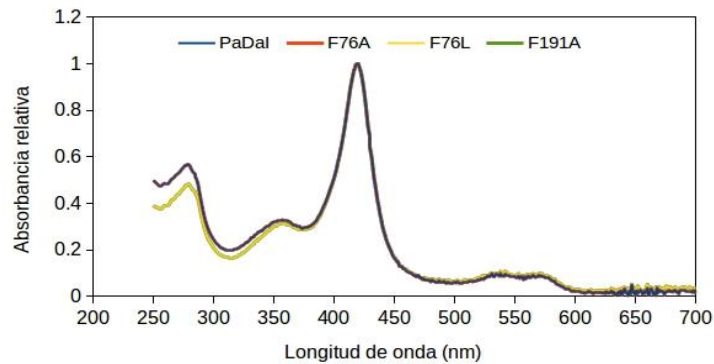


Figura 20. Espectro de absorbancia UV-Vis para PaDa-I y las variantes F76A, F76L y F191A después del proceso de purificación.

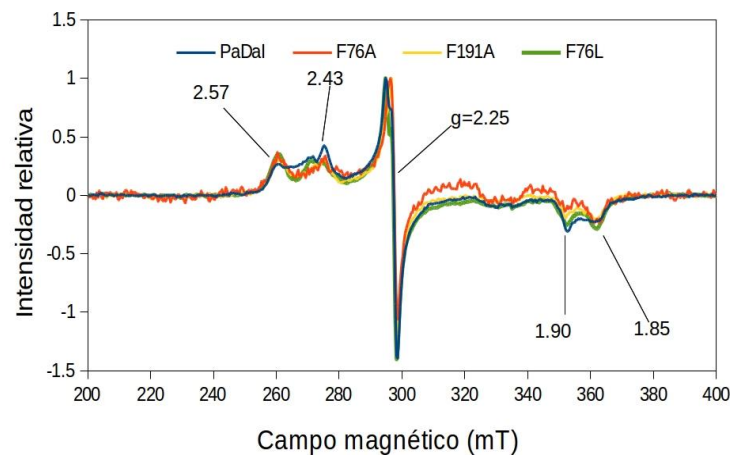


Figura 21. Espectro de resonancia paramagnética electrónica para PaDa-I y las variantes F76A, F76L y F191A. Atenuación: 20 dB, amplitud de modulación: 4G, 10 barridos, temperatura: 23 K, 0.1 mM de proteína en solución amortiguadora de fosfatos de potasio pH 7.0, 50 mM.

Otras observaciones

Una observación experimental interesante durante la caracterización de las enzimas fue que el sustrato guaiacol (un sustrato clásico de peroxidasa) podría estar ingresando al canal de acceso de las UPO. Esta evidencia se obtuvo a raíz de una observación durante las mediciones de actividad peroxidasa de las variantes con este sustrato. Se observó que aparecía un pico de absorbancia a los 256 nm durante la reacción, adicional a la señal de los 470 nm que se utiliza para monitorear la formación del producto de oxidación. Mediante un experimento control se comprobó que la señal de los 256 nm no se observa en las reacciones catalizadas por una hemo-peroxidasa que se sabe que no cataliza reacciones de peroxigenación (transferencia de oxígeno). Mediante separaciones de la mezcla de reacción por cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) se determinó que la señal de los 256 nm correspondía a un compuesto de naturaleza más polar que el sustrato (Figura 22).

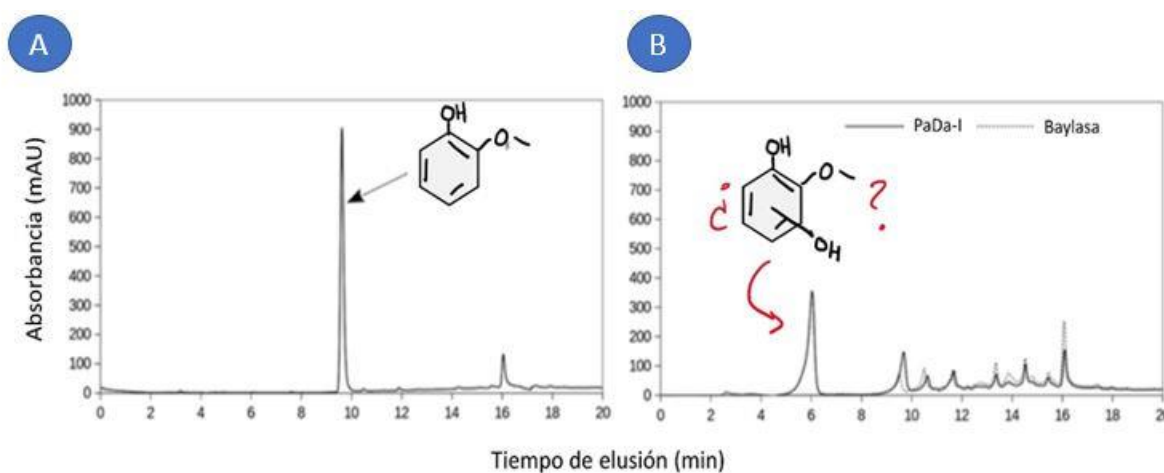


Figura 22. Cromatograma de una cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) del guaiacol (A) y los productos de reacción de este sustrato con la UPO y H_2O_2 (B). El cromatograma de PaDa-I muestra un producto más polar que eluye a los 6 min, algo que no sucede en la reacción con una peroxidasa clásica como la Baylase.

Se obtuvo evidencia, mediante un análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), de que este compuesto tenía una masa incrementada en 16 u.m.a, correspondiente a la masa de un átomo de oxígeno. Así, podría tratarse de un producto de hidroxilación del guaiacol, lo que implica que tanto las reacciones de peroxidasa y peroxigenasa de las UPO

están compitiendo durante esta reacción. Ya que las señales a 256 y 470 nm no se empalman, sería posible desarrollar un método espectrofotométrico fácil y rápido para determinar en un solo ensayo la relación entre la actividad peroxidasa y peroxigenasa para un mismo sustrato. Así, una perspectiva de este trabajo en este sentido requeriría la purificación de una cantidad suficiente del producto hidroxilado para la determinación del coeficiente de extinción molar, necesario para el cálculo posterior de las unidades enzimáticas.

8. Conclusiones

Fue posible diseñar, obtener y caracterizar mutantes que tuvieran cambios en la topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo. El estudio de factores moleculares como el potencial redox y la basicidad del Compuesto II deben ser abordados por métodos de mutagénesis que permitan explorar diferentes combinaciones de mutaciones, ya que mutar puntualmente el ambiente alrededor del ligante proximal al hemo resulta en variantes sin actividad.

La topografía del canal de acceso del sustrato al sitio activo en la UPO es un factor molecular importante en su capacidad oxidante. Este canal debe tener cierta rigidez para que se dé una interacción eficiente con los sustratos que deben acercarse al grupo hemo.

Las simulaciones de dinámica molecular permitieron entender que los residuos Phe76 y Phe191 son importantes para mantener esta rigidez, pues su mutación por residuos más pequeños altera la flexibilidad del canal y se reconfigura su topografía, la cual tiene consecuencias negativas en la eficiencia catalítica con sustratos como el naftaleno. A diferencia de lo que se pensaba, el papel de estas fenilalaninas no es el de limitar el tamaño de los sustratos que pueden ingresar, pues se detectó la transformación de compuestos grandes como el perileno y el pentaceno.

La topografía del canal determina la accesibilidad de los sustratos y esto se hace evidente en el caso del guaiacol, el cual puede acceder al grupo hemo y sufrir una hidroxilación, algo que

no se había descrito para este sustrato, pues es un compuesto que típicamente es oxidado por la vía de un solo electrón para formar un radical fenólico.

9. Perspectivas

La cristalización y resolución de estructuras de las mutantes con topografía alterada permitirá confirmar las predicciones computacionales y refinar los modelos teóricos para futuros análisis de estructura-función.

El desarrollar un método espectrofotométrico de detección del producto de hidroxilación del guaiacol permitirá cuantificar la relación peroxidación/peroxigenación con un mismo sustrato. Así se podrá evaluar el papel de ciertos residuos en cada una de las actividades enzimáticas. Explorar el papel de otros residuos en la determinación de la topografía del canal. Un candidato interesante sería la Phe274, la cual se encuentra a la entrada del canal y mostró un comportamiento muy dinámico en las mutantes diseñadas en este trabajo.

Técnicas de muestreo rápido, como el *stop-flow* y técnicas más sofisticadas como la cristalografía de rayos X serían de gran ayuda para poder tener un mayor detalle de los cambios en la reactividad que sufre la enzima al mutar residuos importantes del canal de acceso del sustrato al sitio activo.

