



UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE RECURSOS NATURALES

**ESTUDIO RACIONAL DEL MECANISMO DE UNIÓN Y CATALÍTICO
DE ALCOHOL VERATRÍLICO EN LIGNINO PEROXIDASA H8 DE
Phanerochaete chrysosporium: UNA ESTRATEGIA
IN-SILICO/EXPERIMENTAL**

JEFFERSON ONEIVER ROMERO MARULANDA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE
PRODUCTOS BIOACTIVOS

Director de tesis:

Dr. Jans Alzate-Morales

Co-director de tesis:

Dr. Mauricio Arenas Salinas

Talca, 9 de Agosto de 2019



UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE RECURSOS NATURALES

**ESTUDIO RACIONAL DEL MECANISMO DE UNIÓN Y CATALÍISIS
DEL ALCOHOL VERATRÍLICO EN LIGNINO PEROXIDASA H8 DE
Phanerochete chrysosporium: UNA ESTRATEGIA
IN-SILICO/EXPERIMENTAL**

JEFFERSON ONEIVER ROMERO MARULANDA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jans Alzate Morales | jalzate@utalca.cl
Centro de Bioinformática y Simulación Molecular | Universidad de Talca

CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. Mauricio Arenas Salinas | marenas@utalca.cl
Centro de Bioinformática y Simulación Molecular | Universidad de Talca

COMISION EVALUADORA:

Experto 1: **Dr. Simón Ruiz Lara** | sruiz@utalca.cl
Instituto de Ciencias Biológicas | Universidad de Talca

Experto 2: **Dr. Felipe Arenas Salinas** | felipe.arenass@usach.cl
Facultad de Química y Biología | Universidad Santiago de Chile

Experto 3: **Dra. Margarita Gutiérrez Cabrera** | mgutierrez@utalca.cl
Instituto de Química de Recursos Naturales | Universidad de Talca

Experto 4: **Dra. Wendy González Díaz** | wgonzalez@utalca.cl
Centro de Bioinformática y Simulación Molecular | Universidad de Talca

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

RESUMEN

La enzima lignino peroxidasa (LiP) y el alcohol veratrílico (AV) desempeñan un papel clave en el proceso de degradación de la lignina llevado a cabo por hongos de la podredumbre blanca. Su aplicación tiene un potencial uso en procesos industriales y biotecnológicos, sin embargo, su uso a gran escala y a nivel industrial requiere de la optimización de la catálisis y estabilidad de esta enzima. Esta problemática requiere ser estudiada y solucionada empleando ingeniería de proteínas, la cual adapta e implementa metodologías experimentales y computacionales para el diseño racional de enzimas con afinidad específica por un sustrato.

Considerando la problemática anteriormente descrita, en **esta tesis se planteó como objetivo general**: caracterizar y racionalizar el rol de los aminoácidos cercanos al residuo Trp171 en el ciclo catalítico de LiPH8 mediante análisis de mutagénesis sitio dirigida y técnicas de modelado y simulación computacional.

Para llevar a cabo el objetivo general, e implementar una solución factible, fue propuesta una estrategia multidisciplinaria, que involucró la sinergia entre las áreas de bioinformática, química y biotecnología. **La metodología de investigación implementada consistió en**: (1) estudiar las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8 por medio de herramientas de modelado y simulación computacional, (2) generar y caracterizar las mutantes de LiPH8 y evaluar sus parámetros cinéticos, y (3) finalmente, estudiar en detalle la función de cada uno de los residuos del microambiente ácido alrededor del residuo Trp171 en la catálisis de LiPH8.

Como resultados finales de esta tesis se obtuvieron 19 enzimas mutantes de LiPH8; entre las cuales las mutantes simples E168Q y E250Q permitieron identificar como residuos cruciales para la unión de AV y la catálisis enzimática a E168 y E250, respectivamente. Estos resultados experimentales se racionalizaron a través del cálculo de las energías de interacción enzima-sustrato (a un nivel mecánico cuántico semiempírico) y la deslocalización de la densidad de espín obtenida a través de cálculos QM/MM.

Palabras claves: Lignino peroxidasa, alcohol veratrílico, densidad de espín, ingeniería de proteínas, mutagénesis sitio dirigida, modelado y simulación computacional.

ABSTRACT

The lignin peroxidase (LiP) enzyme and its substrate veratryl alcohol (VA) play a key role in the degradation process of lignin that is carried out by white rot fungi. This enzymatic system has a potential application in industrial and biotechnological processes. However, its use on a large scale and at an industrial level requires the optimization of the catalysis and stability of LiP enzyme. This problem could be studied and solved using protein engineering, which adapts and implements experimental and computational methodologies to rationally design enzymes with specific affinity for a substrate.

Considering the abovementioned issue, **this doctoral thesis aims to** characterize and rationalize the role of the amino acids close to Trp171 in the catalytic cycle of LiPH8 using site-directed mutagenesis analysis, computational modeling and simulations.

In order to carry out the main goal and to find out a potential solution, a multidisciplinary strategy was proposed, which involved the synergy between the areas of bioinformatics, chemistry and biotechnology. **The implemented research methodology consisted in:** (1) To study the intermolecular interactions between VA and LiPH8 by means of computational modeling and simulation tools, (2) To generate and characterize the LiPH8 mutants and to evaluate their kinetic parameters, and (3) to study in detail the role of each residue around the acid microenvironment of Trp171 in the catalysis of LiPH8.

As final results of this thesis, 19 mutant enzymes of LiPH8 were obtained; from which E168Q and E250Q mutants permitted to identify as crucial residues for the binding of VA and the LiP enzyme catalysis to the residues E168 and E250, respectively. These latter experimental results were rationalized through the estimation of enzyme-substrate interaction energies (at a semi-empirical quantum mechanical level) and the delocalization of the spin density obtained through the QM / MM calculations.

Key words: Lignin peroxidase, veratryl alcohol, spin density, protein engineering, site-directed mutagenesis, modeling and computational simulation.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Bioinformática y Simulación Molecular (CBSM) de la Universidad de Talca y una estancia en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España. Ha sido financiada por la beca para estudios de posgrado de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) a través del Programa de Formación de Capital Humano Avanzado (PFCHA) del gobierno de Chile Folio N° 21160905.

El tener la posibilidad de optar al título de doctor es la materialización del esfuerzo y perseverancia con que mis maestros me han formado; por ello quiero agradecer a las tres grandes profesoras que han dejado huella en mi formación:

- Albanelly Franco, mi profe de química en el colegio que me sembró mil dudas en la cabeza a través de las lindas vivencias que tuve en el club de ciencia “*verde que te quiero verde*” del programa de Ondas de Colciencias.
- Silvia Luz Jiménez Ramírez, mi tutora en el programa de ofidismo y escorpionismo de la Universidad de Antioquia y quién fue la responsable de aterrizar mi curiosidad y darle un piso firme para que visionara el continuar un posgrado. Profe, el último de tus polluelos lo logró, gracias por dejar legado, el espíritu amazónico no se apaga, perdura en cada uno de nosotros.
- Elena Fernández Fueyo, mi asesora en la estancia realizada en el CIB-CSIC. mil gracias ele por apoyarme tanto y exigirme a tener si o sí resultados para esta tesis, sin tu apoyo y compromiso no hubiese sido posible.

También me gustaría dar las gracias a los colaboradores esenciales que ayudaron a completar este trabajo: el Dr. Ángel T. Martínez y Dr. Victor Guallar. El tener la oportunidad de realizar una estancia en sus grupos de trabajo me permitió aprender demasiado del mundo de las peroxidasas.

A mis amigos Fabián Ávila, Anita María Méndez, Alberto Burgos, Viviana Donoso y Yerko Argandoña, su apoyo, paciencia y voz de animó en mis momentos de desanimo permitió que el camino fuera mas llevadero. Los días en Talca no hubiesen sido igual sin ustedes.

A mis compañeros Isabel Fuenzalida y Rodrigo Recabarren, sus enseñanzas del mundo bioinformático explicándomelo con peras y manzanas me permitió acercarme amigablemente al mundo bioinfo. Gracias chiquillos.

A mis amigos de aventuras amazónicas Martins, Pipo, Cami y Pau, gracias por su amistad y apoyo en estos años en Chile, el visitar Santiago de vez en vez para despejar la mente ayudo bastante chiquillos. Gracias.

Por último y no menos importante quiero agradecer a mi familia, mis padres, quienes siempre han apoyado el continuar de mis estudios y con esmero han apoyado a ello. Papá, mamá creo que no estudio más por ahora... al fin acabé.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág
PORTADA	1
DIRECTOR Y COMISIÓN EVALUADORA	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1- Problema identificado y desarrollo científico/tecnológico alcanzado	14
1.2- Estado del arte de LiPH8 de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
1.3- Novedad, relevancia e impacto de la tesis	22
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
2.1- Hipótesis	25
2.2- Objetivos	25
2.2.1- Objetivo general	25
2.2.2- Objetivos específicos	25
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1- Materiales y métodos para el objetivo N° 1.....	27
3.1.1- Descripción de los parámetros iniciales del sistema.....	27
3.1.2- Estudios de simulación por dinámica molecular (SDM).....	28
3.1.3- Análisis de las simulaciones de dinámica molecular	29
3.2- Materiales y Métodos para el objetivo N° 2.....	29
3.2.1- Clonamiento del gen de LiPH8	30
3.2.2- Generación de los mutantes por PCR	30
3.2.3- Producción enzimática	31
3.2.4- Activación <i>in vitro</i> de LiPH8 y sus variantes	32
3.2.5- Purificación y caracterización de LiPH8 y sus variantes	33
3.2.6- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y sus variantes	34
3.3- Materiales y Métodos para el objetivo N° 3.....	34
3.3.1- Generación de los mutantes por PCR, producción enzimática, activación <i>in vitro</i> , purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos	34
3.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel cuántico semiempírico	35

3.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1- Resultados y discusión del objetivo N° 1.....	40
4.1.1- Parámetros de descripción del sistema	40
4.1.2- Análisis del mecanismo de unión de AV y AV ⁺ a LiPH8 a través de simulaciones de dinámica molecular.....	42
4.2- Resultados y discusión del objetivo N° 2.....	48
4.2.1- Generación de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	48
4.2.2- Producción enzimática de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	49
4.2.3- Purificación de LiPH8 y las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	50
4.2.4- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y las variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	52
4.3- Resultados y discusión del objetivo N° 3.....	54
4.3.1- Generación de los mutante del entorno ácido de Trp171 por PCR, producción enzimática, activación in vitro, purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos.....	54
4.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel semiempírico de mecánica cuántica.....	63
4.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín	68
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	81
Anexo 1. Publicación científica 2019.....	81
Anexo 2. Capítulo de Libro 2017.....	82
Anexo 3. Póster congreso nacional 2017.....	83
Anexo 4. Partidores mutagénicos empleados para generar los variantes de LiPH8 y VP.....	84
Anexo 5. Análisis de RMSD para LiPH8 y los mutantes del entorno ácido....	85
Anexo 6. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV ⁺	86
Anexo 7. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV(ESP).....	89
Anexo 8. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV(OPLS).....	92
Anexo 9. Alineamiento múltiple del DNA plasmidial de LiPH8 y los plásmidos mutagénicos de los mutantes del entorno ácido del Trp171.....	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1 Estructura de la biomasa lignocelulósica con una representación esquemática y estructural de la celulosa, hemicelulosa y lignina	15
Figura 1.2.1. Estructura de LiPH8 y detalle del entorno del grupo Hemo.....	18
Figura 1.2.2. Ciclo catalítico de LiP.....	20
Figura 3.1.2.1 Script usado para el calculo del SASA.....	29
Figure 3.2.2.1. Workflow para calcular las ΔE de los complejos de molécula1-molécula2.....	36
Figura 4.1.1.1 Cargas parciales atómicas de cada átomo del AV en los sistemas AV(OPLS), AV(ESP) y AV ⁺⁺	41
Figura 4.1.1.2. Superficies del potencial electrostático para el AV en los sistemas AV(OPLS), AV(ESP) y AV ⁺⁺	42
Figura 4.1.2.1. Perfiles de interacción de residuos para las DM de 1 μ s de los sistemas combinados: LiP-AV ⁺⁺ ,LiP-AV(ESP) y LiP-AV(OPLS).....	44
Figura 4.1.2.2. Componentes de las energías de interacción para la DM de 1 μ s en los sistemas LiP-AV ⁺⁺ y LiP-AV (OPLS).....	47
Figura 4.2.1.1. Alineamiento múltiple de la secuencia de LiPH8 con los mutantes del sitio accesorio F129A, P164A, I268A, Q274A y P279A.....	49
Figura 4.2.2.1. Análisis de expresión para LiPH8 y mutante F129A por SDS-PAGE.....	49
Figura 4.2.3.1. Cromatograma del perfil de elución de LiPH8 en una columna Resource Q a 280nm y 410nm y un gradiente de NaCl.....	50
Figura 4.2.3.2. SDS-PAGE de las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	50
Figura 4.2.3.3. Espectros UV-Visible de LiPH8 y las 4 variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	51
Figura 4.2.4.1. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.	53
Figura 4.2.4.2. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de peroxidasa fúngicas LiP, MnP, VP, CIP y otras peroxidasa.....	53
Figura 4.3.1.1. SDS-PAGE de las enzimas mutantes del entorno ácido del Trp171...	55
Figura 4.3.1.2. Espectros UV-Visible variantes del entorno ácido alrededor del Trp171 de LiPH8.	56
Figura 4.3.1.3. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y mutantes del entorno ácido alrededor de Trp171.	60

Figura 4.3.1.4. SDS-PAGE y Espectro UV-Visible para la variante E243Q de VP.....	61
Figura 4.3.1.5. Cinéticas de la oxidación de AV, DMP ABTS y Mn^{2+} por VP y mutante E243Q.....	63
Figura 4.3.2.1. Correlación entre (A) Valores experimentales de % de actividad residual vs ΔE de los sistemas Trp/AV ⁺ y (B) valores experimentales de K_{cat} vs Valores promedio del SASA del Trp171.....	66
Figura 4.3.2.2. Análisis de SASA para Trp171 en los sistemas de la enzima silvestre y mutantes.....	67
Figura 4.3.2.3. Principales interacciones de Trp171-AV ⁺ en los 100 complejos con menores valores de energía para LiPH8 nativa, mutante E250Q y mutante D264N.....	68
Figura 4.3.3.1. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 y AV.....	70
Figura 4.3.3.2. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 y Hemo.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.2.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), V_{max} (s^{-1}) y V_{max}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV por LiPH8 y mutantes del entorno ácido de Trp171 reportado por Smith <i>et al.</i> ¹	21
Tabla 4.1.1.1. Cargas parciales atómicas para cada átomo del AV en los sistemas AV^{+} , AV(ESP) y AV(OPLS).....	40
Tabla 4.2.4.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	52
Tabla 4.3.1.1. Valores R_z de las variantes del entorno ácido alrededor de Trp171 en LiPH8.....	56
Tabla 4.3.1.2. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y variantes del entorno ácido alrededor de Trp171.....	58
Tabla 4.3.1.3. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP, ABTS y Mn^{2+} por VP y variante E243Q.....	62
Tabla 4.3.2.1. Valores promedio de ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (neutro y radical catiónico) y los 9 aminoácidos (aa) localizados a menos de 5.5 Å alrededor de Trp171.....	64
Tabla 4.3.2.2. Valores promedio de ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (radical catiónico) y cada uno de los aminoácidos mutados en el entorno ácido del Trp171(MAA).....	64
Tabla 4.3.2.3. Valores promedio del ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (neutro y radical catiónico) y los segmentos de 5.5Å alrededor del Trp171 en la enzima silvestre (SEG) y mutantes (MSEG). El valor de SASA (Å^2) es también especificado.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE	: Energía de interacción
ABTS	: 2,2-azino-bis[3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonato]
AV	: Alcohol veratrílico
CcP	: Citocromo c peroxidasa
CiP	: <i>Coprinus cinereus</i> peroxidasa
DMP	: 2,6-dimetoxifenol
DTT	: 1,4-ditiotreitol
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	: Resonancia paramagnética
GSSG	: Glutación disulfuro
HMF	: 5-hidroximetilfurfural
HQ	: Hidroquinona
HRP	: Peroxidasa del rábano
IPTG	: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
LiP	: Lignino peroxidasa
LMS	: Sistema mediador de lacasa
LRET	: Ruta de transferencia electrónica de largo alcance
MnP	: Manganeso peroxidasa
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
QM/MM	: Mecánica cuántica / mecánica molecular
SASA	: Área de Superficie Accesible al Solvente
SDM	: Simulación de dinámica molecular
SEG	: Segmento molecular
SEGM	: Segmento molecular mutado
SID	: Simulation interaction diagram
SQM methods	: Semiempirical quantum mechanical methods
VAD	: Veratraldehído
VP	: Versátil peroxidasa

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1- Problema identificado y desarrollo científico/tecnológico alcanzado.

En un intento por mitigar el impacto ambiental generado por el uso de combustibles fósiles, la comunidad científica internacional ha venido prestando interés en investigar el uso de nuevas tecnologías para la producción de energía valorizando la biomasa lignocelulósica, la cual es la fuente de combustible orgánico más abundante en el mundo. Los biocombustibles como el bioetanol, biohidrógeno, biogas, biodiesel, bio-aceite, gas biosintético y biochar se producen actualmente a partir de material lignocelulósico².

La producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico considera tres etapas: 1) pre-tratamiento, 2) sacarificación y 3) fermentación. En el proceso de pre-tratamiento se modifica la estructura lignocelulósica permitiendo que durante la sacarificación se dé la transformación enzimática de celulosa y hemicelulosa en monosacáridos como glucosa y xilulosa, los cuales serán biotransformados en etanol durante el proceso de fermentación³. Actualmente los procesos de pre-tratamiento utilizan metodologías de alto gasto energético (altas presiones y temperaturas) y compuestos químicos oxidantes como NaOH y H₂SO₄. Kumari *et al.*⁴ y Hu *et al.*⁵ describen en sus revisiones los pre-tratamientos más empleados en la actualidad y, brevemente, exponen los cambios estructurales y químicos del material lignocelulósico al ser procesado empleando las diferentes metodologías⁵. Así, teniendo presente que la estructura del material lignocelulósico se compone de celulosa (38-50%), hemicelulosa (23-32%) y lignina (10-25%) (Ver Figura 1.1.1); y que la lignina y la hemicelulosa actúan como barreras físicas que previenen la degradación enzimática de la celulosa por acción de celulasas durante la hidrólisis enzimática, los diferentes procesos buscan hacer más disponible la celulosa. Sin embargo, la mayoría de esos procesos son ineficientes en la degradación de lignina; la cual en conjunto con compuestos secundarios no deseados que se generan: compuestos fenólicos, vainillina, furfural, 5-hidroxi metilfurfural (HMF) y ácido fórmico, ejercen un rol negativo en el proceso subsiguiente de sacarificación porque inhiben la catálisis de las celulasas.

Específicamente, la lignina impide la acción enzimática de las celulasas por dos mecanismos competitivos: 1) uniéndose a la superficie hidrofóbica de la celulosa, la cual es

de unión preferencial para las celulasas y 2) interactuando con los aminoácidos específicos Tirosina 466, 492 y 493, los cuales reconocen la celulosa en la celulasa de *Trichoderma reesei* (TrCel7A)⁶.