Referencias

- Ayala, M. (2010). Redox Potential of Peroxidases. En M. Ayala, & E. Torres (Edits.), *Biocatalysis based on heme peroxidases: peroxidases as potential industrial biocatalysts* (págs. 61-78). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer.
- Ayala, M., Román, R., & Vázquez-Duhalt, R. (2007). A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357, 804-808.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A., & Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 21-36.
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417, 463-468.
- Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (1999). Direct electrochemical oxidation of horseradish peroxidase: cyclic voltammetric and spectroelectrochemical studies. *New Journal of Chemistry*(2), 137-139.

- Choudhury, K., Sundaramoorthy, M., Hickman, A., Yonetai, T., Woehl, E., Dunn, M. F., & Poulos, T. L. (1994). Role of the proximal ligand in peroxidase catalysis. Crystallographic, kinetic, and spectral studies of cytochrome c peroxidase proximal ligand mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20239-20249.
- Conesa, A., Punt, P., & Van den Hondel, C. A. (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, 93, 143-158.
- Cusanovich, M. A., Hazzard, J. T., Meyer, T. E., & Godon, T. (1989). Electron transfer mechanisms in heme proteins. *Journal of Macromolecular Science A*, 26, 433-443.
- Díaz-Díaz, G., Blanco-López, M. C., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tuñón-Blanco, P. (2009). Chloroperoxidase Modified Electrode for Amperometric Determination of 2,4,6-Trichlorophenol. *Electroanalysis*, 21, 1348-1353.
- Dunford, B. H. (1999). *Heme peroxidases*. New York: Wiley-VCH.
- Faiza, M., Huang, S., Lan, D., & Wang, Y. (2019). New insights on unspecific peroxygenases: superfamily reclassification and evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 19, 76.
- González-Pérez, D., Molina-Espeja, P., García-Ruiz, E., & Alcalde, M. (2014). Mutagenic Organized Recombination Process by Homologous In Vivo Grouping (MORPHING) for Directed Enzyme Evolution. *PLoS ONE*, 9, e90919.
- Green, M. T., Dawson, J. H., & Gray, H. B. (2004). Oxoiron(IV) in chloroperoxidase compound II is basic: implications for P450 chemistry. *Science*, 304, 1653-1655.
- Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2006). Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 276-288.
- Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2014). Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Opinion in Chemical Biology*, 19, 116-125.
- Jiang, L. (2012). Mechanisms of chloroperoxidase-catalyzed enantioselective reactions as probed by site-directed mutagenesis and isotopic labeling. *FIU Electronic Thesis and Dissertations*, 774.
- Kasner, R. J. (1973). A theoretical model for the effects of local nonpolar heme environments on the redox potentials in cytochromes. *Journal of the American Chemical Society*, 95, 2674-2677.
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ralph, S. A., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Hammel, K. E. (2009). Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 29343-29349.
- Kühnel, K., Blankenfeldt, W., Terner, J., & Schlichting, I. (2006). Crystal structures of chloroperoxidase with its bound substrates and complexed with formate, acetate, and nitrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 23990-23998.
- Marcus, R. A. (1956). On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *The Journal of Chemical Physics*, 24(5), 966-978.
- Mayer, J. M. (1998). Hydrogen atom abstraction by metal-oxo complexes: understanding the analogy with organic radical reactions. *Accounts of Chemical Research*, 31, 441-450.
- Miller, V. P., Tschirret-Gut, R. A., & Ortiz De Montellano, P. R. (1995). Chloroperoxidase-catalyzed benzylic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319, 333-340.
- Molina-Espeja, P., García-Ruiz, E., González-Pérez, D., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Alcalde, M. (2014). Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agroclybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3494-3507.
- Moore, G. R., Pettigrew, G. W., & Rogers, N. K. (1989). Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 498-499.
- Ortiz De Montellano, P. R. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 32, 89-107.
- Peter, S., Kinne, M., Wang, M., Ullrich, R. K., Groves, J. T., & Hofrichter, M. (2011). Selective

- hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase. *FEBS Journal*, 278, 3667-3675.
- Piontek, K., Strirmatter, E., Ullrich, R., Gröbe, G., Pecyna, M. J., Kluge, M., . . . Plattner, D. A. (2013). Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: cytochrome P450 functionality with benefits. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34767-34776.
- Poulos, T. L. (1996). The role of proximal ligand in heme enzymes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1, 356-359.
- Ramírez-Escudero, M., Molina-Espeja, P., Gomez de Santos, P., Hofrichter, M., Sanz-Aparicio, J., & Alcalde, M. (2018). Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase. *ACS Chemical Biology*, 13, 3259-3268.
- Reihmann, M., & Ritter, H. (2006). Synthesis of phenol polymers using peroxidases. *Advanced Polymer Science*, 194, 1-49.
- Rydberg, P., Sigfridsson, E., & Ryde, U. (2004). On the role of the axial ligand in heme proteins: a theoretical study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9, 203-223.
- Schuller, D. J., Ban, N., Van Huystee, R. B., McPherson, A., & Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4, 311-321.
- Shifman, J. M., Sharp, R. E., & Dutton, P. L. (2000). Heme redox potential control in de novo designed four- α -helix bundle proteins. *Biochemistry*, 39, 14813-14821.
- Smith, A. T., & Veitch, N. C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2), 269-278.
- Sundaramoorthy, M., Ternier, J., & Poulos, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 3, 1367-1377.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, 238-249.
- Udit, A. K., & Gray, H. B. (2005). Electrochemistry of the heme-thiolate proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 470-476.
- Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2005). The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Letters*, 579(27), 6247-6250.
- Ullrich, R., Nüske, J., Scheibner, K., Spantzel, J., & Hofrichter, M. (2004). Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* Oxidizes Aryl Alcohols and Aldehydes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4575-4581.
- Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry reviews*, 3, 3-18.
- Wang, X., Peter, S., Kinne, M., Hofrichter, M., & Groves, J. T. (2012). Detection and kinetic characterization of a highly reactive heme-thiolate peroxygenase compound I. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 12897-12900.
- Wang, X., Peter, S., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Groves, J. T. (2013). Driving Force for Oxygen-Atom Transfer by Heme-Thiolate Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 9238-9241.
- Wang, Z. (2011). Characterization of recombinant chloroperoxidase, and F103A, and C29H/C79H/C87H mutants. *FIU Electronic Thesis and Dissertations*, 414.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of Plant, Fungal and Bacterial Peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388-393.
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35, 7608-7614.
- Yang, L., Wu, X. Q., Wang, R., Lu, Z. Q., Hou, W. J., & Li, H. X. (2008). Ionic liquid modified GC electrode for the direct electrochemistry of chloroperoxidase. *Chinese Chemical Letters*, 19, 1483-1486.

- Yun, C. H., Kim, K. H., & Wade, M. (2005). Kinetic analysis of oxidation of coumarins by human cytochrome P450 2A6. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 12279-12291.
- Zheng, Z., & Gunner, M. R. (2009). Analysis of the electrochemistry of hemes with Ems spanning 800 mV. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 75(3), 719-734.

Anexo I

Publicación científica en una revista arbitrada derivada de esta tesis



Article

Exploring the Role of Phenylalanine Residues in Modulating the Flexibility and Topography of the Active Site in the Peroxygenase Variant PaDa-I

Joaquin Ramirez-Ramirez ¹, Javier Martin-Diaz ², Nina Pastor ^{3,†} , Miguel Alcalde ^{2,*} and Marcela Ayala ^{1,*}

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, Mexico; joako@ibt.unam.mx

² Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC, 28049 Madrid, Spain; javiermd44@hotmail.com

³ Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; nina@uaem.mx

* Correspondence: malcalde@icp.csic.es (M.A.); maa@ibt.unam.mx (M.A.)

† On sabbatical leave at Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, Mexico.

Received: 26 July 2020; Accepted: 7 August 2020; Published: 10 August 2020



Abstract: Unspecific peroxygenases (UPOs) are fungal heme-thiolate enzymes able to catalyze a wide range of oxidation reactions, such as peroxidase-like, catalase-like, haloperoxidase-like, and, most interestingly, cytochrome P450-like. One of the most outstanding properties of these enzymes is the ability to catalyze the oxidation a wide range of organic substrates (both aromatic and aliphatic) through cytochrome P450-like reactions (the so-called peroxygenase activity), which involves the insertion of an oxygen atom from hydrogen peroxide. To catalyze this reaction, the substrate must access a channel connecting the bulk solution to the heme group. The composition, shape, and flexibility of this channel surely modulate the catalytic ability of the enzymes in this family. In order to gain an understanding of the role of the residues comprising the channel, mutants derived from PaDa-I, a laboratory-evolved UPO variant from *Agroclybe aegerita*, were obtained. The two phenylalanine residues at the surface of the channel, which regulate the traffic towards the heme active site, were mutated by less bulky residues (alanine and leucine). The mutants were experimentally characterized, and computational studies (i.e., molecular dynamics (MD)) were performed. The results suggest that these residues are necessary to reduce the flexibility of the region and maintain the topography of the channel.

Keywords: biocatalysis; molecular dynamics; oxizyme engineering; peroxygenases; structure–function relationship

1. Introduction

The unspecific peroxygenase (UPO, E.C. 1.11.2.1) is a versatile heme-thiolate oxidoreductase capable of catalyzing the oxidation of a wide range of organic substrates using hydrogen peroxide as oxidizing agent [1–3]. The most remarkable feature of this fungal enzyme is the hydroxylating activity towards non-activated aromatic and aliphatic hydrocarbons without the need of other cofactors, such as NAD(P)H, or accessory protein domains [4–6]. Thus, UPO is a promising tool for biotechnological applications in organic synthesis and bioremediation [7–9]. The first UPO was described in the

basidiomycete *Agrocybe aegerita* [1], followed by UPO from *Coprinus radians* [10], *Marasmius rotula* [11], and *Chaetomium globosum* [12], among others. To date, there are hundreds of putative peroxygenase sequences identified in fungal genomes and even the long-time peroxidase outsider *Leptoxylum fumago* chloroperoxidase (LfuCPO) has been catalogued as a peroxygenase, albeit specialized in halide oxidation [13,14]. In UPOs, there is a channel connecting the bulk solvent with the active site that allows substrate access to the heme group, and thus facilitates two-electron oxidations through oxygen atom transfer (peroxygenase activity) [15–19]. The size and shape of the heme channel vary depending on the peroxygenase. For example, in LfuCPO, the first heme-thiolate peroxidase described back in the 1960s [20], the channel has a maximum width of 7.2 Å, whereas in *Agrocybe aegerita* UPO (AaeUPO) its width is 9.8 Å [15], and in *Marasmius rotula* UPO (MroUPO) it is shorter but wider than in AaeUPO (around 12.9 Å) [18]. These features, along with the different amino acids upholstering the channel (mostly aromatic residues for AaeUPO and aliphatic ones for MroUPO), are proposed as key determinants in the extraordinary versatility of UPOs [15,16].

Understanding the molecular factors that modulate the oxidative capacity of these enzymes is fundamental for the design of improved biocatalysts with biotechnological potential [20,21]. Computational tools are increasingly used in protein engineering, combined with experimental approaches such as directed evolution and/or site-directed mutagenesis [22]. Protein simulation allows to predict the effect of site-directed mutagenesis as well as to explain experimental results. In the case of UPOs, computational tools such as Protein Energy Landscape Exploration (PELE) and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) have been used to explain the enhanced activity towards naphthalene of AaeUPO variants obtained by directed evolution [23] and to explain the differences observed in the steroid hydroxylation by basidiomycete peroxygenases [8]. Furthermore, PELE combined with molecular dynamics (MD) and QM/MM simulations were used to obtain structural insights into the changes caused by a single amino acid mutation in evolved AaeUPO variants obtained for the selective hydroxylation of propranolol [24].

In this work, we explored the topography of the substrate access channel by combining computational simulations and site-directed mutagenesis. We used as a model the recombinant variant of the AaeUPO (PaDa-I) previously obtained by directed evolution [25] and standard substrates as well as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as models of bulky molecules, to characterize the generated variants [26]. Molecular dynamics helped to shed light on the role in protein flexibility of residues conforming the channel, while site-directed mutagenesis of specific phenylalanine residues led to a better understanding of the role of channel composition in the catalytic properties of the enzyme.

2. Results and Discussion

PaDa-I is an AaeUPO variant obtained through directed evolution, which contains amino acid replacements that enhance its recombinant expression in yeast and is thus amenable to protein engineering. The mutations in PaDa-I are at least 10 Å away from the active site and none is localized directly in the substrate access channel; it has been reported that these mutations do not affect the overall catalytic behavior of the enzyme compared to the wild-type AaeUPO [25].

Visual inspection of the crystallographic structure of PaDa-I (PDB ID: 5OXU) allowed the identification of a channel connecting the distal side of the heme prosthetic group to the bulk solvent (Figure 1). Among the residues conforming this channel, two phenylalanine residues can be clearly identified that orient their side chain moiety towards the channel, namely Phe76 and Phe191, located 10 Å and 14 Å away from the heme iron, respectively (Figure 1). It has been suggested that these residues regulate the entrance of substrates to the heme channel and may impose an upper limit to the size of substrates that can access the active site [15]. Thus, bulky substrates, such as the PAHs pentacene and fluorene, are not oxidized by AaeUPO, probably because they cannot be accommodated close to the heme group, according to molecular docking simulations [15]. According to previously reported crystallographic data, the residue Phe191 is more flexible in the PaDa-I variant, with respect to the wild-type AaeUPO, due to the effect of the mutation F311L; apparently, the smaller side chain in

Leu displaces the side chain in Phe76 and this weakens the interaction with Phe191 [16]. However, as mentioned before, this has no effect on the catalytic behavior of the PaDa-I variant.

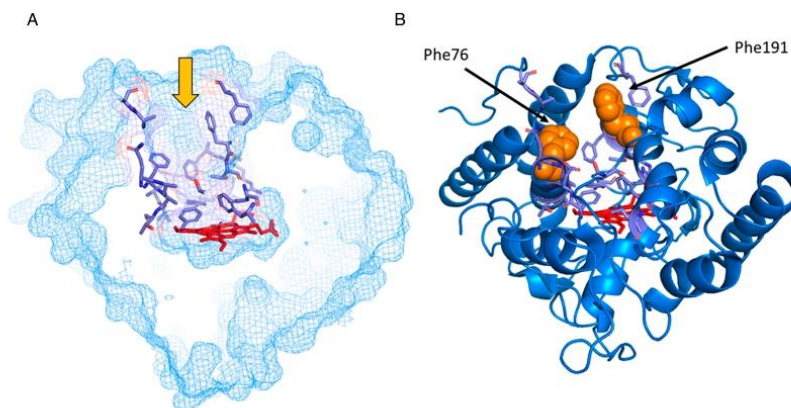


Figure 1. (A) Substrate access channel in PaDa-I model structure (PDB ID: 5OXU). The topography of the channel is delimited by the following residues (in violet): Phe69, Asp70, Gln72, Ala73, Phe76, Ala77, Thr78, Ala80, Ala81, Phe121, Phe188, Arg189, Phe191, Thr192, Glu196, Phe199, Leu203, Ser240, Phe274, Ala316, and Ala317. The orange arrow signals the entrance to the channel that ends in the heme pocket (heme group in red). (B) Residues Phe76 and Phe191 (light orange) in the substrate access channel were replaced with Ala or Leu in variants F76A, F191A, F76L, F76A/F191A, and F76L/F191A.

In order to experimentally characterize the role of these phenylalanine residues, PaDa-I and the variants F76A, F191A, and F76A/F191A were designed to evaluate the effect of a reduced side chain. Preliminary in silico modeling of the variants showed that mutation F76A generates an extra cavity in the heme channel. Therefore, the variants F76L and F76L/F191A were additionally considered to study the effect of a less drastic reduction of the side chain size. All the variants were heterologously produced in *Saccharomyces cerevisiae*. All the variants were active and were functionally expressed—secreted by yeast—at similar total protein levels, as previously reported [25]. As each variant showed a different catalytic behavior (Table 1), the Reinheitszahl value (Rz, a specific parameter for heme proteins that relates the absorbance ratio between 420 nm (Soret band) [2] and 280 nm) was preferred over the specific activity as purity criterion. The purified variants showed an Rz value of ~2.0, which was expected for a homogeneous sample [25]. Additionally, selected variants with an Rz of ~2.0 were analyzed by SDS-PAGE to confirm the presence of a single band (Figure S1, Supplementary Materials). Thus, routine purifications relied on the Rz value as a standard for purity.

Kinetic characterization of the mutants was performed using 5-nitro-1,3-benzodioxole (NBD) as standard colorimetric assay for peroxygenase activity and naphthalene as model for more complex aromatic substrates (Table 1; Figures S2–S4, Supplementary Materials). Regarding the oxidation of NBD by all mutants, similar or slightly higher (1.6-fold) k_{cat} values were observed. However, in the case of the F76A and double mutant variants, an approximately 2-fold increase in K_m for the relatively small NBD molecule was observed, resulting in a 40–50% decrease of k_{cat}/K_m . On the contrary, for F191A and F76L variants a similar or slightly lower K_m (~30%) was observed, resulting in a 30% and 36% increase of k_{cat}/K_m , respectively. For another aromatic and bulkier substrate such as naphthalene, a modest decrease in catalytic efficiencies was observed for F76L, F191A, and F76L/F191A variants, whereas a larger effect was observed for variants containing the F76A mutation, of up to a 2-fold decrease of k_{cat}/K_m . It is clear that the replacement of F76 exerts a negative effect on the catalytic efficiency of the enzyme, specifically on substrate affinity, which is more intense if replaced by a small, simple residue such as alanine, whereas the replacement by a larger residue such as leucine buffers

this effect. However, the replacement of F191 may be beneficial for the oxidation of the small NBD but reduces the affinity for the bulkier naphthalene. Thus, the elimination of these two bulky aromatic residues apparently reshapes the topography of the channel in a way that may reduce the affinity for some complex substrates.