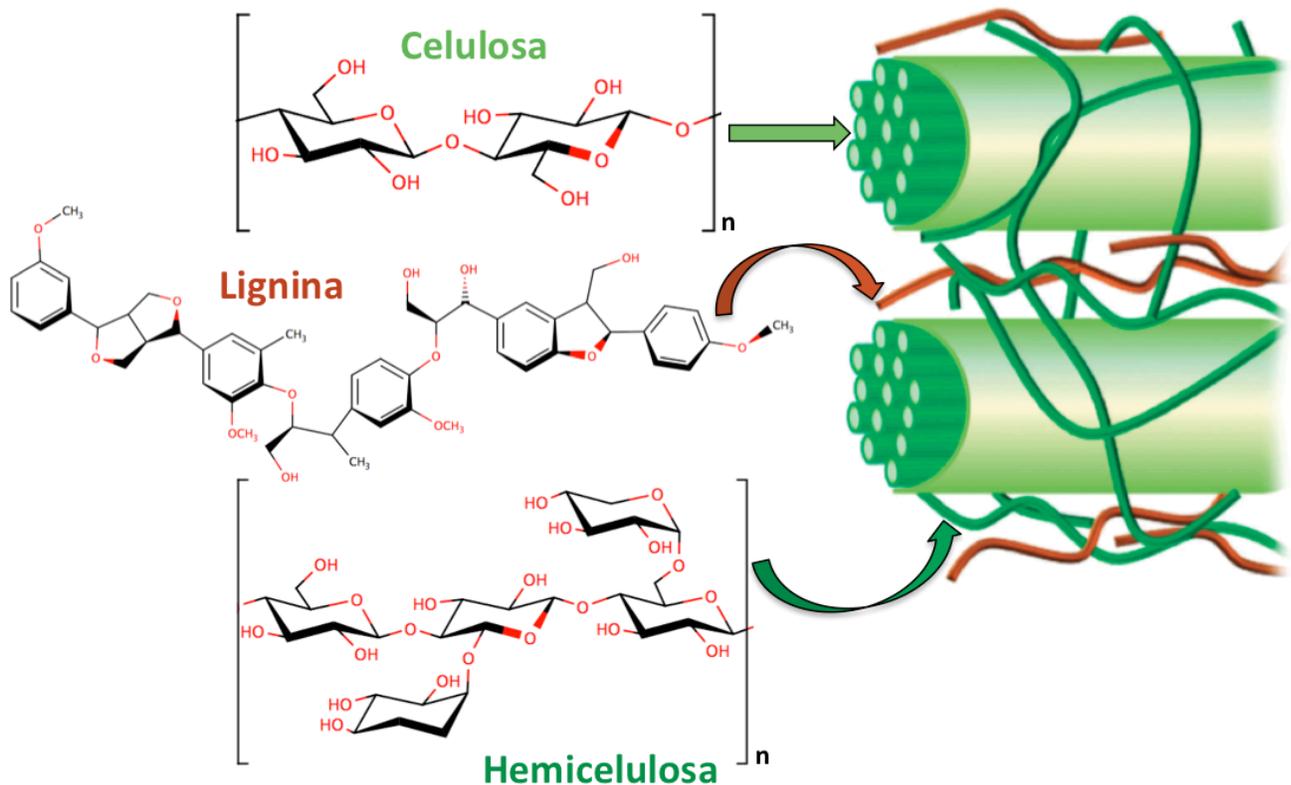


Figura 1.1.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Representación esquemática y estructural de la celulosa, hemicelulosa y lignina (Adaptado de Alonso et al.⁷)

Para mitigar el efecto tanto de la lignina como de otros agentes inhibitorios de las celulasas durante el proceso de pre-tratamiento y sacarificación, diferentes mecanismos han sido descritos: 1) adicionar mayor concentración de celulasas o de celulosa durante el proceso de sacarificación. Así, al aumentar la concentración de enzima o de sustrato, se disminuye la probabilidad de obtener enzimas inactivas dado que existe mayor afinidad entre el sustrato (celulosa) y enzima (celulasa) que entre inhibidor y enzima⁸. 2) Adicionar agentes surfactantes como tween 40 y 80, ya que estos disminuyen la adsorción de las celulasas sobre la lignina^{9,10}. 3) Adicionar albumina de suero de bovino (BSA), la cual se adsorbe sobre la superficie de la lignina y evita la interacción lignina-celulasa¹¹. 4) Adicionar sales de iones divalentes, donde la interacción de estos iones con la superficie de la lignina disminuye la carga negativa de esta y por ende debilita las interacciones

electrostáticas entre la lignina y las celulasas^{12,13}. 5) Modificar la lignina por medio de sulfonaciones y carboxilaciones para disminuir su carácter hidrofóbico y por ende disminuir su interacción con las celulasas¹⁴. Adicionalmente a las metodologías descritas, se han explorado tecnologías sustentables como el uso de enzimas lignocelulósicas durante el pre-tratamiento para con ello moderar los efectos de la lignina y sus subproductos fenólicos sobre las celulasas⁶.

En la naturaleza diferentes organismos degradan lignina, los más efectivos son los hongos de la podredumbre blanca, algunos ascomicetes y basidiomicetes, los cuales mediante la secreción de enzimas como: lacasas, manganeso peroxidasa (MnP), lignino peroxidadas (LiP) y versátil peroxidasa (VP), son capaces de degradar la lignina para emplearla en su metabolismo como fuente de carbono. Así, en los procesos de producción de biocombustibles se aprovecha esta capacidad y, por tanto, los microorganismos y sus enzimas lignolíticas han venido siendo empleados con dos principales propósitos: deslignificación y detoxificación. La deslignificación se emplea para reducir el contenido de lignina en el material vegetal lignocelulósico y la detoxificación para reducir la presencia de compuestos tóxicos que se generan en las biomásas tras ser sometidas a tratamientos químicos y/o físico-químicos del material lignocelulósico¹⁵.

El proceso de deslignificación se ha abordado mediante la aplicación de cuatro metodologías: 1) deslignificación fúngica, en la cual los microorganismos son directamente inoculados en la biomasa objetivo de degradación, 2) deslignificación enzimática, en la cual se aplican extractos enzimáticos purificados o semi-purificados de enzimas lignocelulósicas, 3) sistema mediador de lacasa (LMS), el cual usa mediadores redox (ABTS, HBT) que difunden en la matriz a deslignificar y permiten mejorar la actividad catalítica de las lacasas y 4) fermentación fúngica integrada (IFF) que emplea microorganismos como *Phlebia* sp. MG-60 que degrada lignina y produce etanol a partir de la celulosa. Estas metodologías han sido combinadas estratégicamente con algunos pre tratamientos físicos y físico-químicos, dado que al descomponer la estructura del material lignocelulósico se facilita la colonización de los hongos y permite mejorar los porcentajes de degradación de lignina, obtención de etanol y disminución de productos tóxicos^{16,17}. Sin embargo, el alto tiempo de incubación y las dificultades para el crecimiento de los hongos a

escalas industriales limitan la aplicación futura de esta estrategia a nivel industrial. Por ello, las investigaciones se han enfocado en emplear la deslignificación enzimática, metodología en la que se ha visualizado que el combinar las diferentes enzimas lignocelulósicas maximiza la deslignificación¹⁸. Mediante el uso de la ingeniería de proteínas como herramienta para mejorar la catálisis enzimática y estabilidad de las enzimas lignocelulósicas, se puede potenciar la aplicación de esta metodología^{3,15}.

La ingeniería de proteínas usa tres enfoques: diseño racional, semi-racional y evolución dirigida. El diseño racional realiza la modificación molecular mediante mutaciones sitio dirigidas de las proteínas usando información estructural como fundamento para la modificación específica de la secuencia aminoacídica. El diseño semi-racional emplea la mutagénesis por saturación para reemplazar los codones de aminoácidos seleccionados (hotspots) por los 19 aminoácidos adicionales. El diseño por evolución dirigida en ausencia de información estructural, emplea metodologías como mutaciones aleatorias y recombinación de genes para desarrollar el diseño enzimático¹⁵. **Caracterizar bioquímica y estructuralmente las enzimas con potencial aplicación en los procesos de deslignificación, permitirá conseguir grandes avances en la producción de biocombustibles**¹⁹. Por ello, el presente trabajo doctoral tuvo por objetivo caracterizar el rol de los aminoácidos cercanos a Trp171 en el ciclo catalítico de la enzima lignolítica con mayor potencial de oxidación, lignino peroxidasa H8 (LiPH8) de *Phanerochaete chrysosporium* mediante análisis de mutagénesis sitio dirigida y técnicas de modelado computacional que abarcan simulación de dinámica molecular, métodos cuánticos semiempíricos y métodos híbridos QM/MM.

1.2- Estado del arte de LiPH8 de *Phanerochaete chrysosporium*.

La enzima LiPH8 fue descrita por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* por Ming y Kirk²⁰, y posteriormente varias isoformas se han descrito en diferentes microorganismos y otros hongos de la podredumbre blanca. Choinowski *et al.*²¹ describieron la estructura cristalina de LiPH8 e indicaron que la enzima contiene 1 ion de Fe³⁺ unido a un anillo hemo de tipo b (ferriprotoporfirina IX) por mol de proteína, posee una estructura globular de dimensiones aproximadas de 50Å x 40Å x 40Å (ejes X, Y y Z,

respectivamente) y se compone por un dominio proximal (C-terminal) y uno distal (N-terminal). En medio de estos dominios, el grupo hemo está incrustado y es accesible desde el solvente vía dos canales pequeños.

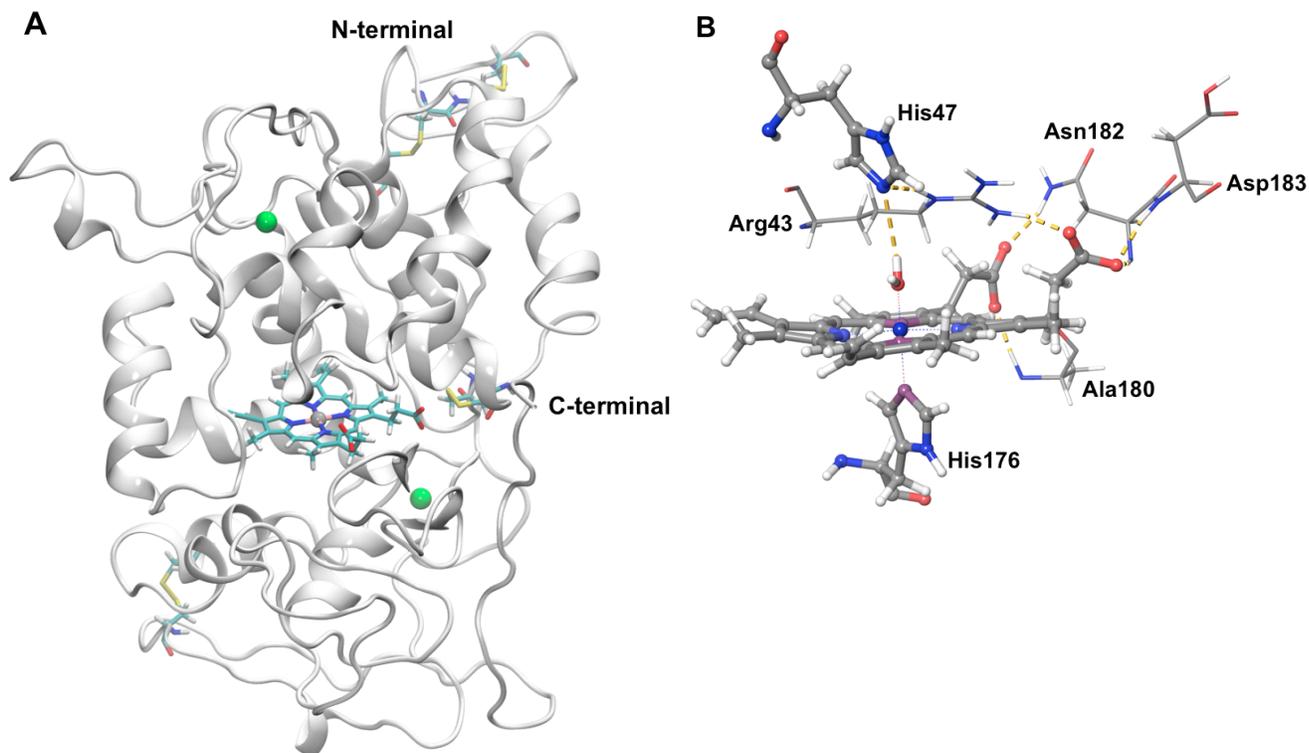


Figura 1.2.1. (A) Estructura de LiPH8 en la que se destaca grupo prostético hemo y residuos de cisteína (representados en barras) e iones estructurales de calcio (representados en esferas verdes). (B) Grupo hemo y sus interacciones con los residuos de anclaje a LiPH8 (las líneas amarillas entrecortadas representan enlaces de hidrógeno). Modelos generados a partir de la estructura cristalográfica de LiPH8 de *Phanerochaete chrysosporium* (PDB: 1LLP).

La estructura secundaria de LiPH8 se compone de 16 α -hélices (8 mayores y 8 menores) y una lámina β en el dominio proximal. LiPH8 tiene 8 residuos de Cys, todos formando enlaces disulfuro. Hay dos sitios de unión a los iones de calcio, uno en cada dominio. Posiblemente la función de estos iones, como en las manganeso peroxidasas, es de mantener la topología del sitio activo²² (**Figura 1.2.1 A**). La enzima está N-glicosilada en el residuo Asn257 y O-glicosilada en los residuos Ser334 y Thr320. Se ha propuesto que las cadenas de carbohidratos tienen el rol de proteger de la proteólisis de la enzima. El átomo de hierro del grupo hemo está hexa-coordinado por los cuatro nitrógenos tetra pirrol del grupo hemo y por el residuo proximal His176 (átomo N ϵ 2). En el sexto sitio de coordinación del hierro, una molécula de agua enlaza por medio de un enlace de hidrógeno

con el residuo distal His47 (átomo Nε2) y otras dos moléculas de agua (**Ver Figura 1.2.1 B**). El grupo hemo no es plano y tiene un desplazamiento de 0.1Å hacia la histidina distal, se une a la proteína a través de los enlaces de hidrógeno que forman los grupos propionato con Arg43, Ala180, Asn182 y Asp183. El sitio de unión al peróxido está localizado sobre el lado distal del grupo hemo con un canal extendido al exterior de la proteína y está formado por los residuos Arg43, Phe46 e His47. De estos residuos, Arg43 e His47 son residuos conservados en las peroxidasas, mientras que Phe46 no lo es. El residuo Arg43 estabiliza las cargas negativas durante la unión del peróxido y estabiliza el oxígeno que interactúa con el ion del hierro en el complejo LiP-I; mientras el residuo distal His47 actúa como un aceptor de protones del peróxido²³⁻²⁵.

En el bolsillo proximal, el residuo His176 se coordina con el átomo de hierro del grupo hemo y forma enlaces de hidrógeno con Asp238, residuo que ayuda a estabilizar el Fe(IV)-O intermediario en el compuesto I. La triada Asp-His-Fe está conservada en las peroxidasas de las plantas y se ha descrito que influye en el potencial redox de estas enzimas según la basicidad (carácter imidazolato) de la histidina axial; así, se ha descrito que el alto potencial redox de LiP comparado con la citocromo C peroxidasa (CcP) y la peroxidasa del rábano (HRP) es debido al menor carácter imidazolato de la histidina proximal²⁶.

El ciclo catalítico de LiPH8 se ha descrito de forma similar al de las peroxidasas clásicas como HRP. Una molécula de peróxido oxida el estado de reposo de la enzima mediante la sustracción de dos electrones y se genera la formación del compuesto I (LiP-I), el intermediario más activo de la enzima que se caracteriza por presentar dos equivalentes de oxidación en forma de complejo oxo ferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y un catión radicalario π de porfirina ($\text{P}^{\bullet+}$)²⁷. A través de la oxidación de una molécula de sustrato, la enzima recupera un electrón en la porfirina y pasa a formar el compuesto II (LiP-II) que conserva el complejo oxo ferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Finalmente, por la oxidación de una segunda molécula de sustrato, la enzima recupera el segundo electrón y regresa al estado de reposo.²⁸ (**Ver Figura 1.2.2**). A pH 3.0, en la presencia de un exceso de H_2O_2 y en ausencia de algún sustrato, LiP-II reacciona con H_2O_2 para formar una enzima catalíticamente inactiva, conocida como compuesto III (LiP-III)²⁹.

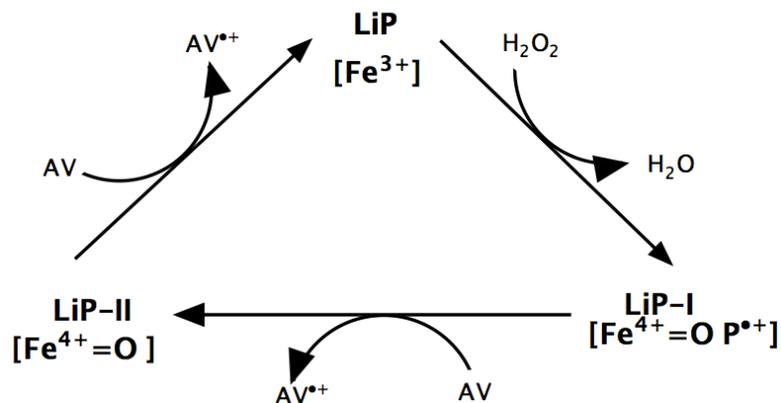


Figura 1.2.2. Ciclo catalítico de LiP.

Durante el ciclo catalítico, el alcohol veratrílico (AV); el sustrato nativo de LiPH8 juega un rol central para prevenir la inactivación de LiPH8 mediada por peróxido³⁰, mejorar la oxidación de otros sustratos por parte de LiPH8³¹ y participar como mediador redox permitiendo la oxidación de algunos sustratos que no son oxidados directamente por LiPH8^{32,33}. Por todo lo descrito, muchas investigaciones se han centrado en estudiar los diferentes mecanismos en los cuales participan LiPH8 y AV. En la mayoría de los casos, ha sido sugerido que el AV actúa como un mediador redox a través de su radical catiónico (AV•⁺)³⁴. Sin embargo, el corto tiempo de vida media de esta especie radicalaria en solución acuosa (17 s⁻¹)³⁵ y la evidencia reciente a través de experimentos de fluorescencia usando el sensor BODIPY 581/591, que demostró que el AV•⁺ no actúa como un oxidante difusible³⁶, han permitido rechazar esta hipótesis. Por tanto, ha tomado importancia la hipótesis sugerida por Khindaria *et al.*³⁷ que establece que los procesos mediados por AV•⁺ son a través de la formación del complejo LiP-AV•⁺, detectado por resonancia paramagnética (EPR).

El aminoácido Trp171 fue identificado como el aminoácido clave para oxidación de AV a veratraldehído (VAD). En los mutantes Trp171Ala y Trp171Ser la oxidación del AV por parte de LiPH8 se anula. Por ello, se identificaron dos sitios de oxidación en LiPH8³⁸, la cavidad hemo (típica de las peroxidasas) y el residuo superficial Trp171. Estudios de mutagénesis de los aminoácidos alrededor del Trp171 determinaron que el microambiente ácido alrededor del Trp171 es importante para estabilizar el AV sobre la superficie de la

enzima dado que al realizar las mutaciones E168Q, E250Q y D165N las constantes cinéticas K_m y V_{max} se vieron afectadas (**Ver Tabla 1.2.1**).¹

Tabla 1.2.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), V_{max} (s^{-1}) y V_{max}/K_m ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}^{-1}$), reportados por Smith *et al.*¹, para la oxidación de AV por LiPH8 y mutantes del entorno ácido de Trp171.

Enzima	K_m (μM)	V_{max} (s^{-1})	V_{max}/K_m ($\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)
LiPH8	190 \pm 2	20.2 \pm 0.6	106.3 \pm 0.3
D264N	193 \pm 14	21 \pm 0.5	107.0 \pm 0.8
D165N	235 \pm 19	8.9 \pm 0.2	38.0 \pm 0.3
E168Q	520 \pm 68	8.1 \pm 0.5	16.0 \pm 0.2
E250Q	458 \pm 22	7.9 \pm 0.2	17.2 \pm 0.1

Recientes estudios de simulación de dinámica molecular (SDM) desarrollados por Recabarren *et al.*³⁹ sugirieron que adicionalmente a las interacciones electrostáticas establecidas con los residuos ácidos, las interacciones hidrofóbicas con algunos residuos de la cavidad hidrofóbica cercana al residuo catalítico Trp171 también ayudarían a estabilizar el AV sobre la superficie de la enzima. Anteriormente, también se sugirió esto a partir de la evidencia desde experimentos de cristalografía de Choinowski *et al.*²¹ sugirió esto también e información previa de Sollewijn *et al.*⁴⁰ que demostró la importancia que juegan las interacciones hidrofóbicas y aromáticas en la interacción LiP-AV. Por ejemplo, al evaluar los parámetros cinéticos para la oxidación de AV en el mutante F267I de LiPH8, la K_m aumentó 3 veces.

Por otro lado, la oxidación de los sustratos en la cavidad hemo es a través del contacto directo con el cofactor; mientras la oxidación en la superficie de LiPH8 compromete una ruta de transferencia electrónica de largo alcance (LRET). En ésta, el residuo Trp171 es activado como una especie radicalaria intermediaria después de que el compuesto I le sustrae un electrón a través de una ruta LRET que ha sido recientemente caracterizada⁴¹. Sin embargo, no se ha obtenido a la fecha evidencia directa de cual es la especie radicalaria formada sobre el Trp171 en LiPH8. Los variantes E250Q y E168Q/E250Q, de forma similar al Trp164 de versátil peroxidasa (VP), presentan un radical neutro (Trp^\bullet)^{42,43}. Bernini *et al.*⁴⁴ desarrollaron cálculos QM/MM (Mecánica

Cuántica/Mecánica Molecular) por medio de los cuales sugirieron que la especie radical catiónico del Trp ($\text{TrpH}^{+\bullet}$) es la de mayor probabilidad de existencia en LiPH8, dado que el ambiente ácido alrededor del Trp171 favorecería la estabilización de la especie catiónica. En el caso de considerarse la especie como radical neutro (Trp^\bullet), la desprotonación del nitrógeno indólico generaría una carga negativa adicional sobre el Trp171 y esta sería difícil de estabilizar en el microambiente ácido donde el Trp171 se encuentra ubicado.

También se ha propuesto que el aminoácido Glu250 desprotonaría el Trp171 en LiPH8 dado que, en la estructura cristalográfica elucidada por Choinowki *et al*²¹. (Código PDB 1LLP), el grupo carboxilo del Glu250 está formando un enlace de hidrógeno con el nitrógeno indólico del Trp171. En cálculos previos de SDM y QM/MM en VP, se evidenció que el residuo Glu243 (homólogo de Glu250 en LiP) participa en un mecanismo paso a paso en el cual después de la transferencia del electrón, el Glu243 desprotona el radical intermedio ($\text{Trp}^{+\bullet}$) y se forma el radical neutro (Trp^\bullet)^{44,45}.

1.3- Novedad, relevancia e impacto de la tesis

Teniendo presente la información estructural de LiPH8 anteriormente descrita, la presente tesis abordó un estudio detallado de las interacciones intermoleculares entre LiPH8 y el sustrato AV por medio de un análisis molecular y complementario aplicando técnicas *in-silico* y experimentales.

En primer lugar, los estudios de SDM permitieron analizar las interacciones enzima-sustrato para el AV en sus estados neutro y radical catiónico. Se detectaron diferentes perfiles de interacción de los residuos de LiPH8 para los sistemas LiP-AV y LiP-AV⁺. A partir de ellos se seleccionaron los principales residuos de LiPH8 que establecieron interacciones con AV, con el fin de evaluar el efecto de su mutación en los parámetros cinéticos de la enzima. Los análisis cinéticos de los mutantes generados demostraron que la mutación simple de los residuos identificados a partir de los cálculos de SDM, que participaban en la interacción de LiPH8 con el AV en su estado neutral, no afectaban la K_m o K_{cat} de la enzima; mientras que los residuos que participan en la estabilización de AV⁺ sí tenían una implicancia. Información complementaria, obtenida por medio de cálculos de

energía de interacción a nivel cuántico semiempírico y estudios de densidad de espín a nivel de teoría QM/MM, esclareció la importancia de cada residuo en la catálisis enzimática.

De los estudios llevados a cabo, se obtuvieron resultados que contribuyen al conocimiento estructural, catalítico y bioquímico de las enzimas lignolíticas, especialmente LiPH8, la cual se pretende emplear en los procesos de deslignificación enzimática mediante su mejoramiento a través de la ingeniería de proteínas. La completa comprensión de la importancia relativa de determinados residuos aminoacídicos en el ciclo catalítico de LiPH8 y la caracterización de la implicancia de cada residuo, permiten avanzar en el planteamiento de estrategias de diseño racional de enzimas lignolíticas con actividad catalítica mejorada. Dos ejemplos exitosos de tal estrategia son el caso reportado por Ruiz-Dueñas *et al*⁴⁶ en el que la capacidad de oxidación por compuestos de naturaleza fenólica fue mejorada en algunas peroxidasa al realizar mutaciones puntuales que agrandan la cavidad de acceso al hemo; o el caso reportado por Doyle *et al*¹., donde por medio de estrategias de diseño racional de enzimas de *nov*o fue posible lograr la catálisis del AV en *Coprinus cinereus* peroxidasa (CiP) al introducir mutaciones puntuales en el microambiente ácido de Trp171 emulando las que se presentan en LiPH8.

CAPÍTULO II:

Hipótesis y objetivos

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La actividad catalítica de LiPH8 es modulada por las interacciones moleculares que se generan entre el AV y algunos de los residuos aminoacídicos cercanos al residuo catalítico Trp171.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Caracterizar el rol de los aminoácidos cercanos a Trp171 en el ciclo catalítico de LiPH8 mediante análisis de mutagénesis sitio dirigida, simulación de dinámica molecular, cálculos cuánticos semiempíricos y de densidad de espín a nivel QM/MM.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Profundizar en el estudio de las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8 por medio de herramientas de simulación de dinámica molecular.
2. Caracterizar la participación de los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 en la capacidad catalítica de LiPH8.
3. Estudiar en detalle la función de cada uno de los residuos del microambiente ácido alrededor del Trp171 en la capacidad catalítica de LiPH8.

CAPÍTULO III:

Materiales y métodos

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Materiales y métodos para el objetivo N° 1:

“Profundizar en el estudio de las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8 por medio de herramientas de simulación de dinámica molecular.”

Para realizar una caracterización más detallada de las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8, fueron llevados a cabo estudios de simulación de dinámica molecular (SDM) en los que se exploró la diferencia de interacción entre AV, en sus estados de radical catiónico y neutro, con la superficie de LiPH8. Para ello fueron desarrolladas las siguientes actividades:

3.1.1- Descripción de los parámetros iniciales del sistema

La estructura cristalográfica de LiPH8 (código PDB: 1LLP)²¹ fue preparada usando la herramienta *“protein preparation wizard”* de la suite de programas de Schrödinger⁴⁷. Los ordenes de enlace, la adición de los átomos de hidrógeno y eliminación de las cuatro moléculas de carbohidratos fueron realizadas utilizando esta herramienta. Los estados de protonación de los residuos de LiPH8 se calcularon con PROPKA⁴⁸ a un valor de pH 3.0. Los residuos Glu168 y Asp264, previamente protonados por PROPKA, fueron manualmente desprotonados. Reportes previos sugieren el estado desprotonado de estos residuos a pH 3.0⁴¹. El grupo hemo fue modelado como compuesto I. Para ello, los parámetros para modelar dicho complejo fueron aplicados según criterios del campo de fuerza OPLS-2005. El átomo de Fe⁺³ fue conectado por medio de enlaces de orden cero a los cuatro átomos de nitrógeno del anillo de porfirina (dos teniendo carga parcial de cero y dos de -1) y además al nitrógeno del grupo indólico de la histidina proximal (His176) y a un átomo de oxígeno coordinando con el Fe³⁺.

Para el AV, las cargas parciales atómicas representando su estado radical catiónico (AV⁺) y su estado neutro (AV) fueron calculadas por medio de cálculos QM/MM “single point” usando el software QSite (Schrödinger)⁴⁹. El nivel de teoría usado fue B3LYP/6-31+G*: OPLS-2005. Las 5 estructuras del complejo LiPH8-AV obtenidas a través de protocolos de docking molecular, y representativas del análisis por clusterización del trabajo previo realizado por Recabarren *et al.*³⁹, fueron empleadas como entrada para los

cálculos QM/MM. El AV fue considerado en la región QM y el resto de la proteína, incluyendo moléculas de agua y iones, fueron considerados en la región MM.

El valor de las cargas parciales de los átomos de AV obtenidas en cada cálculo QM/MM fueron promediadas y asignadas manualmente átomo por átomo para simular el AV en sus estados radicalario (AV^{*+}) y neutro ($AV(ESP)$). De manera adicional, y con el objetivo de establecer comparaciones, se tomaron en consideración las cargas atómicas con que el campo de fuerza OPLS 20005 describe el sustrato AV en su estado neutro. De esta manera se establecieron tres sistemas a ser simulados: LiP-AV(ESP), LiP-AV(OPLS) y LiP-AV $^{*+}$.

3.1.2- Estudios de simulación por dinámica molecular (SDM)

Como se indicó previamente, los sistemas LiP-AV (ESP), LiP-AV(OPLS) y LiP-AV $^{*+}$ fueron simulados empleando dinámica molecular usando el software DESMOND⁵⁰. Cinco simulaciones independientes de 200 ns fueron llevadas a cabo para cada sistema. Las estructuras representativas de los cálculos previamente realizados en nuestro grupo de trabajo fueron las conformaciones iniciales usadas para cada simulación, sólo fueron modificados los valores de las cargas parciales para los átomos del sustrato en cada caso según valores obtenidos en los cálculos QM/MM. Los parámetros para las simulaciones fueron similares a los previamente reportados por Recabarren *et. al*³⁹. Cada sistema fue insertado en una caja ortorrómbica de moléculas de agua SPC y fue neutralizado por adición de iones de Na^+ . Se usó un buffer de moléculas de agua de 10 Å que rodeaba todas las caras de la proteína. Las condiciones periódicas fueron aplicadas sobre los ejes X, Y y Z. El protocolo de relajación en DESMOND 3.4 fue usado. Este protocolo minimiza la energía en cada sistema mediante seis pasos. Primero, se alcanzó un gradiente de energía menor de 0.05 kJ/mol Å, aplicando el algoritmo de “*steepest descent*” y activando y desactivando los criterios de restricción sobre los átomos pesados del sistema molecular. Luego, se llevaron a cabo 4 simulaciones cortas de (12 a 24 ps) aplicando criterios de restricción sobre los átomos pesados y finalmente se realizó una simulaciones molecular sin tener restricción alguna sobre el sistema. Estas simulaciones fueron llevadas a cabo empleando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) que mantiene la temperatura a 300 K a través del método de Nosé-Hoover⁵¹ con un tiempo de relajación de 1 ps. La presión se

mantuvo fija a 1 atm utilizando el método de Martyna-Tobias-Klein⁵² (MTK) con un tiempo de relajación de 2 ps.

Se realizaron cinco SDM de 50 ns para las mutantes simples de LiPH8: D165N, E168Q, E250Q, D264N y F267I. Las estructuras de los mutantes se generaron a partir de la estructura cristalográfica de LiPH8 (código PDB 1LLP)²¹, a través de la opción "*Mutate residue*" disponible en Maestro⁵³ y se usaron como conformaciones iniciales para las SMD que no incluían ningún sustrato. Se aplicó un protocolo de minimización para relajar la estructura de cada mutante utilizando el paquete de software MACROMODEL⁵⁴. El método del gradiente se utilizó con un criterio de convergencia de energía < 0.05 kJ/Å·mol. Los estados de protonación se ajustaron a pH 3.0 usando PROPKA⁴⁸. Los mismos parámetros descritos anteriormente se utilizaron para ejecutar las SDM y de cada una de ellas se guardó una conformación cada 50 ps para realizar los cálculos del área de superficie accesible al solvente (SASA)⁵⁵ alrededor del residuo Trp171; utilizando el script TCL (**Figura 3.1.2.1**) incluido en la herramienta de análisis para el software VMD versión 1.9.2 para Linux⁵⁶. Se realizaron cálculos de SASA para evaluar el efecto que causaba cada mutación en la estructura de LiPH8 alrededor del Trp171.

```

1  set sel [atomselect top "residue 171"]
2  set n [molinfo top get numframes]
3  set output [open "0-171.dat" w]
4
5  for {set i 0} {$i < $n} {incr i} {
6      molinfo top set frame $i
7      set sasa [measure sasa 1.4 $sel]
8      puts "\t \t progress: $i/$n"
9      puts $output "$i $sasa"
10 }
11 puts "\t \t progress: $n/$n"
12 puts "Done."
13 puts "output file: 0-171.dat"
14 close $output

```

Figura 3.1.2.1 Script usado para el cálculo del SASA.

3.1.3- Análisis de las simulaciones de dinámica molecular

Las trayectorias generadas en cada SDM fueron utilizadas para evaluar la ocurrencia de las interacciones intermoleculares entre los diferentes residuos de LiPH8 con AV por medio de la herramienta "*Simulation Interactions Diagram (SID)*" de Maestro⁵³. La ocupancia, definida como la probabilidad de que una molécula de sustrato interactúe con una región específica de la enzima, fue evaluada por medio del plugin "*volmap*" disponible en VMD⁵⁶.

3.2- Materiales y métodos para el objetivo N° 2:

“Caracterizar la participación de los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 en el ciclo catalítico de LiPH8”.

En un reporte previo de Recabarren *et al.*³⁹, y a partir de resultados obtenidos en el objetivo 1, se encontró que los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana al residuo catalítico Trp171 participan en la estabilización del AV en la superficie de LiPH8. Para verificar dicha información, experimentalmente fueron producidos los mutantes simples de los residuos de la cavidad hidrofóbica y evaluados sus parámetros cinéticos. Estos mutantes fueron producidos y caracterizados realizando las siguientes actividades:

3.2.1- Clonamiento del gen de LiPH8

La secuencia correspondiente a LiPH8, conteniendo los 7 aminoácidos del pro péptido del N-terminal de la proteína, fue tomada desde la base de datos del Joint Genome Institute (JGI) mediante búsqueda con el código JGI ID# 2989894. Esta secuencia fue optimizada para expresión en *Escherichia. coli* con la herramienta online OPTIMIZER⁵⁷ y se sintetizó por ATG:biosynthetics (Merzhausen, Alemania) un gen que contenía 350 aminoácidos (343 de la proteína madura y 7 del pro péptido) y los sitios de restricción NdeI y BamHI. Este gen sintético fue clonado en el vector pET23b (+) (Novagen), formándose el plásmido pET23b-LiPH8. Este plásmido fue proporcionado por el laboratorio del Prof. Ángel T. Martínez (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, España) y fue usado como el templado para generar los mutantes simples de la cavidad hidrofóbica usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.2.2- Generación de los mutantes por PCR

Los mutantes simples F129A, F164A, I268A, Q274A y P279A fueron producidos por PCR usando el kit de mutagénesis QuikChangeTM (La Jolla, CA, USA). Cada mutación fue introducida en el plásmido pET23b-LiPH8 a través del diseño de partidores mutagénicos directos y reversos conteniendo la mutación deseada en la secuencia de nucleótidos (ver **Anexo 4**). Las reacciones de PCR contenían 20 ng del DNA molde (Plásmido pET23b-LiPH8), 500 μ M de cada nucleótido, 125 ng del *primer* directo y reverso, 2.5 unidades de la polimerasa *PfuTurbo* y buffer de reacción al 1X. Las condiciones de reacción para las PCR

fueron: (i) un ciclo inicial de 95 °C por 1 min, (ii) 18 ciclos a 95 °C por 50 s, 55 °C por 50 s, y 68 °C por 10 min, (iii) un ciclo final de 10 min a 68 °C. Después de los ciclos de PCR se realizó una digestión con la enzima *DpnI* durante 1 h a 37 °C para digerir el DNA parenteral no mutado y luego se hizo una purificación simple de las muestras de PCR con el kit de purificación para reacciones de PCR QIAquick® (#28104, Qiagen). Los plásmidos mutagénicos obtenidos fueron transformados por choque térmico a 42 °C por 90s en células quimio competentes de *E. coli* DH5 α y estas células fueron inoculadas en el medio sólido LB con ampicilina 100 μ M. Después de 12 h de incubación a 37 °C, a partir de las colonias que crecieron, se replicaron e inocularon 3 colonias en 25mL del medio líquido LB conteniendo ampicilina 100 μ g/mL. Después de un tiempo de incubación “overnight” a 37 °C se extrajo el DNA plasmidial usando el kit Plasmid mini Kit de QIAGEN®. Este DNA fue secuenciado para verificar la presencia de la mutación deseada en cada plásmido mutagénico y, aquellos que tenían la mutación, fueron transformados en células *E. coli* BL21 (DE2)pLysS para expresar las proteínas mutantes.

3.2.3- Producción enzimática

Para producir la enzima silvestre de LiPH8 y las mutantes F129AI, F164A, I268A, Q274A y P279A, se inocularon colonias de células BL21 (DE2)pLysS, conteniendo los plásmidos mutagénicos verificados por secuenciación, en 100 mL de medio líquido LB con ampicilina 100 μ g/mL y diclofenaco sódico 34 μ g/mL en un matraz de 500 mL. Luego se incubaron “overnight” a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. 15mL de este pre cultivo fue utilizado para inocular 1 L de medio líquido TB (24 g/L de extracto de levadura, 20 g/L triptona, glicerol 75% 4 mL/L, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄) en matraces de 2 L conteniendo ampicilina 100 μ g/mL y diclofenaco 34 μ g/mL. Las células fueron incubadas a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 (\approx 3 h). Alcanzada dicha OD se procedió a inducir la expresión de las proteínas por adición de 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranósido) y por 6 h adicionales las células se dejaron en crecimiento. Pasado este tiempo, las células fueron recolectadas por centrifugación a 7000 rpm.

La información obtenida en el proceso de estandarización de la expresión de las proteínas permitió identificar que la proteína expresada heterológamente en mayor parte se acumulaba en los cuerpos de inclusión. Para recuperarla, el pellet de células recolectado

por centrifugación fue resuspendido en 150 mL de buffer de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA 10 mM, DTT 5 mM, 2 mg/mL lisozima), la mezcla fue incubada por 30 min en hielo y pasado este tiempo se adicionó DNasa I (0.1 mg/mL) y se incubó la mezcla por otros 30 min adicionales. Luego, la solución fue sometida a sonicación en ciclos de 6 ráfagas de 10-15 s con intervalos de descanso en hielo y se centrifugó finalmente la mezcla a 14000 rpm por 40 min. El pellet conteniendo el polipéptido de los cuerpos de inclusión de LiPH8 variante, o enzimas mutantes, fue lavado con 50 mL de solución de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y 5 mM DTT). Esta mezcla fue centrifugada por 40 min a 14000 rpm y la proteína precipitada fue solubilizada en 10 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) conteniendo urea 8 M, EDTA 1 mM y DTT 5 mM. La solución fue dejada en agitación suave a 4 °C hasta la solubilización completa del polipéptido (≈ 1 h), luego fue centrifugada por 15 min a 15000 rpm para eliminar el material insoluble y finalmente a la mezcla conteniendo el polipéptido solubilizado de LiPH8, o variantes de LiPH8, se le determinó la concentración de proteína empleando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000 ThermoFisher.

3.2.4- Activación *in vitro* de LiPH8 y sus variantes

Las condiciones de replegado *in vitro* empleadas para producir LiPH8 y sus variantes fueron: buffer Tris-HCl 50mM pH 8.0, urea 0.16M, hemina 5 μ M, CaCl₂ 5mM, GSSG 1.6 mM y polipéptido tomado desde cuerpos de inclusión a concentración de proteína 0.1 mg/mL. Estas condiciones fueron aplicadas para replegar cada mutante en un volumen total de 4L.