Table 1. Kinetic parameters of PaDa-I mutants for the oxidation of standard substrates (5-nitro-1,3-benzodioxole (NBD) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) and naphthalene.

Substrate	Kinetic Parameter *	PaDaI	F76A	F191A	F76L	F76A/F191A	F76L/F191A
NBD	k_{cat}	286 ± 18	356 ± 30	279 ± 18	454 ± 22	258 ± 15	332 ± 33
	Km	736 ± 87	1386 ± 176	525 ± 73	890 ± 81	1389 ± 119	1552 ± 155
	k_{cat}/Km	3.89×10^5	2.57×10^5	5.31×10^5	5.10×10^5	1.86×10^5	2.14×10^5
Naphthalene	k_{cat}	308 ± 25	305 ± 13	512 ± 28	341 ± 10	327 ± 17	485 ± 39
	Km	289 ± 23	544 ± 58	740 ± 41	466 ± 36	627 ± 78	486 ± 39
	k_{cat}/Km	1.07×10^6	5.61×10^5	6.92×10^5	7.33×10^5	5.22×10^5	9.98×10^5
ABTS	k_{cat}	1620 ± 67	751 ± 77	1039 ± 33	1122 ± 49	702 ± 15	926 ± 65
	Km	186 ± 15	298 ± 51	93 ± 8	80 ± 9	136 ± 7	55 ± 12
	k_{cat}/Km	8.71×10^6	2.52×10^6	1.12×10^7	1.40×10^7	5.16×10^6	1.68×10^7

* Units: k_{cat} , s⁻¹; Km, μM; k_{cat}/Km , M⁻¹ s⁻¹.

It has been proposed that peroxidase activity (one-electron oxidation) occurs in the periphery of the protein, independently of direct substrate–heme interaction [27]. Thus, kinetic characterization with ABTS, a typical peroxidative substrate, was also performed for PaDa-I and the variants (Table 1). In this case, the effect of the mutations appears to be more uniform. Variants containing the F76A mutation showed a decreased catalytic efficiency, mainly due to a decrease in k_{cat} , whereas variants containing the F191A mutation and/or F76L mutation showed a slightly higher catalytic efficiency, with the larger effect observed for the F76L/F191A variant, in which a 2-fold increase in k_{cat}/Km was observed. Unexpectedly, the positive effect in k_{cat}/Km was mainly due to a decrease in the Km value.

To gain a better understanding on the effect of reshaping the substrate access channel, we determined the total turnover number (TTN) for the oxidation of PAHs of increasing size such as anthracene and phenanthrene. Due to solubility limitations, kinetic constants could not be determined for these compounds. However, TTN is an indicator of catalytic effectiveness, which takes into account different phenomena governing the enzyme behavior during the reaction, such as catalytic efficiency but also catalyst stability. It is a dimensionless number (moles of generated product per moles of consumed enzyme) and it relates product yield to catalyst input [28]. As shown in Figure 2, only small differences in TTN are observed for PaDa-I and the variants for naphthalene oxidation; a 20% decrease in TTN was observed for F76A and F191A variants, whereas a 12–16% increase in TTN was observed for F76L, F76A/F191A, and F76L/F191A. No statistically significant difference in TTN for anthracene oxidation was found among the variants. For phenanthrene, all variants showed similar or lower TTNs (up to 30%) than PaDa-I, although the reduction in TTN was statistically significant only for the F191A variant.

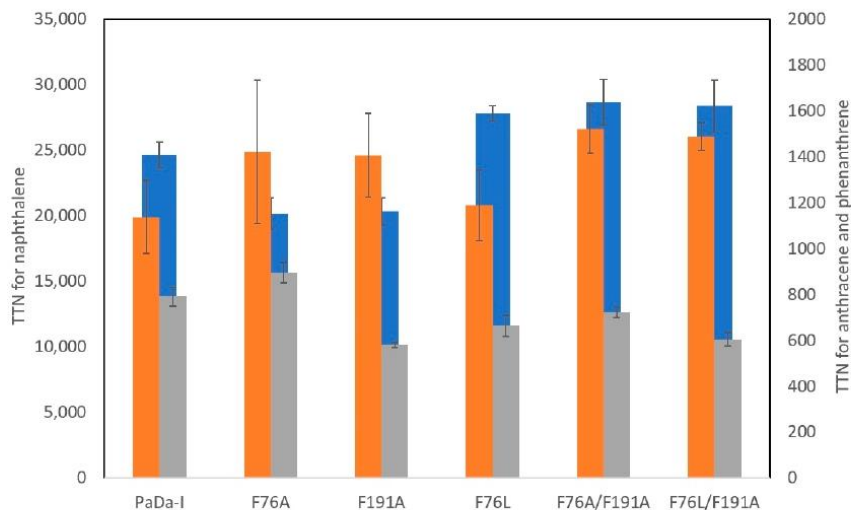


Figure 2. Total turnover number (TTN) of PaDa-I and all the variants with PAHs: naphthalene (blue), anthracene (orange), and phenanthrene (gray). TTN is expressed as moles of substrate converted per mole of enzyme used.

One of the factors that could be affecting the activity of the variants is their operational stability. It is well known that heme-peroxidases can be inactivated by hydrogen peroxide if the reducing substrate is not a good electron donor or it is not readily accessible to the heme [29–31]. In the case of UPOs, the main inactivation mechanism seems to be heme destruction, due to oxidation by highly oxidizing species such as hydroxyl radicals [31]. We determined the first-order inactivation constants for the enzyme variants in the presence of 1 mM H₂O₂ and without a reducing substrate (Table 2; Figure S5, Supplementary Materials). Half-life values illustrate that all the variants are quickly inactivated. However, it is clear that mutations in position 76 lead to a slightly faster inactivation that could be related to the lower catalase activity of the F76/A,L variants (Table 2). A general trend was observed in which the catalase activity was inversely related to the inactivation constant, the exception being the F76L/F191A mutant, which has a high catalase activity, almost 2-fold higher than PaDa-I.

Table 2. Pseudo-first-order inactivation constants of PaDa-I and mutants F76A, F191A, F76L, F76A/F191A, and F76L/F191A when incubated in H₂O₂, and their catalase activity.

Variant	k_{inact} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	Catalase Specific Activity (U mg ⁻¹)
PaDa-I	0.181 ± 0.014	3.8 ± 0.3	704 ± 4
F76A	0.368 ± 0.048	1.9 ± 0.3	517 ± 29
F191A	0.204 ± 0.012	3.4 ± 0.2	686 ± 32
F76L	0.322 ± 0.062	2.2 ± 0.4	518 ± 10
F76A/F191A	0.250 ± 0.014	2.8 ± 0.2	595 ± 7
F76L/F191A	0.267 ± 0.012	2.6 ± 0.1	1349 ± 234

In order to further identify the role of residues shaping the topography of the active site, molecular dynamics (MD) simulations were performed and the behavior of residues within the channel was analyzed for PaDa-I and the in silico-constructed variants F76A, F76L, and F191A and the double mutants F76A/F191A and F76L/F191A. It was observed that the average root-mean-square deviation (RMSD) of the whole protein for PaDa-I and the mutants showed a similar behavior, with average RMSD ranging from 1.8 to 2.8 Å (Figure S6, Supplementary Materials). Furthermore, the RMSD of the

residues that constitute the heme channel showed a similar behavior in all the enzyme variants (Figure S7, Supplementary Materials).

The root mean square fluctuation (RMSF) parameter was used for evaluating the mobility of specific amino acid residues. The RMSF values were calculated for the alpha carbons of each residue in PaDa-I and the variants, and the value obtained in PaDa-I was subtracted from that of the variants. We identified those residues with an RMSF difference greater than one standard deviation of the mean of the differences between PaDa-I and each particular variant. Those residues are considered to have a change in mobility and are shown in Table S1 (Supplementary Materials) and Figure 3.