En la preparación de la mezcla de replegado fue importante considerar el orden de adición de cada uno de los componentes mencionados. Así, se adicionó 3240 mL de agua grado Milli Q, luego 200 mL de buffer Tris-HCl 1 M pH 8.0, 100 mL CaCl₂ 200 mM, hemina 2 mM pre disuelta en NaOH 0.2 M, polipéptido de proteína desde los cuerpos de inclusión y finalmente 3.92 g de GSSG pre disueltos en 50 mL de agua Milli Q. Es importante mencionar que al momento de adicionar el polipéptido obtenido desde los cuerpos de inclusión, tuvo que llevarse a cabo primero una disolución intermedia de 8 veces con Tris-HCl 50mM pH 8.0 conteniendo urea 8 M, EDTA 1 mM y DTT 5 mM de la mezcla obtenida en el paso de producción enzimática. Esta mezcla resultante luego fue disuelta 4 veces más empleando el buffer Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM. Con estas disoluciones intermedias se evitó la agregación del polipéptido.

La mezcla de replegado fue dejada en reposo por 16 h en oscuridad a temperatura de 24-26 °C. Pasado este tiempo la mezcla fue concentrada empleando un sistema de vacío que estaba acoplado a casetes de Pellicon® de un cut-off de 10 kDa. Luego la mezcla concentrada fue dializada en buffer de acetato de sodio 20 mM pH 4.3 con CaCl₂ 1 mM para promover la precipitación de la hemina libre y los agregados no replegados de proteína. El material insoluble fue removido por centrifugación a 13000 rpm por 15 min y el sobrenadante que incluía la proteína activa fue dializado en buffer de tartrato de sodio 10 mM pH 5.5 conteniendo CaCl₂ 1 mM.

3.2.5- Purificación y caracterización de LiPH8 y sus variantes

Las enzimas activas de LiPH8 y sus variantes obtenidas por replegado *in vitro* fueron purificadas por cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna Resource Q (GE Healthcare) acoplada a un FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) ÄKTA. La mezcla final del replegado *in vitro* fue cargada en la columna en buffer tartrato 10 mM pH 5.5 conteniendo CaCl₂ 1mM a un flujo de 1 mL/min. Las proteínas retenidas fueron eluidas con un gradiente de NaCl desde 0 a 500 mM a flujo de 1mL/min. Durante el proceso de purificación fue monitoreada la absorbancia a las longitudes de onda de 280 nm y 410 nm. Aquellas fracciones colectadas en la región donde la relación 410 nm/210 nm era mayor a 2 se juntaron y dializaron en el buffer de almacenamiento (buffer tartrato de sodio pH 5.0). Una vez dializadas, se concentraron empleando filtros Amicon® de un cut-off de 15 kDa y se almacenaron a -80 °C.

Las enzimas purificadas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para confirmar su grado de pureza. Para verificar que las proteínas obtenidas estaban replegadas de manera adecuada y en ellas el grupo hemo fue acoplado correctamente, se recolectaron barridos espectrofotométricos en la región UV-Visible, 200-700 nm, empleando un espectrofotómetro ThermoFisher. En los espectros obtenidos fue analizada la presencia de picos máximos característicos de las hemo proteínas (405nm, 508n y 638nm) y el radio R_z (Relación 410 nm/280 nm) mayor a 2. Para estimar la concentración se consideró el coeficiente de absortividad molar previamente reportado para LiPH8 (ϵ_{405} 168000 M cm⁻¹)⁵⁸.

3.2.6- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y sus variantes

Las constantes cinéticas en estado estacionario de LiPH8 y sus variantes para la oxidación de AV a VAD (ϵ_{310} 9300 mM⁻¹·cm⁻¹) fueron evaluadas por los cambios de la absorbancia registrados en buffer tartrato de sodio 100 mM a un pH óptimo de oxidación de 3. La reacción fue evaluada a 25 °C usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Las mediciones fueron iniciadas tras la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a concentración de 0.25 mM.

Los valores para la constante de Michaelis-Menten (K_m) y de la constante catalítica (K_{cat}) con sus respectivos errores estándar fueron calculados por ajuste de las medidas experimentales al modelo de la ecuación de Michaelis-Menten incorporado en el software SigmaPlot 12.0 (Systat. Software Inc, California). Los valores de la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) con sus errores estándar fueron obtenidos al realizar la operación aritmética correspondiente teniendo presente los valores de las incertidumbres de las constantes enzimáticas K_{cat} y K_m .

3.3- Materiales y métodos para el objetivo N° 3:

“Estudiar en detalle la función de cada uno de los residuos del microambiente ácido alrededor del Trp171 en la catálisis de LiPH8”.

A partir de un reporte previo de Smith *et al.*⁵⁹ y los resultados obtenidos en el objetivo 1, se determinaron los residuos del microambiente ácido alrededor del residuo catalítico Trp171 que demostraron participar en la catálisis de AV por LiPH8. Para estudiar y caracterizar en detalle la función de cada uno de los residuos, se produjeron experimentalmente los mutantes de los residuos del microambiente ácido y se evaluaron sus parámetros cinéticos. Además se llevó a cabo una descripción a nivel cuántico semiempírico de las energías de unión (ΔE) calculadas para cada residuo con el sustrato e información complementaria de cálculos a nivel QM/MM.

3.3.1- Generación de los mutantes por PCR, producción enzimática, activación *in vitro*, purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos.

Los mutantes D165N, E168Q, E250Q, D264N, F267I, E168Q/E250Q, D165N/E168Q, D264N/F267I y D165N/E168Q/D264N/F267 fueron producidos por PCR usando las mismas condiciones que se describieron en el numeral 3.2.2. El plásmido pET23b-LiPH8 fue usado como templado para generar las mutantes simples y dobles D165N/E168Q, D264N/F267I. Para estas dos últimas mutantes, los partidores mutagénicos contenían en la secuencia de nucleótidos la doble mutación (**Anexo 4**). Los mutantes E168Q/E250Q y D165N/E168Q/D264N/F267 fueron generados usando los plásmidos pET23b-LiPH8/E168Q y pET23b-LiPH8/ D264N/F267I como templado.

La producción enzimática, activación *in vitro*, purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos para los mutantes D165N, E168Q, E250Q, D264N, F267I, E168Q/E250Q, D165N/E168Q, D264N/F267I y D165N/E168Q/D264N/F267 fue desarrollada de manera similar a lo descrito para los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171. De manera adicional, fueron determinadas las constantes cinéticas para la oxidación de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP) y 2,2-azino-bis-[3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonato] (ABTS); para ello, los respectivos coeficientes de absorción molar de la aparición de los productos de la oxidación fueron considerados: $\epsilon_{469} 55000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la oxidación del DMP al dímero coerulignona y $\epsilon_{436} 29300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la oxidación del ABTS a su radical catiónico.

3.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel cuántico semiempírico

Las energías de interacción (ΔE) entre AV (tanto para la especie neutra como para la radical catiónica) y el sitio reactivo de LiP (residuos ubicados alrededor de Trp171) se calcularon usando una estrategia que utiliza un muestreo conformacional basado en Monte Carlo y cálculos a nivel semiempírico de mecánica cuántica (SQM) que se esquematiza en la **Figura 3.2.2.1** para complejos molécula1-molécula2⁶⁰⁻⁶². Brevemente, esta estrategia consiste en: (i) la molécula1 se fija para permanecer estática en el origen de sus coordenadas cartesianas, (ii) luego, la molécula2 se mueve y se reorienta en relación con la molécula1 utilizando un vector de traslación y una matriz de rotación hasta que las superficies de van der Waals de cada molécula se tocan cada uno⁶³, (iii) para cada nuevo complejo molécula1-molécula2, su energía single-point es calculada utilizando el método parametrizado número 7 (PM7)^{62,64} implementado en el programa MOPAC2016 versión

16.111L (para LINUX)⁶⁵, (iv) del cálculo anterior se extrae el valor de la energía de formación (E) tanto para el complejo como para sus componentes aislados. Finalmente, la energía de interacción (ΔE) se obtiene de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

$$\Delta E_{1,2} = E_{complejo} - (E_{molécula1} + E_{molécula2}) \quad (1)$$

Los pasos, (i) a (iv), se repiten para generar miles de complejos diferentes y, finalmente, se selecciona el valor ΔE más frecuente como el valor calculado (**Figura 3.2.2.1, paso 6**) para la comparación con los datos experimentales.

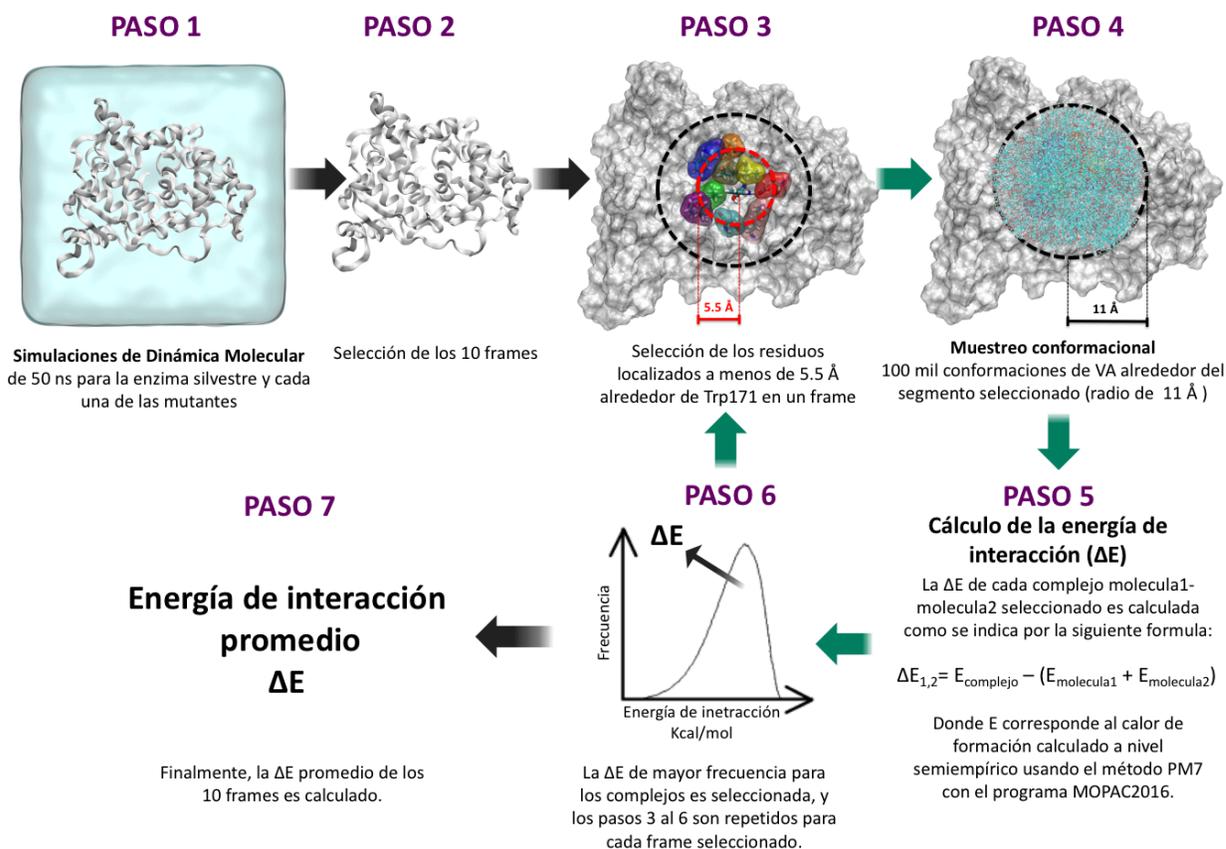


Figure 3.2.2.1. Workflow para calcular las ΔE de los complejos de molécula1-molécula2.

Como entrada en este workflow se utilizaron 10 conformaciones extraídas de la zona de equilibrio (región de la trayectoria de SDM con valores estables de RMSD para los átomos del backbone del sistema enzimático LiP (tipo salvaje y los cinco sistemas LiP con mutaciones simples) (**Figura 3.2.2.1 paso 1 y 2**). Conformaciones representativas fueron

seleccionadas cada 3 ns a partir de los 20 ns, basado en el análisis de RMSD descrito en el anexo 5. Para cada conformación se seleccionaron los aminoácidos (aa) ubicados a menos de 5.5 Å del residuo Trp171; estos residuos corresponden a: Phe164, Asp165, Leu167, Glu168, Glu250, Lys260, Asp264, Phe267 e Ile268 (**Figura 3.2.2.1 paso 3**).

Para realizar el muestreo conformacional, la molécula1 representó el fragmento molecular (SEG) que incluye cada uno de los aa seleccionados (incluido Trp171) en el sitio activo del sistema LiP salvaje (**Figura 3.2.2.1 paso 3**) y la molécula2 representó 100 mil orientaciones diferentes de AV, considerando un radio de desplazamiento de hasta 11 Å alrededor de la molécula1 (**Figura 3.2.2.1 paso 4**). Esta distancia de corte se eligió para generar un número considerable de orientaciones de AV alrededor del segmento seleccionado (que considera el espacio reactivo completo alrededor de Trp171). El muestreo conformacional consideró el impedimento estérico de los residuos ubicados alrededor de la molécula1. De esta manera, solo las conformaciones de la molécula de AV generadas en el muestreo conformacional y ubicadas a menos de 5.5 Å de cada aa fueron seleccionadas para calcular el ΔE (**Figura 3.2.2.1 paso 5 y 6**) para los complejos AA-AV y AA-AV⁺. Esto se llevó a cabo considerando los pasos (iii) y (iv) de la metodología previamente detallada. Finalmente, el valor promedio de ΔE se obtuvo teniendo en cuenta los resultados de los cálculos sobre las 10 conformaciones seleccionadas (**Figura 3.2.2.1 paso 7**).

En un segundo estudio, la molécula1 representó al segmento molecular mutado (MSEG). Se consideraron cinco MSEG diferentes que incluían las siguientes mutaciones puntuales informadas en la literatura científica y en las patentes consultadas: D165N, E168Q, E250Q, D264N y F267I. Como en el primer protocolo, la molécula2 representó cien mil orientaciones diferentes de AV y AV⁺ alrededor de cada MSEG. Los MSEG consideraron a Trp171 en sus diferentes formas: neutral, radical (Trp[•]) y radical catión (TrpH⁺). Los valores de ΔE para los complejos de MSEG-AV se obtuvieron siguiendo los pasos (iii) y (iv) de la metodología previamente detallada. Finalmente, el valor promedio de ΔE se obtuvo teniendo en cuenta los resultados de los cálculos sobre las 10 conformaciones seleccionadas. Estos cálculos nos permitieron evaluar cómo los residuos (nativos y mutados) impactan la afinidad de AV contra el sitio activo de LiP (salvaje y

mutante) y, por lo tanto, comparar estos resultados computacionales con el efecto de esas mutaciones en la actividad enzimática experimental de LiP.

Se seleccionaron 100 complejos de LiP (tanto salvaje como mutantes)-VA con los valores de ΔE más bajos, con el objetivo de llevar a cabo la caracterización de sus interacciones intermoleculares (interacciones π - π , enlaces de hidrógeno, entre otras) utilizando el software BIOVIA Discovery Studio Visualizer versión 2017 R2 (para Windows)⁶⁶.

3.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín

Para describir la estructura electrónica del compuesto I en LiPH8, se extrajeron conformaciones representativas desde las SDMs del sistema LiP-AV. Las moléculas de agua, iones de Na^+ y moléculas del sustrato fueron eliminados y luego fue aplicada una minimización empleando el método de gradiente conjugado de Polak-Ribiere (PRCG)⁶⁷ hasta que se alcanzó el criterio de convergencia de $0.05 \text{ kJ}/\text{\AA}\cdot\text{mol}$ en el gradiente de energía. La estructura resultante fue usada como archivo de entrada para los cálculos QM/MM en los que se usó el software Qsite 5.7 (Schrödinger). El estado de multiplicidad cuarteto del compuesto I fue calculado utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT) con parámetros electrónicos de espín no restringidos. Para representar la estructura electrónica de la región cuántica (QM) se usó el funcional híbrido M06-L⁶⁸ en combinación con el juego de base lacvp* y para representar los parámetros atómicos de la región clásica (MM) se utilizó el campo de fuerza OPLS-2005. Estos parámetros fueron seleccionados siguiendo evidencia bibliográfica previa⁶⁹. En la región cuántica, la esfera de coordinación del Fe^{+3} fue incluida; por lo tanto, el anillo de porfirina con sus grupos propionato, el residuo proximal His176 y el átomo de oxígeno ubicado a una distancia de $\approx 1.6 \text{ \AA}$ del Fe^{+3} fueron incluidos. En cálculos subsecuentes, en los que se analizó la oxidación del Trp171 por el compuesto I en la enzima silvestre y mutantes, el residuo Trp171 fue incluido en la región QM donde el corte las regiones QM y MM fue realizado entre los carbonos alfa y beta del Trp171 y las valencias fueron saturadas con átomos de hidrógeno. Los mapas de la densidad de espín fueron calculados y la densidad de espín por átomo fue estimada por el método de partición de Mulliken⁷⁰ para evaluar con ello la deslocalización electrónica.

CAPÍTULO IV:

Resultados y discusión

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Resultados y discusión del objetivo N° 1:

“Profundizar en el estudio de las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8 por medio de herramientas de simulación de dinámica molecular.”

4.1.1- Parámetros de descripción del sistema

Para la descripción del AV en sus estados radical (**AV^{•+}**) y neutro (**AV (ESP)**), se realizaron cálculos de energía puntual (*single point*) utilizando la metodología de cálculo híbrido QM/MM. La región cuántica (QM) fue modelada empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT) teniendo presente los parámetros del funcional híbrido B3LYP y la función de base 6-31+G*. La región de mecánica clásica (MM) fue evaluada con los parámetros del campo de fuerza OPLS2005.

Los valores de carga parcial para cada átomo del AV fueron calculados promediando los valores obtenidos en cada uno de los 5 cálculos QM/MM de las poses representativas de AV sobre la superficie de LiPH8 reportadas en el trabajo previo de Recabarren *et al*³⁹. Estas cargas parciales son reportadas en la **Tabla 4.1.1.1**, y en la misma tabla se muestran además los valores de las cargas parciales atómicas obtenidas con el campo de fuerza OPLS2005 que describen el AV en su estado neutro (**AV (OPLS)**).

Tabla 4.1.1.1. Cargas parciales atómicas para cada átomo del AV en los sistemas AV^{•+}, AV(ESP) y AV(OPLS).

Átomo	Cargas Atómicas		
	AV ^{•+}	AV (ESP)	AV (OPLS)
C1	0.1576	0.0490	-0.0780
C2	0.3268	0.2614	0.0850
C3	-0.3308	-0.3456	-0.1150
C4	0.3436	0.2358	0.0850
C5	-0.1878	-0.3458	-0.1150
C6	-0.1836	-0.1756	-0.1150
C7	0.3268	0.4380	0.1970
C8	0.0230	0.0536	0.1100
C9	0.0328	0.0956	0.1100
O1	-0.3272	-0.4060	-0.2850
O2	-0.2980	-0.4028	-0.2850
O3	-0.7528	-0.8350	-0.6330
H1	0.2110	0.1980	0.1150

H2	0.2248	0.2102	0.1150
H3	0.1850	0.1548	0.1150
H4	0.0336	-0.0308	0.0480
H5	0.0568	-0.0072	0.0480
H6	0.1080	0.0686	0.0300
H7	0.1240	0.0772	0.0300
H8	0.0950	0.0562	0.0300
H9	0.0768	0.0234	0.0300
H10	0.1106	0.0590	0.0300
H11	0.1126	0.0586	0.0300
H12	0.5320	0.5094	0.4180



Al establecer una comparación entre los valores de las cargas parciales atómicas para los tres sistemas, es posible notar que los sistemas AV(ESP) y AV(OPLS) poseen valores más negativos en comparación a los observados en las cargas parciales atómicas del AV⁺ (Ver Figura 4.1.1.1).