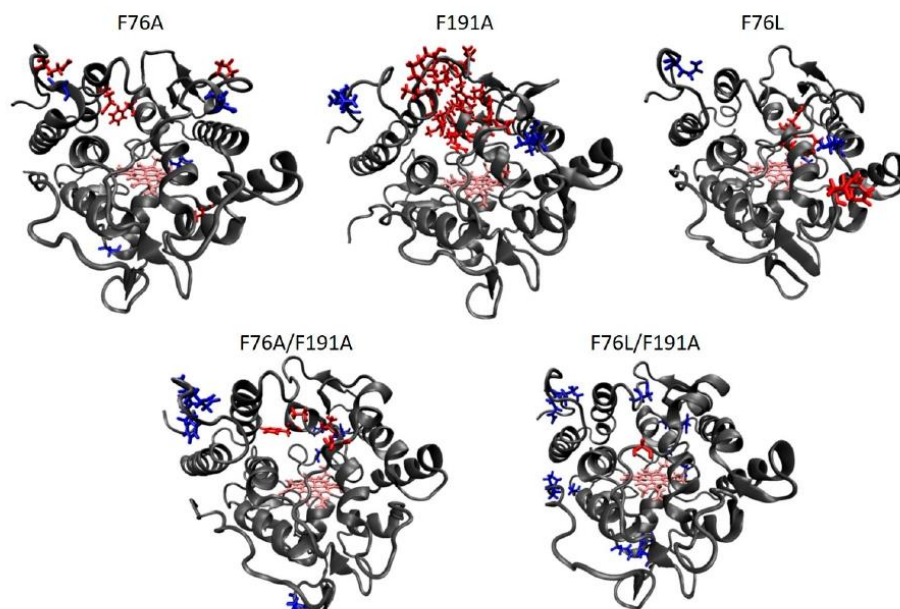


Figure 3. Protein models of the PaDa-I variants showing the localization of the residues with increased (red) and decreased (blue) mobility. The heme group is shown in pink and the protein backbone in a grey ribbon. For the details of residue identity, see Table S2 (Supplementary Materials).

Variant F76A had only a few changes in mobility in specific residues (Table S1). In contrast, variants F191A and F76L showed an increased mobility in several residues that are part of one of the alpha helices that constitute the heme channel (from Asp187 to Tyr194 in F191A and from Ala193 to Thr197 in F76L; Table S1, Figure 3). The double mutant F76A/F191A showed some similarities to the F191A variant, with increased mobility in residues Phe188, Ala191, Ala193, and Gly243 (Table S1, Figure 3). Interestingly, the combination of F76L/F191A mutations in the double mutant causes a decrease in mobility in several residues, in regions that are not altered in the other PaDa-I variants. These changes of mobility in the variants could be explained by the reorientation of a network of residues that hold the two alpha helices together with a loop. In PaDa-I, these residues include Phe76, Met280, Pro277, Phe188, and Phe191, which are in close contact ($<5 \text{ \AA}$) in a region that could be considered a hot spot for the integrity of the heme channel (Figure S8, Supplementary Materials). The reorientation of this network due to the mutations of Phe76 and Phe191 causes the loss of close interactions between these residues and gives some flexibility to the loop where Met280 is located and to the alpha helix where residue 191 is present (Table S2). Interestingly, in the case of the double mutant F76L/F191A, the reorientation of this network favors a close packaging that does not allow flexibility of the mentioned loop and helix (Figure S8, Table S1).

According to our simulations, the mutations also had an effect on the topography of the heme channel. We calculated the volume of the channel of the last 100 conformations of the MD simulation, which is a representative sample of the system at equilibrium (Figure 4). The volume of the channel did not change in the F76A variant, but it can explore a different topography (see below). F191A and F76A/F191A showed a 70–90% increase in channel volume, whereas the F76L mutation led to a reduced one (Figure 4).

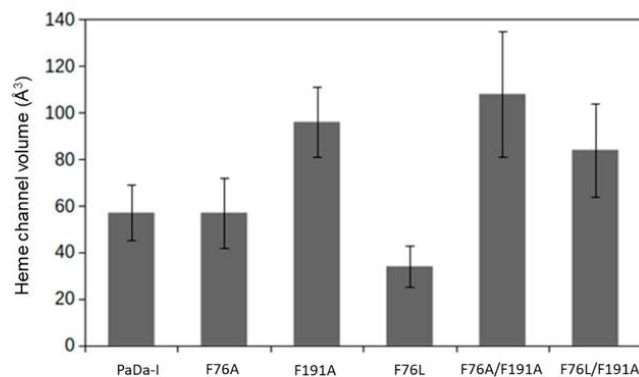


Figure 4. Heme channel volume calculated over the last 100 conformations of the molecular dynamics (MD) simulation.

In order to clarify the specific mobility changes that may alter the topography of the heme channel, the arrangement of the loop that contains Phe274 and the helix that harbors the residue in position 191 was analyzed. The most notable arrangement occurs in the F76L variant, where the Phe274 and Phe191 residues move closer to the Leu76 residue (Figure 5); this could explain the reduced channel volume in this variant. On the contrary, a larger channel volume in the F191A variant is the result of a structural rearrangement that is associated with a higher dynamic behavior of the region (Figures 3 and 5); for example, an increased distance between Ala191-Phe274 and Phe76-Ala191 residues is observed (Figure 5). In the case of the F76A/F191A variant, the higher variability of the channel volume (Figure 4) reflects a more dynamic topography as the Phe274-Ala76 distance decreases, whereas the Ala191-Ala76 distance increases (Figure 5). Although in the F76A variant the Phe274 residue explores conformations in which it moves closer to the Ala76 residue, it does not significantly alter the location of Phe191 and Phe274 residues with respect to Ala76, which is in accordance with a heme channel volume similar to PaDa-I, while the double mutant F76L/F191A shows an intermediate behavior between its corresponding single mutants (Figure 5).

In Figure 6, the topography of the cavity formed by residues in the channel is depicted for PaDa-I and the F76L and F191A single mutants; the shape of the cavities for all the variants can be seen in Figure S9 (Supplementary Materials). The changes in topography could be related largely to a rearrangement of the above-mentioned heme channel residues, because the rotational behavior and conformation of the Phe side chains is not altered in the mutants (Figure S10, Supplementary Materials). It is clear that in both mutants the topography of the channel is greatly altered, compared to PaDa-I. While for the F191A variant the cavity defining the channel acquires a more irregular shape, in the F76L variant the cavity is greatly reduced; in both cases, substrate access to the channel could be restricted.

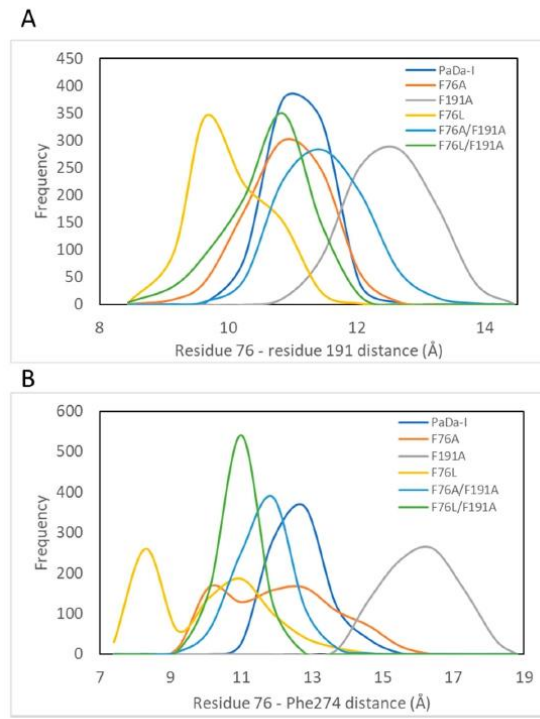


Figure 5. Frequency distribution of distances from residue number 76 to 191 (panel A) and from residues 76 to 274 (panel B). The distance was measured between the two alpha carbons during the last 40 ns of the MD simulation.

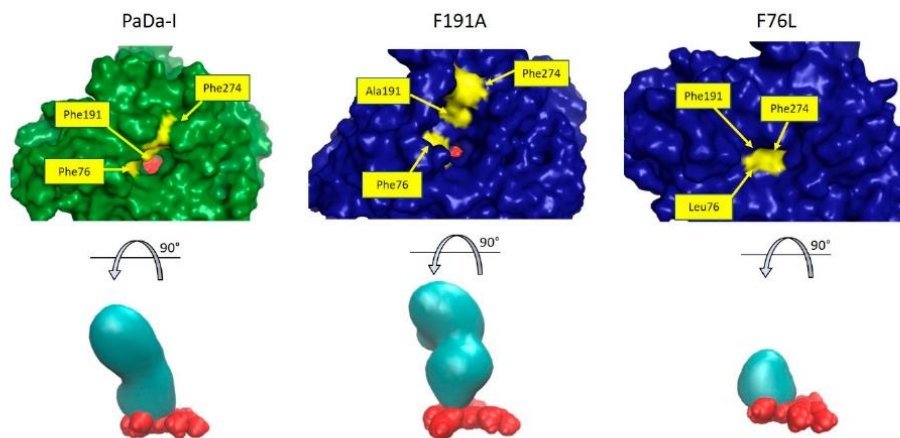


Figure 6. Upper view of the heme channel of the parental PaDa-I (green) and mutants F191A and F76L (blue), showing the changes in topography. The heme group is shown in red spheres and residues 76, 191, and 274 in yellow surface. In the lower part, the shape of the volume (in cyan) conforming the heme channel with respect to the heme group (red spheres) is shown.

From the analysis of the MD simulations, the Phe76 residue seems to have a role in delimiting the shape of the heme channel; its replacement by simple, smaller residues leads to an altered topography and a greater mobility of some residues of a loop and an alpha helix that shapes the heme channel. In general, these changes are detrimental for the catalytic efficiency, as observed for substrates that must get close to the heme to be hydroxylated (naphthalene and NBD).