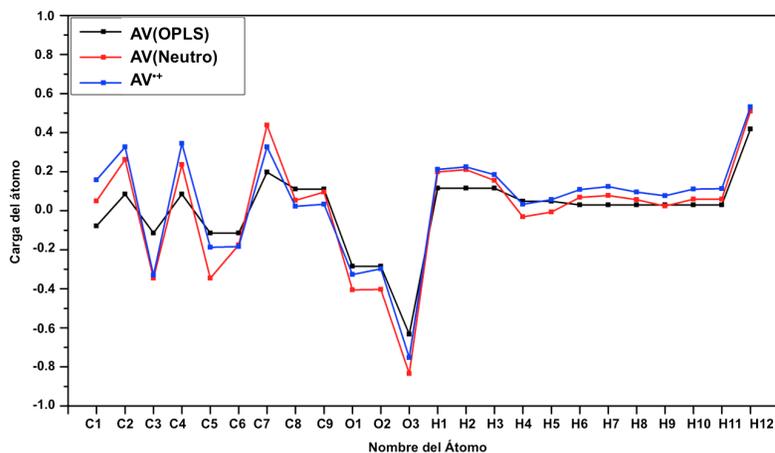


Figura 4.1.1.1. Cargas parciales atómicas de cada átomo del AV en los sistemas AV⁺, AV(ESP) y AV(OPLS).

De igual manera que para las cargas parciales atómicas, al graficar las superficies de potencial electrostático se evidencia que los sistemas AV(ESP) y AV(OPLS) adoptan valores más negativos comparados a los que se generan para el AV⁺⁺ (Ver Figura 4.1.1.2).

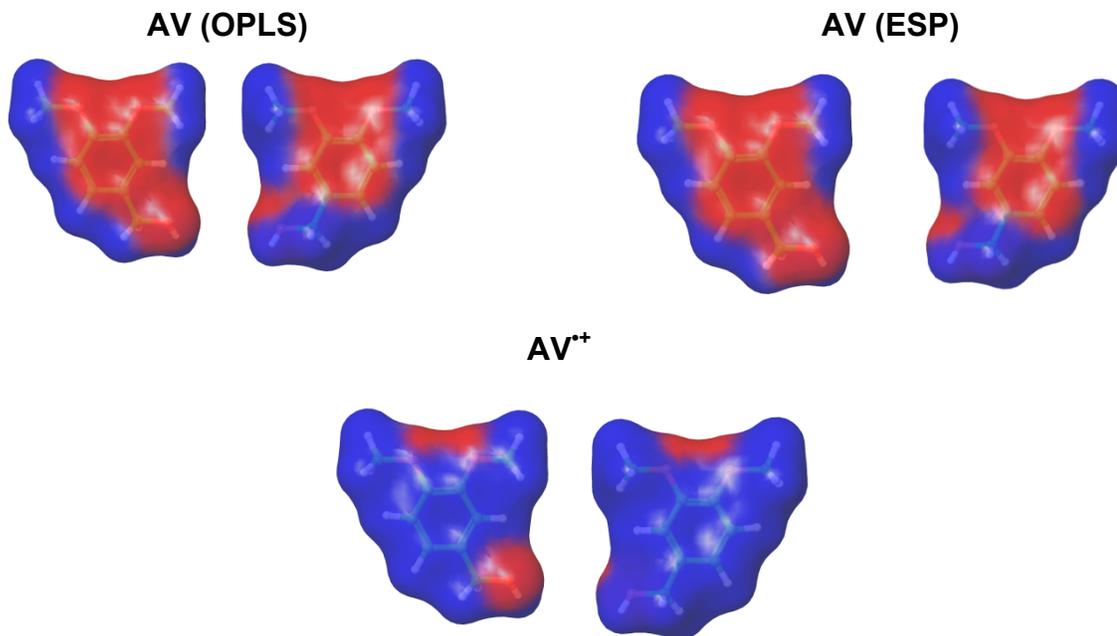


Figura 4.1.1.2. Superficies del potencial electrostático para el AV en los sistemas AV(OPLS), AV(ESP) y AV⁺⁺. En cada sistema es ilustrada la cara frontal y posterior. El potencial eléctrico 3D de cada molécula de AV está determinado por la carga en su conjunto de cada uno de los átomos que la componen. Las cargas negativas en rojo y las positivas en azul.

Para la descripción del grupo hemo, se emplearon los parámetros descritos previamente por Recabarren *et al.*³⁹

4.1.2- Análisis del mecanismo de unión de AV y AV⁺⁺ a LiPH8 a través de simulaciones de dinámica molecular

Para cada uno de los sistemas enzima-sustrato construidos, LiP-AV(ESP), LiP-AV(OPLS), LiP-AV⁺⁺, se simuló un tiempo total de 1 microsegundo (μ s) de dinámica molecular (DM) clásica. Este tiempo fue obtenido de compilar 5 simulaciones de SDM independientes de 200 ns, recopilándose y concatenando las trayectorias finales obtenidas. Cada una de estas simulaciones fueron iniciadas desde las estructuras representativas enzima-sustrato obtenidas del análisis por clusterización en el trabajo previo publicado por Recabarren *et al.*³⁹. En cada simulación la ocurrencia de las interacciones intermoleculares entre la enzima y el sustrato, como por ejemplo el enlace de hidrógeno, los contactos

hidrofóbicos, las interacciones π -stacking borde-cara y π -stacking cara-cara; fueron consideradas usando la herramienta “*simulation interaction diagram*” disponible en Maestro versión 2016.4⁵³. La ocupancia en todos los sistemas fue analizada por medio de la herramienta “*volmap*” que esta disponible en VMD⁵⁶. La SDM de 1 μ s de cada sistema fue empleada para generar los diagramas de la **Figuras 4.1.2.1 B, D, F**.

En los diagramas de interacción obtenidos (**Figuras 4.1.2.1 A, C, E**), fueron incluidos aquellos residuos que presentaron un porcentaje de interacción superior al 1.5%, que es el resultado de concatenar el porcentaje de interacción observado para cada residuo en las 5 replicas de SDM. Así, el diagrama de interacciones para el sistema LiP-AV⁺ fue producto de concatenar los valores de las 5 réplicas mostradas en las Figuras del Anexo 6, el del sistema LiP-AV(ESP) de las réplicas de las Figuras del Anexo 7 y LiP-AV(OPLS) de las réplicas de la Figuras del Anexo 8.

Debido a que cada una de las SDM inició desde una estructura representativa diferente, y en las SDM fue aplicado un enfoque de difusión libre en que se permitió explorar la superficie total de la enzima por el sustrato sin aplicar ninguna restricción, existen diferencias en el porcentaje de interacción por cada residuo cuando se comparan los resultados entre réplica y réplica de las SDM por sistema.

Teniendo en cuenta que el objetivo de este estudio fue obtener una caracterización cualitativa de las diferencias de interacción entre AV y AV⁺ con LiPH8, el hecho de aplicar un esquema de difusión libre del sustrato sobre la superficie de la enzima es de utilidad, en vez de considerar una exploración de la superficie de energía potencial (SEP) donde se esperarí una convergencia completa de las estructuras enzima-sustrato bajo parámetros de mínima energía.

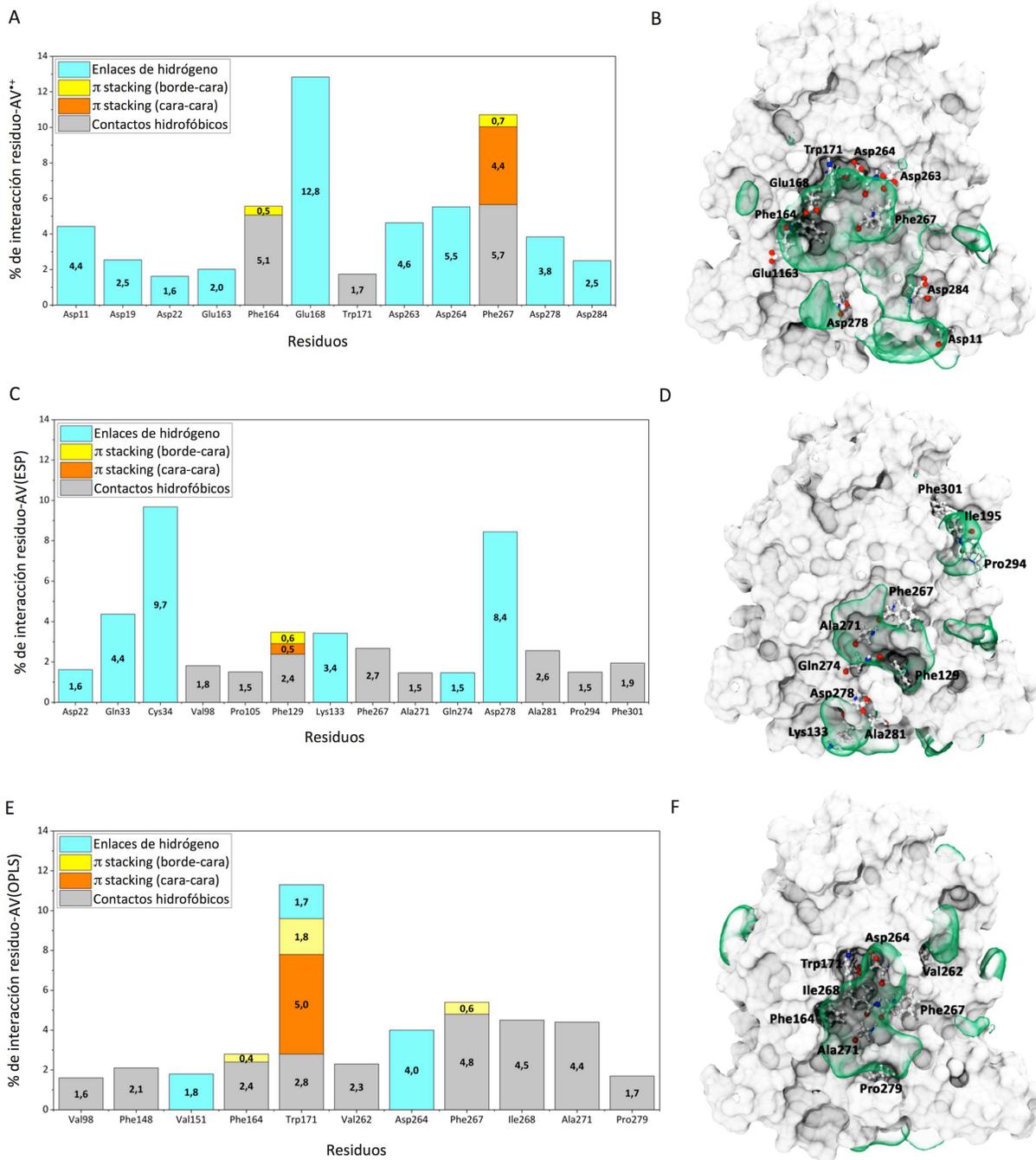


Figura 4.1.2.1. Perfiles de interacción por residuo para las SDM de 1 μ s de los sistemas enzima-sustrato: (A) LiP-AV⁺, (C) LiP-AV(ESP) y (E) LiP-AV(OPLS). Sólo se incluyen las interacciones con un valor mayor al 1.5% y que se establecieron entre el sustrato y el backbone y/o cadena lateral de los aminoácidos indicados. Los mapas volumétricos de ocupación (MVO) para AV y AV⁺ en la superficie de LiP se muestran respectivamente en el lado derecho de la figura (B, D, F). Los MVO se generaron utilizando el módulo *volmap* de VMD.

Al analizar el diagrama de interacción para el sistema LiP-AV⁺ (**Figura 4.1.2.1 A**) se observa que las interacciones más abundantes son los enlaces de hidrógeno entre el AV⁺ y los aminoácidos de carácter ácido (Asp y Glu). Todos los residuos con los que interacciona el AV⁺ a lo largo de la SDM están ubicados en la cara opuesta del canal de acceso al grupo hemo, la cual se conoce como la cara posterior de la proteína²¹. Se identificaron los siguientes residuos ácidos con los que AV⁺ interacciona: Glu168, Glu163, Asp264 y Asp263. Entre estos residuos, que están cerca al residuo Trp171, el Glu168 tiene el mayor porcentaje de interacción (12.8%). En orden consecutivo de predominancia de interacciones, están las interacciones hidrofóbicas y de π -stacking establecidas con los residuos Phe267 (10.8%) y Phe164 (5.6%). Experimentalmente, y a nivel *in silico*, se ha sugerido que los residuos aromáticos como Phe son importantes en la estabilización del AV en la superficie de la proteína³⁹. La evidencia computacional aquí recolectada sugiere que los residuos Phe267 y Phe164 también participan estabilizando el AV⁺. Las interacciones con los residuos Asp11, Asp19, Asp22, Glu163, Asp278 y Asp284 aparecen en un rango de ocurrencia del 1.6 al 4.4%. Finalmente, la interacción minoritaria con el residuo Trp171 (1.7%) sugiere que el AV⁺, aunque permanezca en la cercanía del Trp171, interacciona de forma transitoria con este residuo y puede difundir hacia el solvente. Adicionalmente la superficie accesible al solvente de Trp171 se ve disminuida por la presencia de los demás residuos de su entorno, como se discutirá más adelante.

La **Figura 4.1.2.1 C** muestra el diagrama de interacción para el sistema LiP-AV(ESP). Se observa claramente que existen diferencias con respecto al diagrama de interacción del sistema LiP-AV⁺. La interacción con mayor grado de ocurrencia es la generada con el residuo Cys34 a través de enlaces disulfuro, sin embargo se encuentra distante del residuo catalítico Trp171. Esta interacción sólo aparece en dos réplicas de este sistema (**Anexo 7 Figuras A-B**). Otra interacción representativa es la que se observa con el residuo Asp278 (8.4%), la cuál es una interacción que sólo se presenta en la cuarta réplica y tiene un porcentaje de interacción de 42%. (**Anexo 7 Figura D**). Es posible detectar, a partir de la información presentada para este sistema, que hay una amplia heterogeneidad en las interacciones establecidas a lo largo de las diferentes simulaciones del sistema LiP-AV(ESP) y, como fue mencionado previamente con respecto al esquema de libre difusión del sustrato adoptado en las SDMs, las simulaciones desarrolladas no representan los

mapas de convergencia para la unión del AV a la superficie de la enzima. Las interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe129, Ala271 y los enlaces de hidrógeno con el residuo Gln274, aunque en pequeño porcentaje, muestran la tendencia del AV de visitar la cavidad hidrofóbica cercana al Trp171. Esta cavidad ha sido propuesta como un sitio de unión para sustratos fenólicos²¹. La participación del residuo Phe267 al establecer contactos hidrofóbicos e interacciones π -stacking con el AV complementa este grupo de interacciones que en un bajo porcentaje explican la baja tendencia del AV de visitar las zonas cercanas al Trp171. En el diagrama de ocupancia ilustrado en la **Figura 4.1.2.1 D** se puede ver con mayor claridad la baja ocupancia en las cercanías del residuo Trp171 y, de manera complementaria, se nota que el AV visita otras pequeñas cavidades en dos regiones diferentes de la superficie de la proteína al establecer enlaces de hidrógeno con los residuos Asp22, Gln33, Lys133 e interacciones hidrofóbicas con los residuos Val98, Pro105, Ala281, Pro294 y Phe301.

Finalmente, el tercer sistema LiP-AV(OPLS) (**Figura 4.1.2.1 E**) muestra un diagrama de interacción que está más concentrado alrededor del Trp171, con un alto porcentaje de interacción presentado por este residuo (11.3%). Este porcentaje se puede descomponer en un 2.8% de interacciones hidrofóbicas, 2.8% y 5.0% de interacciones π -stacking cara-cara y borde cara, respectivamente, y un 1.7% de enlaces de hidrógeno que se establecen entre el AV y el grupo hidroxilo del carbono beta del Trp171. Las interacciones hidrofóbicas con los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171, como en el sistema LiP-AV(ESP), están presentes en un bajo porcentaje. Sin embargo, el sustrato interacciona con residuos adicionales que componen esta cavidad y, por tanto, se detectaron interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile268, Pro279 y Phe164. Complementando lo anterior, aparecen interacciones con los residuos del microambiente ácido alrededor del Trp171, Asp264 (4.0%) y Phe267 (5.4%). Recabarren *et al*³⁹ demostraron la sinergia generada entre la interacción conjunta de enlaces de hidrógeno e interacciones π -stacking, la cual favorece la unión del sustrato a la superficie de la enzima. El mapa de ocupancia de la **Figura 4.1.2.1 F** muestra la tendencia de movimiento del AV entre las regiones cercanas al Trp171 pero de manera adicional en otras regiones que son visitadas por el sustrato al establecer interacciones hidrofóbicas con los residuos Val98, Phe148 y Val262.

Al analizar las energías de interacción, y sus componentes energéticos, en los sistemas donde el AV visita con mayor ocurrencia los residuos cercanos al Trp171 (sistemas LiP-AV⁺ y LiP-AV(ESP)), se puede observar que en el sistema LiP-AV⁺ las energías que estabilizan la interacción enzima-sustrato son principalmente energías electrostáticas y, por su parte, para el sistema LiP-AV(ESP) participan principalmente energías de Van der Waals (**Ver Figura 4.1.2.2**).

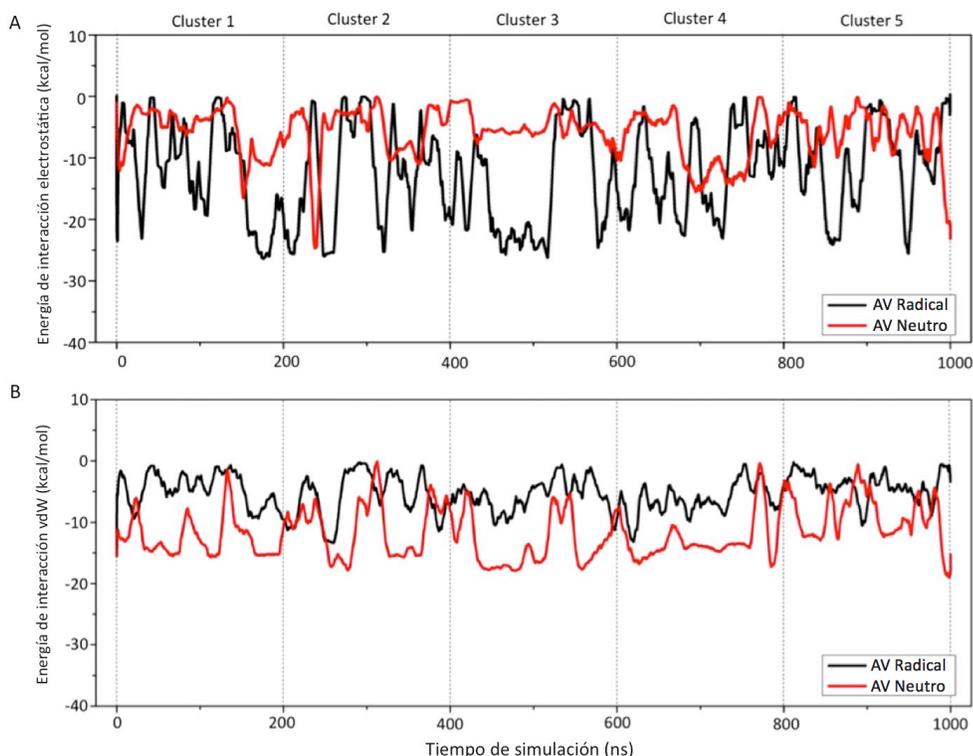


Figura 4.1.2.2. Componentes de las energías de interacción para la trayectoria de SDM de 1 μ s en los sistemas LiP-AV⁺ y LiP-AV(OPLS). (A) Energía de interacción electrostática (B) Energía de Van der Waals.