On the contrary, Phe191 has a subtler role that may be related to modulation of the access of specific substrates. In this regard, a recent study on UPO phylogeny, based on genome mining, led to the classification of 113 putative sequences retrieved from 35 different fungal species [13]. In that work, it is proposed that UPOs are divided into five subfamilies, with AaeUPO belonging to subfamily I. According to multiple alignments performed in the mentioned work ([13]), positions 76 and 191 are highly conserved in subfamily I, whereas in the closest sequence-related subfamily (subfamily V) the corresponding positions may be occupied by smaller residues such as Ile in position 76 and Leu in position 191 (Figure S11, Supplementary Materials).

The relationship between topography, composition, and flexibility of the channel (given by certain residues in key positions), and enzyme specificity is still to be elucidated. Only a handful of UPOs have been experimentally characterized, thus a larger number of UPOs from different subfamilies need to be isolated or heterologously expressed in order to deepen our understanding of the catalytic versatility of this group of enzymes.

3. Materials and Methods

3.1. Computational Methods

3.1.1. System Preparation

The crystal structure of the PaDa-I variant (PDB ID: 5OXU) was used as the starting model [16]. The system was built with the Protein Preparation Wizard of the Maestro 9.8 package (Schrödinger, LCC, New York, NY, USA) [32]. Original water molecules and buffer ions were omitted in the simulations. The protonation state of the amino acid residues at pH 7.0 was established according to the pKa values obtained from the PropKa 3.0 server. All glutamic and aspartic acid residues were deprotonated except for Asp85. Histidine residues were δ -protonated, except for His82 which was ϵ -protonated and His118 and His251 were doubly protonated. These residues are not located near the substrate access channel (Figure S12, Supplementary Materials). For molecular dynamics simulations, the enzyme ground state was modeled with a heme group containing an Fe(III) cation. PaDa-I-derived variants (F76A, F191A, F76L, F76A/F191A, and F76L/F191A) were generated with the "Build fragments" tool included in Maestro in the ground state. With System Builder, an explicit solvent model with periodic boundary conditions was added (SPC, cubic box shape, 10 Å from the protein surface). The system was neutralized with 4 Na⁺. A minimization of the system was performed with the Desmond software (version 2015.4, Schrödinger, LCC, New York, NY, USA) [33]. The method used was the steepest descent with a convergence threshold of 0.01 kcal/mol/Å. Coulombic interactions were calculated with a cutoff radius of 12 Å. Before the molecular dynamics simulations (Section 3.1.2.), each mutant was minimized with this method after the in silico modeling.

3.1.2. Molecular Dynamics Simulations

Molecular dynamics simulations of the enzymes were performed with the Desmond software [33]. The OPLS_2005 force field was used for the 50 ns simulation in an NPT ensemble. A Berendsen thermostat maintained the temperature at 300 K and the pressure was controlled by the Berendsen algorithm at 1 atm. The RESPA integrator solved the equations of motion (2 fs time step). Short-range interactions had a calculation cutoff of 12 Å, while the electrostatic component was modeled using the particle-mesh Ewald method with a tolerance of 10⁻⁹. Atom distances and residue movements were analyzed with the VMD molecular visualization program [34]. The heme channel was defined by the

following residues in PaDa-I: Phe69, Asp70, Gln72, Ala73, Phe76, Ala77, Thr78, Ala80, Ala81, Phe121, Phe188, Arg189, Phe191, Thr192, Glu196, Phe199, Leu203, Ser240, Phe274, Ala316, and Ala317. For the calculation of the root mean square fluctuation (RMSF), we used the last 40 ns of the MD simulation. This time lapse was further subdivided into packages of 100 ps. In every package, an average structure was calculated for further use as the reference structure. The RMSF was calculated considering only the alpha carbon of the amino acid residues, averaging the RMSFs of all the packages. To identify amino acids with increased or decreased mobility in the enzyme variants with respect to PaDa-I, only those residues that had an RMSF difference greater than one standard deviation of the mean difference were considered. For the calculation of the volume of the heme channel, POVME3.0 (University of California, San Diego, CA, USA) was used [35]. Two inclusion spheres were defined as follows: one was calculated as the center of mass of the triad Phe69, Phe121, and Phe199 (using the ζ -carbons of the side chain), which is close to the heme group; the other one, as the center of mass between the residues 76 and 191 (β -carbon, δ 1-carbon, and ζ -carbon were used as reference for Ala, Leu, and Phe, respectively), which are located in the upper part of the heme channel. Both spheres had a radius of 4 Å.

3.2. Experimental Section

3.2.1. Site-Directed Mutagenesis

The plasmid pJRoC30-PaDa-I contains the gene for the expression of the laboratory-evolved PaDa-I variant [25]. The enzyme variants were generated by In Vivo Overlap Extension [36]. Specific oligonucleotides were designed to introduce mutations in residues Phe76 and Phe191 (see Table S2). External primers (RMLN and RMLC) with homologous overhangs to the plasmid were used in two separate PCR reactions (Table S2. Reaction 1 contained pJRoC30-PaDa-I as DNA template and RMLC and f76a (or f76l or f191a)-Forward as primers; reaction 2, RMLN and f76a (or f76l or f191a)-Reverse. The PCR protocol consisted of 30 cycles of a 2 min denaturation step at 95 °C, an aligning step of 1 min at 50–55 °C and an extension step of 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C, all catalyzed by Pfu-Polymerase (2.5 U) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). PCR products were purified with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) and co-transformed with BamHI- and XhoI-linearized plasmid into competent yeast cells using the protocol mentioned in Section 3.2.2. After three days of incubation, single colonies were selected and cultivated in YPD liquid medium for biomass production. The cells were pelleted and the plasmid was extracted using the Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep I (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Competent *Escherichia coli* XL1-Blue cells were transformed and plasmid was purified by standard protocols. Nucleotide sequences were verified at the “Unidad de Síntesis y Secuenciación de AND” of the Institute of Biotechnology (UNAM). Double mutants were generated by following the same protocol, using the corresponding mutated plasmid as template for the PCR reaction.

3.2.2. Enzyme Production

PaDa-I and the enzyme variants were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 as previously reported [25]. The plasmid pJRoC30 (CALTECH, Pasadena, CA, USA) with the PaDa-I gene (or mutant genes) inserted between BamHI and XhoI sites was transformed into *S. cerevisiae* competent cells using the Yeast Transformation Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were inoculated in agar plates (2%) containing yeast nitrogen base (6.7 g L⁻¹), yeast synthetic drop-out medium supplements without uracil (1.92 g L⁻¹), glucose (20 g L⁻¹), and chloramphenicol (25 mg L⁻¹). Plates were incubated at 30 °C for three days.

Single colonies were selected and inoculated into a 50 mL Erlenmeyer flask with 5 mL of liquid medium containing D-(+)-raffinose (20 g L⁻¹), yeast nitrogen base (6.7 g L⁻¹), yeast synthetic drop-out medium supplements without uracil (1.92 g L⁻¹), and chloramphenicol (25 mg L⁻¹). The cultures were incubated for 2 days at 30 °C and 220 rpm and they were used to inoculate a 500 mL flask with 100 mL

of medium. Once the optical density at 600 nm reached 1.0, the whole culture was poured into a 2.8 L Fernbach flask with 900 mL of expression medium that contained yeast extract (10 g L^{-1}), peptone (20 g L^{-1}), potassium phosphate buffer (60 mM, pH 6.0), galactose (20 g L^{-1}), magnesium sulfate (1 mM), ethanol (3% *v/v*), FeCl_3 (0.5 mM), and chloramphenicol (25 mg L^{-1}). Flasks were incubated for 72 h at 25°C and 220 rpm.

3.2.3. Enzyme Purification

Crude extracts were obtained by centrifugation of 1 L cultures. Ammonium sulfate precipitation (85% saturation) was carried out at 4°C . After centrifugation, the precipitate was resuspended in succinate buffer (10 mM, pH 4.3) and dialyzed overnight against the same buffer (membrane cutoff of 10 kDa). The sample was applied to a cation-exchange resin (Macro-Prep High S, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After loading the sample into the column, extensive washing was performed to elute unwanted proteins. The enzyme was then eluted with a NaCl solution (150 mM). Fractions showing enzymatic activity with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (see Section 3.2.4) were pooled and concentrated in a Stirred Ultrafiltration Cell (AMICON, Millipore, Darmstadt, Germany) using a 10 kDa cutoff membrane. During ultrafiltration, the buffer was exchanged to TRIS (10 mM, pH 7.0). Further purification was achieved by anion-exchange chromatography (Macro-Prep High Q, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Once the sample was applied, the column was extensively washed with TRIS buffer before elution with a NaCl solution (120 mM). Enzyme active fractions were pooled and concentrated as the previous step, exchanging to potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). Specific activity and Reinheitszahl value (R_z , the absorbance ratio between 420 nm (Soret band) and 280 nm) were used as criteria for purity. For the subsequent kinetic analysis with the purified enzymes, routine protein concentration was determined with the Bradford method using bovine serum albumin as standard.

3.2.4. Enzyme Activity Assays

For all assays, the initial reaction rate was used to calculate the enzymatic units (the amount of enzyme that generates $1 \mu\text{mol}$ of product per minute). All measurements were performed in triplicate in an Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System (Santa Clara, CA, USA).

Peroxidase activity. The activity with ABTS was monitored by the appearance of the stable one-electron-oxidized cation radical at 418 nm (molar extinction coefficient: $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [37]. The reaction mixture contained H_2O_2 (2 mM) and ABTS (0.4 mM) in a buffer mixture of sodium citrate and sodium phosphate (100 mM, adjusted to pH 4.4 with NaOH) [25].

Peroxygenase activity. The aromatic ether 5-nitro-1,3-benzodioxole (NBD) was used as a model substrate for specific peroxygenase activity [38]. The increase in absorbance of the product 4-nitrocatechol (molar extinction coefficient: $9700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was followed at 425 nm in a reaction mixture containing potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), H_2O_2 (1 mM), and NBD (5 mM). The reaction mixture contained acetonitrile (20% *v/v*) for NBD solubilization. For naphthalene hydroxylation activity, the formation of the main product (1-naphthol) was followed at 303 nm (molar extinction coefficient: $2010 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [39]. The reaction contained naphthalene (2 mM) and H_2O_2 (1 mM) in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) with acetonitrile (20% *v/v*). All measurements were performed in triplicate.

Catalase activity. H_2O_2 conversion was monitored by the decrease in absorbance at 240 nm (molar extinction coefficient: $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [40]. The reaction mixture contained potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and H_2O_2 (10 mM). The reaction was started by adding the enzyme (400 nM). All measurements were performed in triplicate.

3.2.5. Determination of Kinetic Parameters

The kinetic parameters were determined for PaDa-I and its variants using ABTS, NBD, and naphthalene. The reaction mixtures were as mentioned in the previous section. Initial rate (usually

the first 20 s of reaction, when the increase in absorbance was linear) at different substrate concentrations was measured. The substrate concentration range was as follows: for ABTS, the concentration range was 20–400 μM ; for NBD, 100–1000 μM ; and for naphthalene, 100–2000 μM . Typical enzyme concentration used for these determinations was as follows: 10 nM for ABTS; 30 nM for NBD and naphthalene. The data were adjusted to the Michaelis–Menten model using PRISM, in order to calculate the kinetic parameters k_{cat} and K_m (Figures S2–S4). All measurements were performed in triplicate.

3.2.6. Determination of the Total Turnover Number

The total turnover number (TTN) is the number of moles of converted substrate (or moles of generated product) per mole of enzyme during its operational lifetime, independent of time. In a typical experiment, substrate was monitored after the addition of enzyme and H_2O_2 . Once substrate concentration remained constant (i.e., no more substrate conversion was observed), H_2O_2 (1 mM) was added to assess if substrate conversion was not limited by H_2O_2 and that the reaction had stopped due to enzyme inactivation. TTN was calculated as the amount of converted substrate (or generated product) divided by the amount of initial enzyme added to the reaction. A small amount of enzyme was used to convert just a fraction of the substrate and to ensure a uniform reaction rate during substrate conversion. Substrate conversion or product formation was measured as described below.

TTN was determined in a reaction containing the substrate (naphthalene: 2 mM, anthracene and phenanthrene: 250 μM) and H_2O_2 (1 mM) in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) with acetonitrile (20% *v/v*). The reaction was initiated by the addition of enzyme (10 nM). Samples were taken at specific times and diluted with 1 volume of acetonitrile (ACN). PAH conversion was followed by reverse-phase HPLC in an Agilent 1100 Series equipment (Santa Clara, CA, USA) with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 \times 150 mm, 5 μm) using the following ACN-water gradient in %*v/v*: ACN:H₂O 30:70 for 3 min, 7 min to reach ACN:H₂O 90:10, and then 5 min at 90:10. The flow was 0.4 mL min^{-1} . The absorbance of the substrate was monitored at 250 nm and the area under the curve was used to quantify the remaining substrate. All measurements were performed in triplicate. A one-way ANOVA and several *t*-tests, two-sample assuming equal variances ($\alpha = 0.05$), were performed to determine if there was a statistically significant difference between the averages of the TTN for each substrate and protein variant.

3.2.7. Stability of Enzyme Variants in Hydrogen Peroxide

Each enzyme variant (12 nM) was incubated in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and H_2O_2 (1 mM) at 25 °C. Aliquots were periodically withdrawn and the residual enzymatic activity was measured with the ABTS activity assay described in Section 3.2.4. All measurements were performed in triplicate. Data were fitted to a first-order inactivation model to calculate k_{inact} .

4. Conclusions

In this work, we aimed to elucidate the role of bulky residues in the heme access channel. PaDa-I, a laboratory-evolved variant of UPO from *Agrocybe aegerita*, was used as model enzyme. The role of two amino acid residues, Phe76 and Phe191, was explored through site-directed mutagenesis and computational tools such as molecular dynamics (MD). According to MD simulations, we found that the replacement of Phe76 and Phe191 with less bulky residues (Ala or Leu) allowed a greater mobility in several residues of a loop and an alpha helix involved in shaping the heme access channel, which apparently led to a modified topography. This could result in a less productive interaction with the substrate, which explains the lower catalytic efficiency observed experimentally for the double mutants with peroxxygenase substrates (naphthalene and NBD), which need to approach the vicinity of the activated heme group in order for the oxygen transfer to efficiently occur. Phe residues in positions 76 and 191 appear to be conserved in the subfamily I of peroxxygenases, which could be related to enzyme specificity.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/16/5734/s1>. Figure S1: SDS-PAGE of selected variants with a Rz of 2.0 to corroborate their purity. A total of 5 µg of protein were loaded on each well. The gel was stained with silver nitrate. The molecular weight marker was Precision Plus Protein Standard (Biorad); Figure S2: Michaelis-Menten plots for the enzyme variants for the substrate ABTS. All model fits had a $R^2 > 0.95$; Figure S3: Michaelis-Menten plots for the enzyme variants for the substrate NBD. All model fits had a $R^2 > 0.95$; Figure S4: Michaelis-Menten plots for the enzyme variants for the substrate naphthalene. All model fits had a $R^2 > 0.95$; Figure S5: Inactivation kinetics of PaDa-I and its variants in the presence of hydrogen peroxide; Figure S6: Root mean square deviation (RMSD) of the whole protein for PaDa-I and F76A, F191A, F76L, F76A/F191A and F76L/F191A variants during a 50 ns molecular dynamics simulation. All the atoms were considered in the calculation; Figure S7: Root mean square deviation (RMSD) of the heme channel for PaDa-I and F76A, F191A, F76L, F76A/F191A and F76L/F191A variants during a 50 ns molecular dynamics simulation. The heme channel is delimited by the following residues: Phe69, Asp70, Gln72, Ala73, Phe76, Ala77, Thr78, Ala80, Ala81, Phe121, Phe188, Arg189, Phe191, Thr192, Glu196, Phe199, Leu203, Ser240, Phe274, Ala316, Ala317. The RMSD value was calculated over the alpha carbon of each amino acid residue; Figure S8: Reorientations of the network of residues 76, 280, 277, 188 and 191 due to the mutations of Phe76 and Phe191 give in some cases flexibility of the loop that contains Met280 and/or the alpha-helix that contains the residue 191. In the case of the double mutant F76L/F191A, the reorientation of this network favours a close packaging that does not allow flexibility of the mentioned loop and helix. The heme group is shown in red sticks as reference; Figure S9: Graphical representation of the shapes of the volume conforming the heme channel (in blue) with respect to the heme group (red spheres); Figure S10: Frequency distribution of the dihedral angle variations of residues Phe76 (panels A and B) and Phe191 (panels C and D) during the last 40 ns of MD simulation; Figure S11: Graphical representation of a segment of the multiple sequence alignment of subfamily I (A and C) and subfamily V (B and D), according to the UPO classification in reference 13. Subfamily I is represented by sequences of 12 putative UPOs and AaeUPO, whereas subfamily V comprises sequences from 8 putative UPOs. The residues numbering corresponds to AaeUPO. The image was created with WebLogo; Figure S12: Upper view of the substrate access channel of PaDa-I (PDB: 5OXU). Heme group is represented as red spheres. The N-glycosylation sites are shown in orange sticks (Asn residues 11, 141, 161, 182 and 286). Special protonated residues according to PropKa (Asp85, His82, His118, His251) are also shown in sticks and are located away from the heme channel; Table S1: Residues with increased (+) or decreased (-) mobility with respect to PaDa-I, according to ΔRMSF. Residues with changes in mobility that occur in more than one enzyme variant are highlighted in orange (+ mobility) or blue (- mobility); Table S2: Oligonucleotide primer sequences used in the generation of PaDa-I mutants. The mutated codon is shown bold and underlined.