Los análisis computacionales por SDM sugieren que hay una clara diferencia en los perfiles de interacción por residuo para el AV⁺ y AV, pero la ocupancia mayoritaria de ambos sustratos ocurre en un área con un radio de 8 Å alrededor del residuo catalítico Trp171. En este radio se pueden observar dos subregiones descritas en la estructura cristalográfica de Chowinoski *et al*²¹: el microambiente ácido alrededor del residuo Trp171 y la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171. AV⁺ interacciona con residuos del microambiente ácido por medio de enlaces de hidrógeno con los residuos Glu168, Asp264 y estableciendo interacciones π -stacking con el residuo Phe267. Por su parte, AV establece sólo enlaces de hidrógeno con Asp264 y presenta una mayor interacción con los residuos de la cavidad

hidrofóbica cercana al residuo Trp171 en comparación con AV⁺. Por lo tanto, para tratar de clarificar cuál de estas interacciones halladas en los análisis de SDM son de importancia en la interacción enzima-sustrato, y por ende en el ciclo catalítico de LiPH8, se llevaron a cabo estudios de mutagénesis sitio dirigida, que corresponden a los objetivos específicos 2 y 3 de la presente tesis.

4.2- Resultados y discusión del objetivo N° 2:

“Caracterizar la participación de los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 en el ciclo catalítico de LiPH8”.

4.2.1- Generación de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171: Phe129, Phe164, Ile268, Gln274 y Pro279, que presentaron interacción con AV a lo largo de las SDM en los sistemas LiP-AV(ESP), LiP-AV(OPLS) y LiP-AV⁺ fueron seleccionados para evaluar por medio de mutagénesis sitio dirigida su potencial participación en la variación de los parámetros cinéticos de LiPH8. Dichos residuos fueron mutados por el aminoácido alanina con el objetivo de perturbar las interacciones que se detectaron con los análisis de las SDMs. La mayoría de las interacciones entre el sustrato y la cavidad hidrofóbica se establecieron por contacto con los átomos de la cadena lateral de los aminoácidos indicados.

En la **Figura 4.2.1.1** se puede observar el alineamiento múltiple del DNA plasmidial de pET23b-LiPH8 y los plásmidos mutagénicos de las variantes F129A, F164A, I268A, Q274A y P279A. Se consideraron sólo los nucleótidos de las proteína maduras, y no se presentan los nucleótidos del pro péptido ni los sitios de restricción de NdeI y BamHI.

LiPH8	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTCTTCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420
F129A	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTTCGCCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420
F164A	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTCTTCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420
I268A	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTCTTCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420
Q274A	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTCTTCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420
P279A	CCGGGTGCGCCGAGATGAACTTCTTCACCGGTCGTGCGCCGGCGACCCAGCCGGCGCCG	420

LiPH8	GCGGGTGAATTTCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG	540
F129A	GCGGGTGAATTTCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG	540
F164A	GCGGGTGAAGCCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG	540

```

I268A      GCGGGTGAATTTCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG  540
Q274A      GCGGGTGAATTTCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG  540
P279A      GCGGGTGAATTTCGACGAACTGGAAGTGGTTTGGATGCTGTCTGCGCACTCTGTTGCGGCG  540
*****

LiPH8      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
F129A      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
F164A      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
I268A      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
Q274A      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
P279A      CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCCTGGCGCTGACCCAGCTGGGTCAGGACCCGAAC  840
*****
    
```

Figura 4.2.1.1. Alineamiento múltiple de la secuencia del gen que codifica a LiPH8 con los mutantes del sitio accesorio para generar las proteínas mutantes LiPH8-P129A, LiPH8-P164A, LiPH8-I268A, LiPH8-Q274A y LiPH8-P279A. Los nucleótidos mutados vía PCR son los resaltados en verde. El alineamiento fue generado usando Clustal Omega⁷¹.

4.2.2- Producción enzimática de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.

Bajo las condiciones de cultivo indicadas en la sección 3.2.3, las células de *E. coli* BL21 (DE2)pLysS conteniendo el plásmido de LiPH8 silvestre, pET23b-LiPH8, y los plásmidos mutagénicos de F129A, F164A, I268A, Q274A y P279A generados vía PCR, presentaron sobreexpresión de las proteínas después de la inducción con IPTG a concentración de 1mM. Como se observa en las **Figuras 4.2.2.1 A-B**, a tiempo 0 h (previo a inducción) no se presentó expresión ninguna, pero tras la adición de IPTG en los tiempos posteriores se observa una sobreexpresión que va aumentando en función del tiempo. Este comportamiento fue observado tanto para la proteína silvestre (**Figura 4.2.2.1 A**) como para el mutante F129A presentada en la **Figura 4.2.2.1 B**, a modo de ejemplo de expresión de las proteínas mutantes generadas. Para los muestreos indicados en la **Figura 4.2.2.1** fue considerado factor de corrección la OD registrada a tiempo de 0 h.

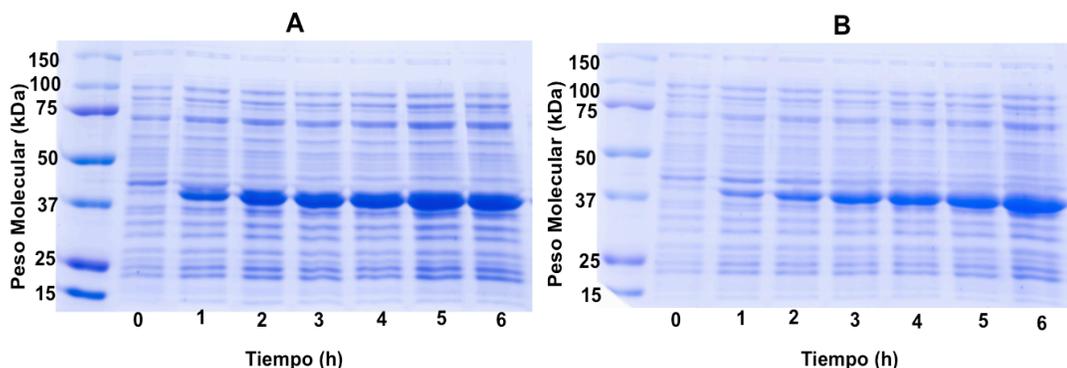


Figura 4.2.2.1. Análisis de expresión para LiPH8 y la mutante F129A por SDS-PAGE. En la línea 1 se presenta el marcador del peso molecular.

4.2.3- Purificación de LiPH8 y las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171

Desde las soluciones obtenidas por activación *in vitro*, y siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.4, se purificaron en un único paso cromatográfico de intercambio aniónico la enzima silvestre de LiPH8 y las mutantes F129A, I268A, Q274A y P279A. El mutante F164A no fue posible de obtener bajo las condiciones testeadas de replegado a nivel *in vitro*. En la **Figura 4.2.3.1** se ilustra a modo de ejemplo el cromatograma de elución del replegado *in vitro* de LiPH8 silvestre.

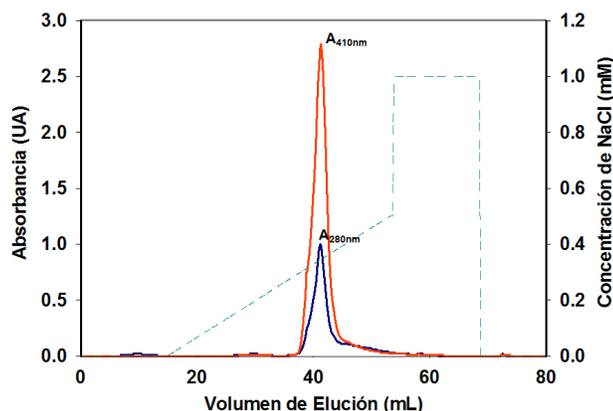


Figura 4.2.3.1. Cromatograma del perfil de elución de LiPH8 silvestre en una columna Resource Q a 280nm y 410nm y un gradiente de NaCl.

Las enzimas purificadas fueron analizadas por SDS-PAGE (**Figura 4.2.3.2**) para verificar su nivel de pureza y peso molecular. Todas las enzimas presentaron una banda predominante de 40 kDa, peso molecular reportado para las isoenzimas de Lignino peroxidasas de *P. chrysosporium*²⁰. La mutante I268A fue la que presentó mayor grado de impurezas lo que provocó que el valor de su radio R_z fuera de 1.5. Para LiPH8, F129A, Q274A y P279A los valores de radio R_z fueron de 3.3, 2.6, 2.1 y 3.0, respectivamente.

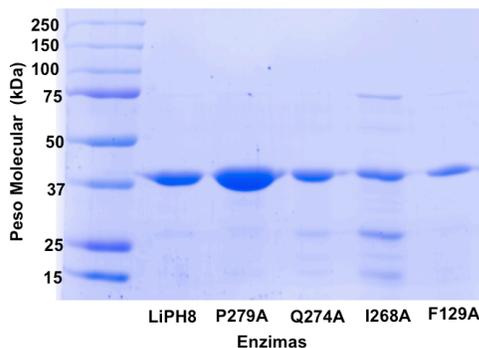


Figura 4.2.3.2. SDS-PAGE de las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.

Todas las enzimas purificadas presentaron el espectro UV-Visible típico de las peroxidadas⁷² y no hubo diferencias significativas en los valores de los máximos de la banda de Soret (408nm) y de los máximos de las bandas de transferencia de carga del grupo hemo al átomo de Fe³⁺ CT1 y CT2 (≈504nm y ≈638nm) (Ver Figura 4.2.3.3).

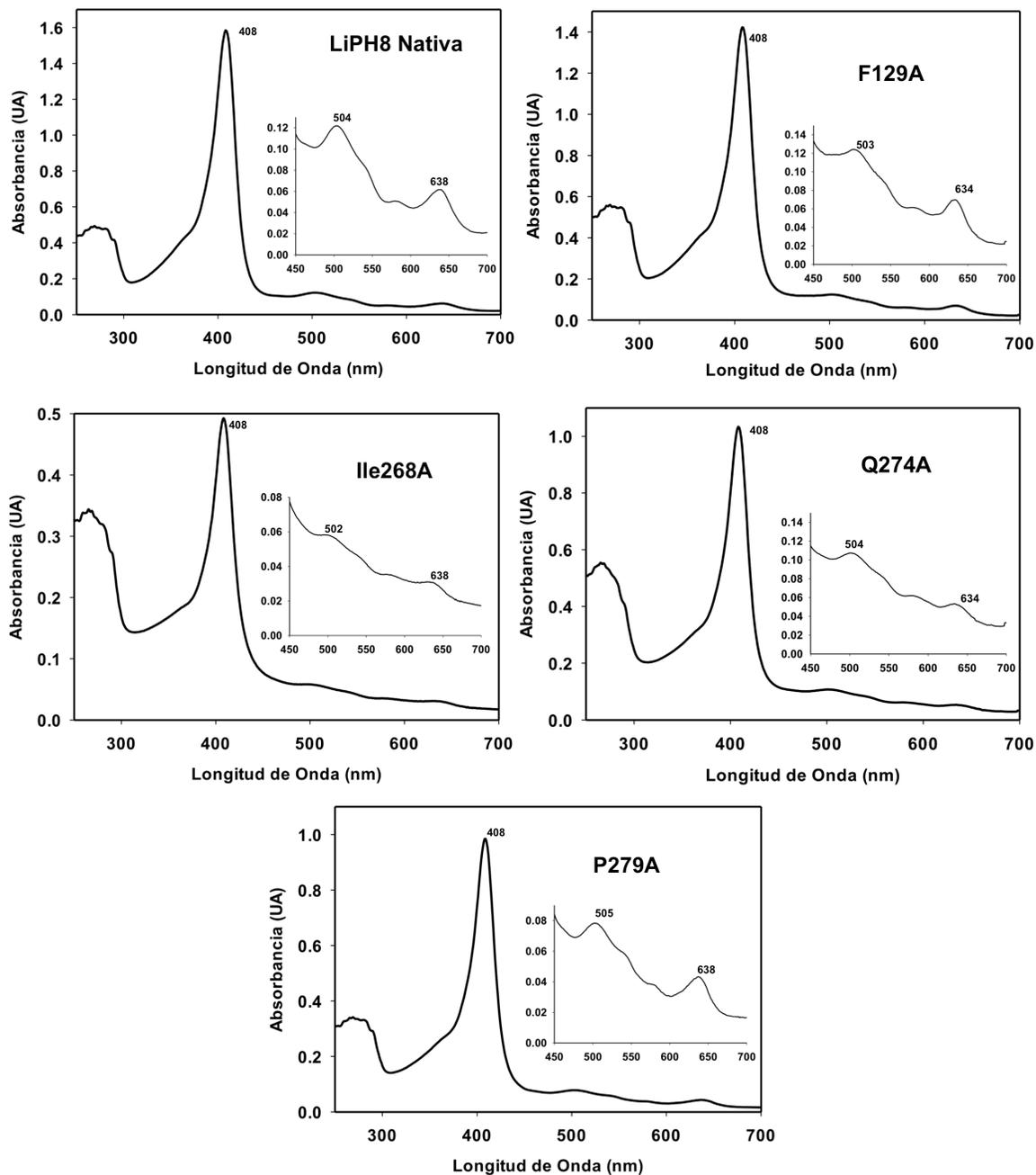


Figura 4.2.3.3. Espectros UV-Visible de LiPH8 y las 4 variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171. La banda Soret y los detalles de las bandas CT1 Y CT2 son indicados en negrilla.

4.2.4- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y las variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171

Para la oxidación de AV a VAD, evaluada a pH 3.0, 25 °C y en presencia de peróxido de hidrógeno en concentraciones saturantes (0.25mM); las constantes enzimáticas obtenidas para LiPH8 silvestre y los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171, son indicadas en la **Tabla 4.2.4.1**. Se observa que los mutantes F129A, I268A, Q274A y P279A conservaron valores similares para las constantes K_m y K_{cat} , cuando éstas son comparadas contra los valores de LiPH8 silvestre (**Ver Tabla 4.2.4.1 y Figura 4.2.4.1 A**). Estos resultados sugieren entonces que mutaciones simples de los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 no tienen impacto en la unión o catálisis de AV a VAD. Los diagramas de interacción, obtenidos desde las SDMs (**Figura 4.1.2.1**), sugirieron que las interacciones hidrofóbicas detectadas entre los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 y AV eran potencialmente importantes para la estabilización del sustrato en la superficie de la enzima, pero la información obtenida experimentalmente sugiere que dichas interacciones no afectan los parámetros cinéticos de oxidación para el AV.

Tabla 4.2.4.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171. Son especificados los valores promedio \pm desviación estándar.

Sustratos	Constantes cinéticas	LiPH8	Mutantes			
		Nativa	F129A	I268A	Q274A	P279A
AV	K_m	73.9 \pm 3.9	63.6 \pm 2.6	56.1 \pm 3.3	82.4 \pm 8.2	59.4 \pm 3.4
	K_{cat}	20.9 \pm 0.2	17.8 \pm 0.2	15.7 \pm 0.2	18.2 \pm 0.4	20.2 \pm 0.2
	K_{cat}/K_m	282.1 \pm 15.2	279.9 \pm 15.2	279.9 \pm 16.8	220.9 \pm 22.5	340.1 \pm 19.8
HQ	K_m	21.8 \pm 1.2	18.1 \pm 1.4	11.3 \pm 1.2	17.6 \pm 1.0	25.1 \pm 3.1
	K_{cat}	9.5 \pm 0.2	9.4 \pm 0.2	6.9 \pm 0.26	8.2 \pm 1.0	8.2 \pm 0.3
	K_{cat}/K_m	427.2 \pm 26	519.8 \pm 41.9	606.5 \pm 63.5	467.3 \pm 29.0	326.7 \pm 42.0

Choinowski *et al.*²¹ propusieron que la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 era un sitio potencial de oxidación y estabilización de sustratos de naturaleza fenólica. Para verificar dicha hipótesis, se realizaron estudios de cinética enzimática para la oxidación de hidroquinona (HQ) ($\epsilon_{247} 21.000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Como lo demuestran los resultados de la **Tabla 4.2.4.1 y Figura 4.2.4.1 B**, no se obtuvieron alteraciones significativas de los parámetros

cinéticos enzimáticos K_m y K_{cat} , para lo oxidación de HQ, tras mutar los residuos Phe129, Ile268, Gln274 y Pro279 de LiPH8.

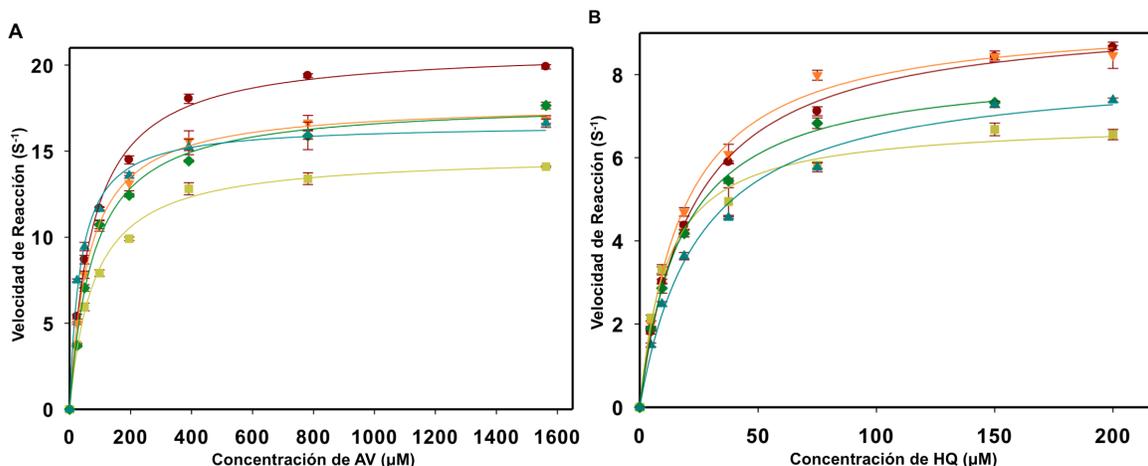


Figura 4.2.4.1. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171. En la gráfica ●LiPH8 ▼F129A ■I268A ◆Q274A ▲P279A.

Los resultados expuestos previamente descartan la hipótesis de que los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 cumplan alguna función en la oxidación o unión de sustratos de naturaleza fenólica y no fenólica. Por otro lado, un análisis combinado de las secuencias genómicas de peroxidasas de clase II, halladas en los genomas de hongos del orden de los poliporales (**Ver Figura 4.2.4.2**), detallan que los residuos Phe129 y Phe164 de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 están conservados en la estructura de lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) y versátil peroxidasas (VP) con un consenso de 82% y 100%, respectivamente. Este hecho permite suponer que estos residuos son parte del “scaffold” de las peroxidasas de clase II y su función es netamente estructural.