Author Contributions: Conceptualization, M.A. (Marcela Ayala) and M.A. (Miguel Alcalde); methodology, M.A. (Marcela Ayala) and N.P.; experimentation, J.R.-R. and J.M.-D.; computational calculations, J.R.-R.; formal analysis, J.R.-R., M.A. (Marcela Ayala), and N.P.; writing—original draft preparation, J.R.-R. and M.A. (Marcela Ayala); writing—review and editing, M.A. (Marcela Ayala), M.A. (Miguel Alcalde), and N.P.; supervision, M.A. (Marcela Ayala); funding acquisition, M.A. (Marcela Ayala) and M.A. (Miguel Alcalde). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by PAPIIT IN209116 and IN214619 and by the Comunidad de Madrid project Y2018/BIO4738-EVOCHIMERA. J.R. was granted the scholarship 404380 awarded by CONACYT-Mexico for his Ph.D. studies.

Acknowledgments: The authors wish to thank Rosa Román (IBt), Fernando González (IBt) and Patricia Molina (CSIC) for their technical support. For the molecular dynamics simulations, UNAM-DGTIC granted access to the Miztli supercomputer through LANCAD-UNAM-DGTIC-293, SC16-1-S-24, SC15-1-S-29, and SC14-1-S-93.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Ullrich, R.; Nüske, J.; Scheibner, K.; Spantzel, J.; Hofrichter, M. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4575–4581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ullrich, R.; Hofrichter, M. The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6247–6250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hofrichter, M.; Ullrich, R. Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 116–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kluge, M.; Ullrich, R.; Dolge, C.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. Hydroxylation of naphthalene by aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 1071–1076. [[CrossRef](#)]

5. Aranda, E.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation* **2010**, *21*, 267–281. [[CrossRef](#)]
6. Peter, S.; Kinne, M.; Wang, X.; Ullrich, R.; Kayser, G.; Groves, J.T.; Hofrichter, M. Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase. *FEBS J.* **2011**, *278*, 3667–3675. [[CrossRef](#)]
7. Kinne, M.; Poraj-Kobielska, M.; Ralph, S.A.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Hammel, K.E. Oxidative Cleavage of Diverse Ethers by an Extracellular Fungal Peroxygenase. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29343–29349. [[CrossRef](#)]
8. Babot, E.D.; del Río, J.C.; Cañellas, M.; Sancho, F.; Lucas, F.; Guallar, V.; Kalum, L.; Lund, H.; Gröbe, G.; Scheibner, K.; et al. Steroid Hydroxylation by Basidiomycete Peroxygenases: A Combined Experimental and Computational Study. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4130–4142. [[CrossRef](#)]
9. Hofrichter, M.; Ullrich, R. Heme-thiolate haloperoxidases: Versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 276–288. [[CrossRef](#)]
10. Ahn, D.H.; Ullrich, R.; Benndorf, D.; Svatos, A.; Muck, A.; Hofrichter, M. The Coprophilous Mushroom *Coprinus radians* Secretes a Haloperoxidase That Catalyzes Aromatic Peroxygenation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5477–5485.
11. Gröbe, G.; Ullrich, R.; Pecyna, M.J.; Kapturska, D.; Friedrich, S.; Hofrichter, M.; Scheibner, K. High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express* **2011**, *1*, 31–41. [[CrossRef](#)]
12. Kiebist, J.; Schmidtke, K.; Zimmermann, J.; Kellner, H.; Jehmlich, N.; Ullrich, R.; Zänder, D.; Hofrichter, M.; Scheibner, K. A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* Catalyzes the Selective Oxygenation of Testosterone. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 563–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Faiza, M.; Huang, S.; Lan, D.; Wang, Y. New insights on unspecific peroxygenases: Superfamily reclassification and evolution. *BMC Evol. Biol.* **2019**, *19*, 76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hofrichter, M.; Kellner, H.; Herzog, R.; Karich, A.; Liers, C.; Scheibner, K.; Kimani, V.W.; Ullrich, R. Fungal peroxygenases: A phylogenetically old superfamily of heme enzymes with promiscuity for oxygen transfer reactions. In *Grand Challenges in Fungal Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*; Nevalainen, H., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 369–403.
15. Piontek, K.; Strittmatter, E.; Ullrich, R.; Gröbe, G.; Pecyna, M.J.; Kluger, M.; Scheibner, K.; Hofrichter, M.; Plattner, D.A. Structural Basis of Substrate Conversion in a New Aromatic Peroxygenase: Cytochrome P450 functionality with benefits. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 34767–34776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ramirez-Escudero, M.; Molina-Espeja, P.; Gomez de Santos, P.; Hofrichter, M.; Sanz-Aparicio, J.; Alcalde, M. Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3259–3268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sundaramoorthy, M.; Ternier, J.; Poulos, T.L. The crystal structure of chloroperoxidase: A heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* **1995**, *3*, 1367–1377. [[CrossRef](#)]
18. Olmedo, A.; del Rio, J.C.; Kiebist, J.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Scheibner, K.; Martinez, A.T.; Gutierrez, A. From Alkanes to Carboxylic Acids: Terminal Oxygenation by a Fungal Peroxygenase. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 16985–16989. [[CrossRef](#)]
19. Peter, S.; Kinne, M.; Ullrich, R.; Kayser, G.; Hofrichter, M. Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase. *Enz. Microb. Technol.* **2013**, *52*, 370–376. [[CrossRef](#)]
20. Ayala, M.; Pickard, M.A.; Vazquez-Duhalt, R. Fungal Enzymes for Environmental Purposes, a Molecular Biology Challenge. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *15*, 172–180. [[CrossRef](#)]
21. Wang, Y.; Lan, D.; Durrani, R.; Hollmann, F. Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 1–9. [[CrossRef](#)]
22. Garcia-Guevara, F.; Avelar, M.; Ayala, M.; Segovia, L. Computational Tools Applied to Enzyme Design—A review. *Biocatalysis* **2015**, *1*, 109–117. [[CrossRef](#)]
23. Molina-Espeja, P.; Canellas, M.; Plou, F.J.; Hofrichter, M.; Lucas, F.; Guallar, V.; Alcalde, M. Synthesis of 1-Naphthol by a Natural Peroxygenase Engineered by Directed Evolution. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 341–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gomez de Santos, P.; Canellas, M.; Tieves, F.; Younes, S.H.H.; Molina-Espeja, P.; Hofrichter, M.; Hollmann, F.; Guallar, V.; Alcalde, M. Selective Synthesis of the Human Drug Metabolite 5'-Hydroxypropranolol by an Evolved Self-Sufficient Peroxygenase. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 4789–4799. [[CrossRef](#)]

25. Molina-Espeja, P.; Garcia-Ruiz, E.; Gonzalez-Perez, D.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Alcalde, M. Directed Evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3496–3507. [CrossRef] [PubMed]
26. Samanta, S.K.; Singh, O.V.; Jain, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 243–248. [CrossRef]
27. Ortiz de Montellano, P.R. Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*; Torres, E., Ayala, M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 79–107.
28. Polizzi, K.M.; Bommarius, A.S.; Broering, J.M.; Chaparro-Riggers, J.F. Stability of biocatalysts. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 220–225. [CrossRef]
29. Valderrama, B.; Ayala, M.; Vazquez-Duhalt, R. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 555–565. [CrossRef]
30. Ayala, M.; Batista, C.V.; Vazquez-Duhalt, R. Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 63–68. [CrossRef]
31. Karich, A.; Scheibner, K.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *134*, 238–246. [CrossRef]
32. *Schrödinger Release 2014-2: Maestro*, Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2014; Available online: <https://www.schrodinger.com/maestro> (accessed on 9 August 2020).
33. Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; et al. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. In Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, FL, USA, 11–17 November 2006.
34. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [CrossRef]
35. Wagner, J.R.; Sørensen, J.; Hensley, N.; Wong, C.; Zhu, C.; Perison, T.; Amaro, R.E. POVME 3.0: Software for Mapping Binding Pocket Flexibility. *J. Chem. Theory Comp.* **2017**, *13*, 4584–4592. [CrossRef] [PubMed]
36. Gonzalez-Perez, D.; Garcia-Ruiz, E.; Alcalde, M. *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution. An efficient tool to improve enzymes. *Bioeng. Bugs* **2012**, *3*, 172–177. [PubMed]
37. Childs, R.E.; Bardsley, W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* **1975**, *145*, 9–103. [CrossRef] [PubMed]
38. Poraj-Kobielska, M.; Kinne, M.; Ullrich, R.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases. *Analyt. Biochem.* **2012**, *421*, 327–329. [CrossRef] [PubMed]
39. Kluge, M.G.; Ullrich, R.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 1473–1478. [CrossRef]
40. Noble, R.W.; Gibson, Q.H. The Reaction of Ferrous Horseradish Peroxidase with Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2409–2413.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).