	161	171	181	191	201	211	221	231
CS-MnP1	R-ELLAGRKN	AVAPAIIDGLI	PVPQDNVSTI	LARFADA--G	NFSPFEVVS	LASHSVARAD	KVDPTLDAAP	FDSTPFTFDD
CS-MnP3	RVNFLAGRKN	AVAPAIIDGLI	PEPQDNVTSI	LARFADA--G	NFSPFEVVS	LASHSVARAD	KVDPTLDAAP	FDSTPFTFDD
DS-MnP1	QLEFLAGRPN	GTAPAIIDGLI	PEPQDSIDDI	LARFDADA--G	GFTPFVVS	LASHTVARAD	HVDPTLDAAP	FDSTPFTFDD
DS-MnP2	RVNFLAGRKN	AVAPAIIDGLI	PEPQDNVTSI	LARFADA--G	NFSPFEVVS	LASHSVARAD	KVDPTLDAAP	FDSTPFTFDD
PC-MnP1	RLEFLAGRPN	KTIAAVDGLI	PEPQDSVTKI	LQRFEDA--G	GFTPFVVS	LASHSVARAD	KVDQTLDAAP	FDSTPFTFDD
PC-MnP2	RLEFMAGRPN	TTIPAVEGLI	PEPQDSVTKI	LQRFEDA--G	NFSPFEVVS	LASHTVARAD	KVDETIDAAP	FDSTPFTFDD
PC-MnP3	QLEFLAGRPN	KTIPAIIDGLI	PEPQDSVTSI	LERFKDA--G	NFSPFEVVS	LASHSVARAD	KVDETIDAAP	FDSTPFTFDD
PS-MnP2A	QLEFLAGRPN	ATAPAVDGLI	PEPQDNVTHI	LARFADA--G	GFTPFVVS	LASHTVARAD	KVDLTIDAAP	FDSTPFTFDD
PE-PS1	RLNFFLGRPD	ATQIPPDGLV	PEPFDDVTKI	LSRMGDA--G	-FSTVEVW	LASHTIAAAD	HVDPSIPGTP	FDSTPFTFDD
PO-MnP2	RLNFFLGRPD	ATQIPPDGLV	PEPFDSVDKI	LSRMGDA--G	-FSTVEVW	LSSTIAAAD	LVDPSIPGTP	FDSTPFTFDD
PE-PL2	RIPFFLGRPD	AVAASPDHLV	PEPFDSVDSI	LARMGDA--G	-FSPVEVW	LASHSIAAAD	KVDPSIPGTP	FDSTPFTFDD
PO-MnP3	RLNFFLGRPP	ATAASPNGLI	PEPFDTVTDI	LARMGDA--G	-FSPVEVW	LASHSIAAAD	HVDETIPGTP	FDSTPFTFDD
TV-MnP2	QLDVFIGRPD	ATQPAPDLTV	PEPFDTVDSI	IERFSDA--G	GFTPAEIVAL	LVSHSIAAAD	HVDPSIPGTP	FDSTPFTFDD
TV-PGV	RLQFLLGRPN	ATQPAPDKTI	PEPFDTVDSI	LARFLDA--A	DFSPAEEVVAL	LASHTIAAAD	EVDPTIPGTP	FDSTPFTFDD
TV-PGVII	RLDVFLGRKD	ATQPAPDLTV	PEPFDDVTKI	LARFDADA--G	KFSSDEVVAL	LVSHSIAAAD	HVDPTIPGTP	FDSTPFTFDD
PO-MnP1	RIPFFLGRPP	AKAASPNGLV	PEPFDTITDI	LARMDDA--G	-FVSPVEVW	LSAHSVAAAD	HVDETIPGTP	FDSTPFTFDD
TV-LiP12	QLAAAFVGRKD	ATQPAPDGLV	PEPFHTPDQI	FDRLADASQ	EFDPILTIVW	LTAAHTVAAAN	DVDPTKSGLP	FDSTPFTFDD
TV-LiPGII	QLAAAFVGRKD	ATQPAPDGLV	PEPFHTPDQI	FDRLADASQ	EFDPILTIVW	LTAAHTVAAAN	DVDPTKSGLP	FDSTPFTFDD
TV-LiP7	RLDFFLGRKD	ATRPAPDGLV	PEPFDTLEDV	FARLADASQ	EFDEILTIVW	LTAAHTIAATD	HLDPTIPGTP	MDSTPHIWD
PC-LiPE	QMNFFTGKRP	ATQPAPDGLV	PEPFHTVDQI	IARVNDA--G	EFDELELVW	LSAHSVAAVN	DVDPTVQGLP	FDSTPFTFDD

PC-LiPB	QMNFFTGRRP	ATQPAPDGLV	PEPFHTVDQI	IARVNDAA--G	EFDELELVWM	LSAHSVAAVN	DVDPTVQGLP	FDSTPGIFDS
PC-LiPA	QMNFFTGRAP	ATQPAPDGLV	PEPFHTVDQI	INRVNDAA--G	EFDELELVWM	LSAHSVAAVN	DVDPTVQGLP	FDSTPGIFDS
PC-LiPH	QMNFFTGRAP	ATQAAPDGLV	PEPFHTVDQL	INRVNDAA--G	QFDELELVWM	LSAHSVAAVN	DVDPTIQGLA	FDSTPGIFDS
PC-LiPF	QMNFFTGRAP	ATQAAPDGLV	PEPFHTVDQI	ISRVNDAA--G	EFDELELVWM	LSAHSVAAAAN	DVDPTIQGLA	FDSTPGVFDSD
PC-LiPC	QMNFFTGRAP	ATQPAPDGLV	PEPFHSDVQI	IDRVFDDA--G	EFDELELVWM	LSAHSVAAAAN	DIDPNIQGLP	FDSTPGIFDS
PC-LiPJ	QMNFFLGRPA	PTKAAPDGLV	TEPFHSDVQI	LARMADAA--G	EFDELETVWL	LSAHSVAAAAN	DVDPTRNGLP	FDSTPGIFDFT
PC-LiPD	QMQFFLGRPE	ATQAAPDGLV	PEPFHTIDQV	LARMLDAA--G	GFDEIETVWL	LSAHSIAAAAAN	DVDPTISGLP	FDSTPGQFDS
PR-LiP	TLNAFIGRKD	ATQAAPDGLV	PEPFHVDNTI	LARFNDA--G	DFDELETVWF	LIAHSVAAQN	DIDPAVSHAP	FDSTPSVMDG
BA-LiP	TLTFSIGRPP	PVAAAAPDGLV	PEPFHTADQI	FARMLDAA--L	QFDELETVWG	LIAHTVGAASN	DVDPSIPRTP	FDSTPSIFDG
TV-MRP	QIGFFAGRSN	DSQPAPDKLV	PLPSDSVTDI	LARVADAA--G	-FAPVELVWM	LISHTVAAQD	KVDDSSIPGTP	FDSTPSDFDA
GA-MnP	QLSFFAGRSN	DSQPSPPNLV	PLPSDTADTI	LSRFSDAA--G	-FDAVEVVWL	LVSHTVGSQN	TVDSSIPGAP	FDSTPSDFDA
CC-CIP	RLEFLTGRSN	SSQPSPPSLI	PGPGNTVTAI	LDRMGDAA--G	-FSPDEVVDL	LAAHSLASQE	GLNSAIFRSP	LDSTPQVFDT
PE-PL1	RIPFFLGRPD	AVAASPDHLV	PEPFDSVDSI	LARMSDAA--G	-FSPVEVVWL	LASHSIAAAD	KVDPSIPGTP	FDSTPGVFDSD

Figura 4.2.4.2. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de peroxidases fúngicas. LiP, MnP, VP, CIP y otras peroxidases de: *Bjerkandera adusta* (BA), *Coryphaenoides cinereus* (CC), *Dichomitus squalens* (DS), *Ganoderma applanatum* (GA), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Phlebia radiata* (PR), *Pleurotus eryngii* (PE), *Pleurotus ostreatus* (PO), *Ceriporiopsis subvermispota* (CS) and *Trametes versicolor* (TV). El alineamiento fue generado por alineación progresiva usando el software Mega7⁷³. Fueron alineadas las proteínas maduras con código Genbank: PS-MnP1, U60413; PS-MnP3, AF161585; DS-MnP1, AF157474; DS-MnP2, AF157475; PC-MnP1, M:60672; PC-MnP2, L29039; PC-MnP3, U70998; PS-MnP2A, AF161078; PE-PS1 AF175710; PO-MnP2, AJ243977; PE-PL2, AF007224; PO-MnP3, AB011546; TV-MnP2, Z30668; TV-PGV, X77154; TV-PGVII, Z54279; PO-MnP1, U21878; TV-LiP12, M64993; TV-LiPGII, X75655; TV-LiP7, Z30667; PC-LiPE (H8), M92644; PC-LiPB (H8), M37701; PC-LiPA (H8), M27401; PC-LiPH (H8), M24082; PC-LiPF, M77508; PC-LiPC (H10), M63496; PC-LiPJ, AF140062; PC-LiPD (H2), X15599; PR-LiP, 126290; BA-LiP, 444058; TV-MRP, AF008585; GA-MnP, AB035734; and CC-CIP, X70789 y PE-PL1 AF007221.

4.3- Resultados y discusión del objetivo N° 3:

“Estudiar en detalle la función de cada uno de los residuos del microambiente ácido alrededor del Trp171 en la catálisis de LiPH8”.

4.3.1- Generación de los mutantes del entorno ácido alrededor de Trp171 por PCR, producción enzimática, activación *in vitro*, purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos.

Al igual que con los residuos de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171, las principales interacciones intermoleculares detectadas por SDM, de AV⁺ y AV con los residuos del entorno ácido de Trp171 (**Figura 4.1.2.1 A, C, E**); fueron evaluadas por medio de estudios de mutagénesis sitio dirigida y cinética enzimática. Smith *et al.*¹ reportaron que los residuos del microambiente ácido alrededor del Trp171 eran de importancia en la catálisis del AV por LiPH8, sin embargo, no se ha desarrollado un estudio detallado donde se evalúe la importancia de cada uno de esos residuos en la unión y/o catálisis enzimática. Por tanto, y adicionalmente a los residuos Glu168, Asp264 y Phe267 que presentaron interacción con AV⁺ y AV en las SDM con un porcentaje mayor al 1%, los residuos Glu250 y Asp165 fueron también incluidos en este estudio. Los sistemas de estudio planteados forman parte del objetivo 3 de la presente tesis.

Inicialmente, se eligieron las mismas mutaciones simples de los residuos Asp165, Glu168, Glu250, Asp264 y Phe267 reportadas por Smith *et al.*¹ and Sollewijn *et al.*⁴⁰, con el objetivo de comparar los resultados. Los mutantes D165N, E168Q, E250Q, D264N y F267I fueron obtenidos por mutagénesis sitio dirigida usando como templado el plásmido pET23b-LiPH8 y los *primer* respectivos (**Anexo 4**). Las variantes dobles y cuádruple fueron formuladas para analizar el efecto cooperativo entre los residuos de LiPH8 en la interacción con los sustratos, y en base a los resultados de las interacciones detectadas por SDM y resultados experimentales de los mutantes simples.

En la **Figura del Anexo 9** se muestra el alineamiento múltiple del DNA plasmidial de los plásmidos mutagénicos obtenidos tras introducción de la mutación vía PCR. Los mutantes del microambiente ácido alrededor del residuo Trp171 se sobre expresaron de manera similar a lo observado en la **Figura 4.2.2.1** y, tras replegado *in vitro* y purificación por un único paso cromatográfico de intercambió aniónico, se obtuvieron las proteínas analizadas por SDS-PAGE en la **Figura 4.3.1.1**

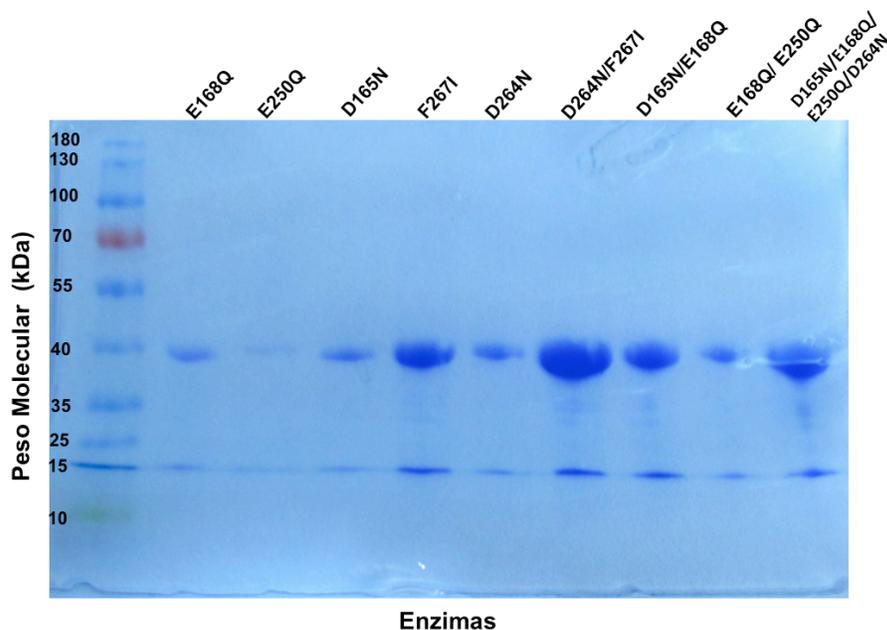


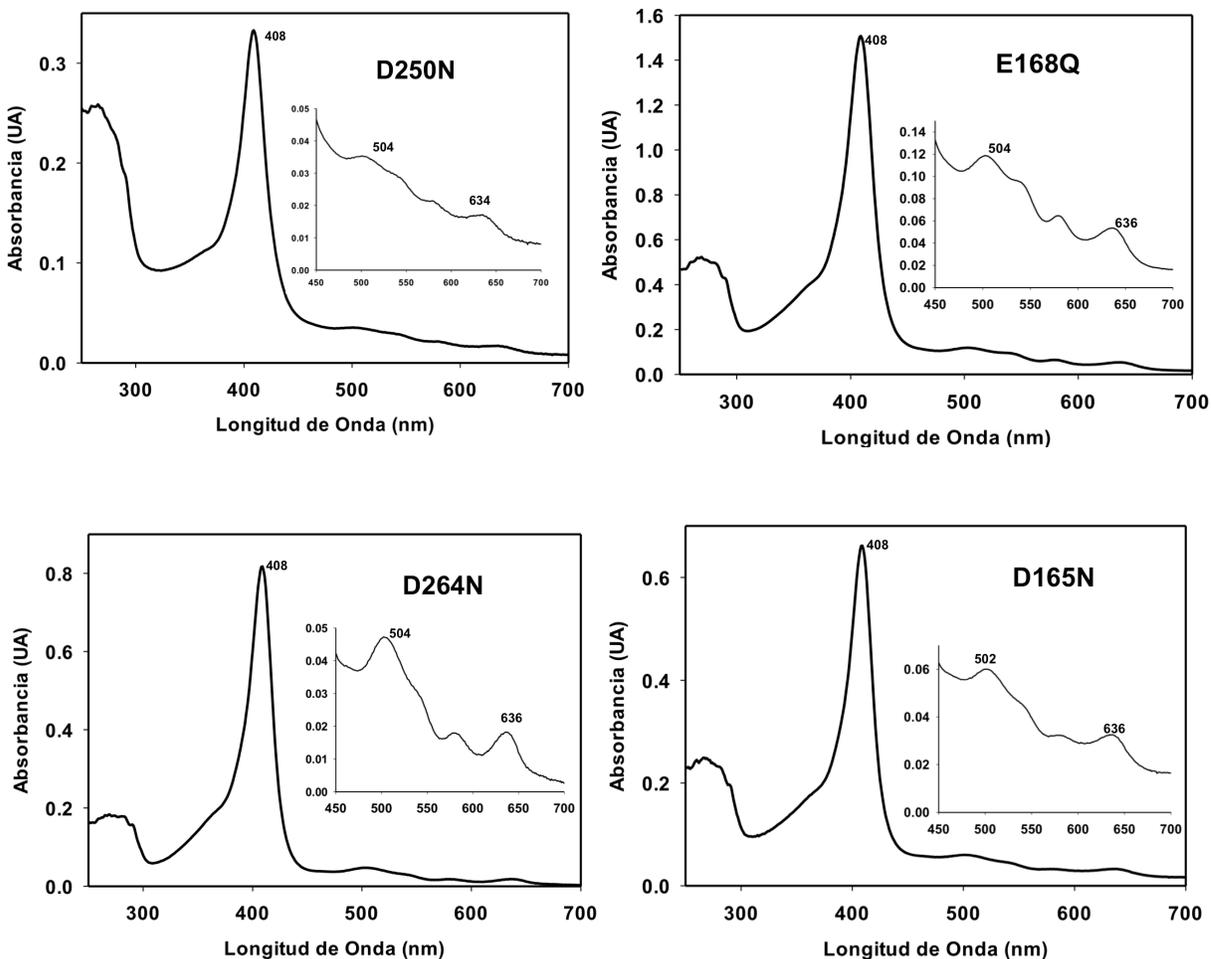
Figura 4.3.1.1. SDS-PAGE Enzimas mutantes del entorno ácido del Trp171

Todas las enzimas presentaron como banda mayoritaria la banda de 40 kDa (**Figura 4.3.1.1**) y aquellas enzimas donde el residuo Glu250 no fue mutado, presentaron un R_z mayor de 2.5 (**Tabla 4.3.1.1**).

Tabla 4.3.1.1. Valores R_z de las variantes del entorno ácido alrededor de Trp171 en LiPH8.

Mutante	R_z	Mutante	R_z	Mutante	R_z
D250N	1.4	E168Q	3.0	D264N	4.6
D165N	2.8	F267I	4.0	D165N/E168Q	3.9
D165N/E168Q/D264N/F267I	3.6	E168Q/E250Q	0.5	D264N/F267I	3.9
D165N/E168Q/E250Q/D264N/F267I	1.0	W171S	3.3		

La mutación del residuo Glu250 produjo un bajo porcentaje de recuperación de proteína activa desde las soluciones de replegado *in vitro*; pero aún así las proteínas obtenidas con mutación de este residuo, al igual que las variantes de los otros residuos del entorno ácido alrededor de Trp171, presentaron el espectro clásico de las peroxidasas de clase II teniendo todas las enzimas máximos aproximados de espectro UV-Visible a 408nm, 504nm y 638nm (**Figura 4.3.1.2**).



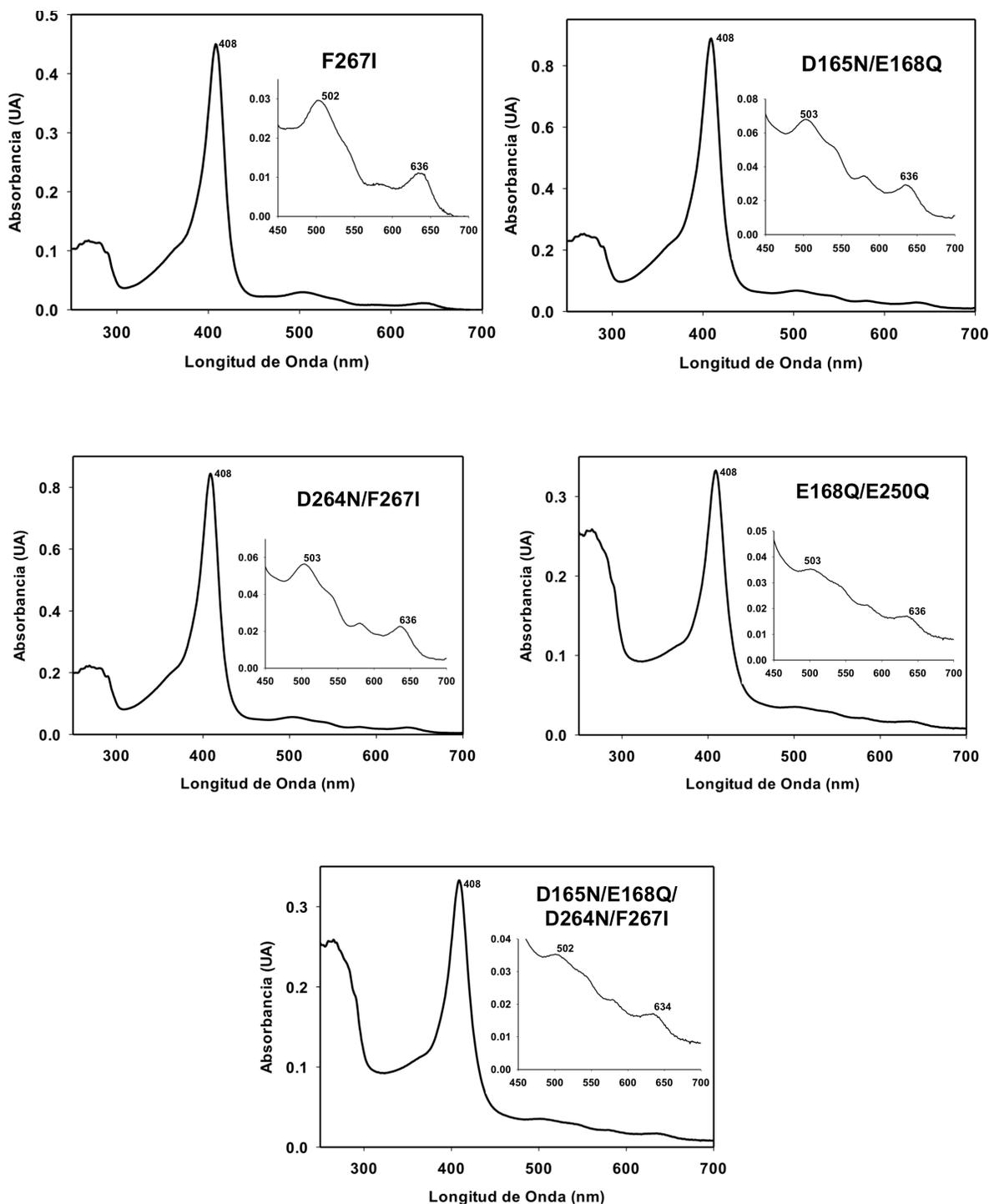


Figura 4.3.1.2. Espectros UV-Visible de las variantes del entorno ácido alrededor del Trp171 de LiPH8. La banda Soret y los detalles de las bandas CT1 y CT2 son indicados en negrilla.

Al evaluar los parámetros cinéticos de la oxidación de AV a VAD por los mutantes simples del microambiente ácido alrededor del Trp171, los resultados estuvieron de acuerdo con los previamente expuestos por Smith *et al*¹, o sea que la neutralización de la

carga parcial de los residuos Glu168 y Glu250 produjo un aumento en la afinidad aparente del sustrato (K_m) de 3 y 5 veces, respectivamente (ver **Tabla 4.3.1.2.** y **Figura 4.3.1.3. A**). Adicionalmente, la actividad enzimática (K_{cat}) disminuyó un 75% y 40% al mutar los residuos Glu250 y Asp165, respectivamente. Para verificar si estos cambios descritos en los parámetros cinéticos de LiPH8 eran debidos a la función específica de cada residuo en el ciclo catalítico de LiPH8, se evaluó la oxidación de otros dos sustratos: DMP como representante de las unidades fenólicas de lignina y ABTS como representante de los compuestos de bajo potencial redox.

Tabla 4.3.1.2. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y variantes del entorno ácido alrededor de Trp171. Son especificados los valores promedio \pm desviación estándar.

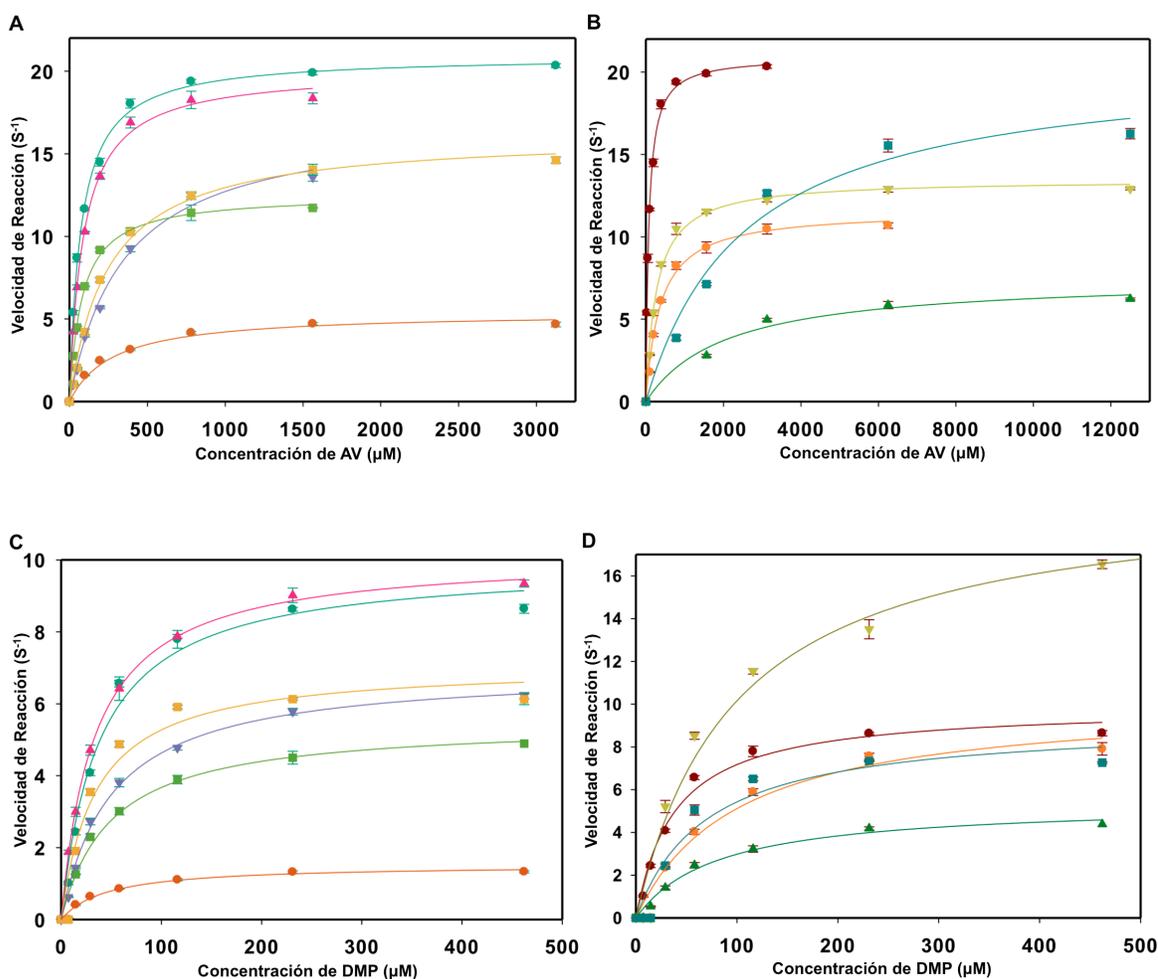
Sustratos	Constantes cinéticas	LiPH8				
		Nativa	E250Q	E168Q	D264N	D165N
AV	K_m	73.0 \pm 3.9	221.2 \pm 22.3	347.6 \pm 37.0	90.1 \pm 5.5	80.9 \pm 4.1
	K_{cat}	20.9 \pm 0.2	5.2 \pm 0.1	17.1 \pm 0.7	20.0 \pm 0.3	12.5 \pm 0.2
	K_{cat}/K_m	282.1 \pm 15.2	23.5 \pm 2.4	49.2 \pm 5.6	222.0 \pm 14.0	154.5 \pm 8.2
DMP	K_m	38.1 \pm 5.8	39.3 \pm 3.2	50.2 \pm 3.9	33.4 \pm 1.0	42.7 \pm 2.4
	K_{cat}	9.9 \pm 0.4	1.5 \pm 0.0	7.0 \pm 0.2	10.1 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1
	K_{cat}/K_m	259.8 \pm 40.9	38.2 \pm 3.1	139.4 \pm 11.5	302.4 \pm 9.5	214.1 \pm 7.4
ABTS	K_m	26.7 \pm 1.2	37.2 \pm 4.1	26.4 \pm 1.8	14.5 \pm 0.7	30.3 \pm 0.6
	K_{cat}	19.9 \pm 0.3	9.2 \pm 0.3	16.2 \pm 0.3	22.5 \pm 0.4	15.7 \pm 0.1
	K_{cat}/K_m	745.3 \pm 35.3	247.3 \pm 28.3	613.6 \pm 43.4	1551.1 \pm 79.8	519.7 \pm 3.3

Sustratos	Constantes cinéticas	Mutantes				
		F267I	D165N/E168Q	D264N/F267I	E168Q/E250Q	D165N/E168Q/ D264N/F267I
AV	K_m	233.4 \pm 20.2	367.8 \pm 33.9	273.2 \pm 23.6	2156.4 \pm 474.2	2549.2 \pm 627.9
	K_{cat}	15.7 \pm 0.3	11.6 \pm 0.3	13.5 \pm 0.3	7.6 \pm 0.6	20.7 \pm 1.8
	K_{cat}/K_m	67.3 \pm 6.0	31.5 \pm 3.0	49.4 \pm 4.4	3.5 \pm 0.8	8.1 \pm 2.1
DMP	K_m	64.2 \pm 10.3	78.3 \pm 10.5	78.3 \pm 6.8	75.4 \pm 11.4	81.8 \pm 12.3
	K_{cat}	7.3 \pm 0.4	9.6 \pm 0.4	9.2 \pm 0.5	5.3 \pm 0.3	10.9 \pm 0.5
	K_{cat}/K_m	113.7 \pm 19.3	122.6 \pm 17.2	245.2 \pm 22.2	70.3 \pm 11.3	133.3 \pm 20.9
ABTS	K_m	28.8 \pm 1.2	38.3 \pm 3.4	22.6 \pm 1.9	5.4 \pm 0.5	5.9 \pm 0.8
	K_{cat}	19.4 \pm 0.2	26.2 \pm 0.7	29.3 \pm 0.7	13.2 \pm 0.3	15.2 \pm 0.8
	K_{cat}/K_m	673.6 \pm 28.9	684.1 \pm 63.4	1294.6 \pm 115.8	2459.1 \pm 215.0	2605.7 \pm 394.6

De manera similar a los resultados obtenidos para la oxidación del AV, la oxidación de DMP y ABTS se vio afectada en términos de la K_{cat} si el residuo Glu250 era mutado, donde la K_{cat} disminuyó en un orden de 7 y 2 veces para la oxidación de DMP y ABTS

respectivamente. La mutación simple de los otros residuos ácidos alrededor del Trp171 no cambió significativamente los parámetros cinéticos de la oxidación de DMP y ABTS (**Tabla 4.3.1.2, Figura 4.3.1.3 C y E**).

El anillo aromático del residuo Phe267 demostró ser importante en la afinidad aparente del AV y DMP; como fue previamente reportado por Sollewijn *et al*⁴⁰. Si el sistema rico en electrones π es removido, (para el caso en estudio, mutar Phe por Ile), el valor de la K_m para el AV y DMP aumenta 3 y 1.5 veces, respectivamente. Las interacciones π -stacking establecidas entre los anillos aromáticos del sustrato y el residuo Phe267 no son viables en el mutante F267I.



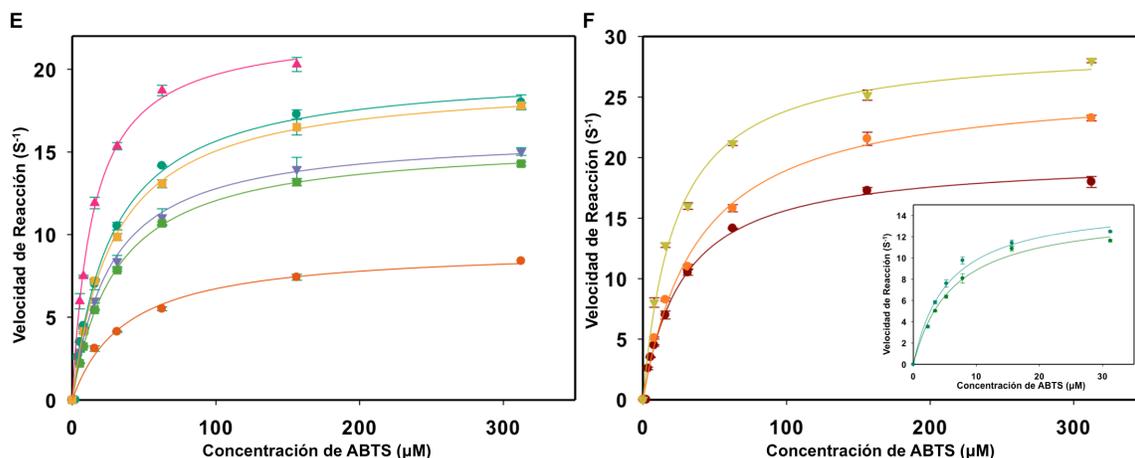


Figura 4.3.1.3. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y mutantes del entorno ácido alrededor de Trp171. En gráficos A,C,E ●LiPH8 ●E250Q ▼E168Q ▲D264N ■D165N ■F267I. Gráficos B,D,F ●LiPH8 ●D165N/E168Q ▼D264N/F267I ▲E168Q/E250Q ■D165N/E168Q/D264N/F267I.

En estudios previos de modelado y simulación molecular realizados por Recabarren *et al*³⁹, y resultados obtenidos en las SDMs descritas en la sección 4.1.2, se demostró que los residuos Asp264 y Phe267 estabilizan de manera conjunta el AV en la superficie de la enzima por medio de interacciones π -stacking y enlaces de hidrógeno. Al cambiar simultáneamente ambos residuos en el mutante D264N/F267I no se observó un efecto sinérgico en la interacción del AV porque el mutante doble conserva los parámetros enzimáticos K_{cat} y K_m en valores muy similares al del mutante simple F267I.

Por el contrario, el mutante E168Q/E250Q sí reflejó un efecto sinérgico en la oxidación del AV. En este mutante doble, el valor de la K_m aumento 30 veces y la K_{cat} disminuyó 3 veces al comparar los valores de K_m y K_{cat} frente a los de la LiPH8 nativa. El aumento de 30 veces en el valor de la K_m podría atribuirse a la alteración conjunta de las interacciones con los residuos Glu168 y Glu250. Estos residuos habían demostrado alterar en un orden de 5 y 3 veces el valor de la K_m cuando la mutación fue simple; por su parte el valor de la K_{cat} se mantuvo en valores similares a los del mutante E250Q.

El mutante cuádruple, en conjunto con la variante E168Q/E250Q, demostraron oxidar con mejor eficiencia el ABTS. En ambos mutantes el valor de la K_m decreció 5 veces y estos resultados pueden ser racionalizados en términos de que, debido a la remoción del efecto electrostático repulsivo y las interacciones estéricas, el sustrato aniónico y

voluminoso ABTS puede interactuar mejor con LiPH8. Fernández-Fueyo *et al.*⁷⁴ describieron resultados similares cuando las cargas del canal del grupo hemo en MnP6 de *C. subvermispota* fueron neutralizadas.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos para LiPH8, el mutante homólogo de E250Q (E243Q) fue producido en versátil peroxidasa (VP) por mutagénesis sitio dirigida. El plásmido pFLAG1-VPL2 usado por Acebes *et al.*⁷⁵ fue usado como templado para generar el mutante E243Q por PCR empleando los *primer* mutagénicos especificado en el **Anexo 4**. La enzima VP nativa y la mutante E243Q fueron expresadas en células *E. coli* W3110 en medio de cultivo TB por inducción con IPTG. Luego, los polipéptidos inactivos de las enzimas fueron obtenidos desde los cuerpos de inclusión, y se activaron bajo las condiciones de replegado *in vitro* especificadas a continuación: urea 0.16 M, hemina 20 μ M, CaCl₂ 5 mM, DTT 0.1mM, glutatión oxidado 0.5 M y 0.1 mg/mL de polipéptido en buffer Tris/HCl 20 mM pH 9.5. Las enzimas activas se purificaron desde las soluciones de replegado concentradas y dializadas por un único paso cromatográfico empleando la columna Resource-Q. Su identidad fue verificada por SDS-PAGE y por la evaluación de los máximos del espectro UV-Visible en el rango 250-700nm. (**Ver Figura 4.3.1.4**).

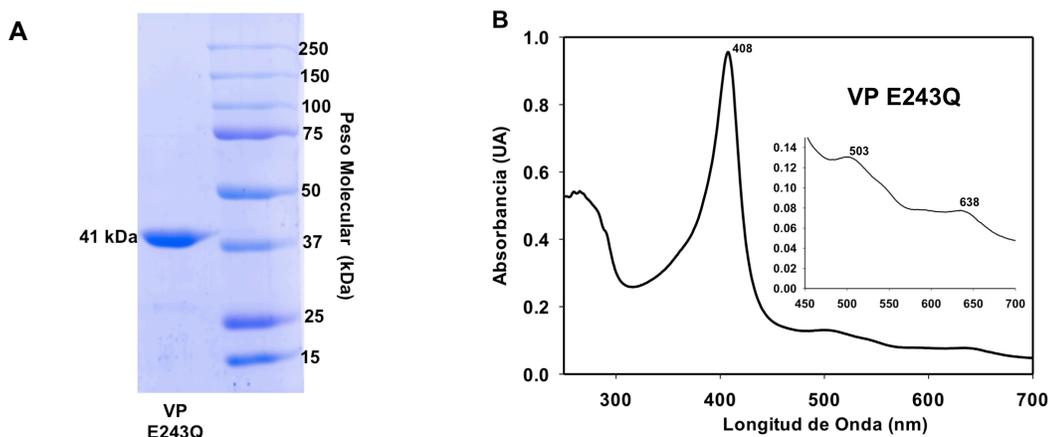


Figura 4.3.1.4. (A) SDS PAGE y **(B)** Espectro UV-Visible para la variante E243Q de VP. La banda Soret y los detalles de las bandas CT1 y CT2 son indicados en negrilla.

Los parámetros cinéticos para la oxidación de AV, DMP y ABTS fueron evaluados en concentraciones saturantes de H₂O₂ (0.25 mM) y en buffer tartrato 0.1 M pH 3.0. La

oxidación de Mn^{2+} se evaluó a pH 3.5 considerando la formación del complejo de tartrato de Mn^{3+} y su coeficiente de absorción Molar $\epsilon_{238} = 6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

De forma similar a los resultados obtenidos en las cinéticas de oxidación de AV por el mutante E250Q en LiPH8, en el mutante E243Q de VP la K_{cat} disminuye para la oxidación de AV, DMP y ABTS (4, 3 y 2 veces, respectivamente) cuando el residuo Glu243 es mutado por Glutamina (**Ver Tabla 4.3.1.3 y Figura 4.3.1.5 A-D**). La oxidación del Mn^{2+} no se vio afectada porque el sitio de oxidación de Mn^{2+} ha sido localizado y descrito en otra región de la enzima⁷⁶. Este hecho permite concluir que las alteraciones en la K_{cat} en E243Q son debidas a la mutación puntual en el residuo Glu243 y no a cambios estructurales en el mutante.

Tabla 4.3.1.3. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}/\text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP, ABTS y Mn^{2+} por VP y la variante E243Q. Son especificados los valores promedio \pm desviación estándar.

Sustratos	Constantes cinéticas	VP	Mutante
		Nativa	E243Q
AV	K_m	2749.1 \pm 45.3	2271.1 \pm 145.8
	K_{cat}	6.6 \pm 0.0	1.6 \pm 0.0
	K_{cat}/K_m	2.4 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0
DMP	K_m	17.6 \pm 1.0	18.3 \pm 1.3
	K_{cat}	7.1 \pm 0.1	2.6 \pm 0.0
	K_{cat}/K_m	403.4 \pm 23.6	142.1 \pm 10.1
ABTS	K_m	7.9 \pm 0.9	7.3 \pm 0.6
	K_{cat}	15.4 \pm 0.6	7.8 \pm 2.5
	K_{cat}/K_m	1949.4 \pm 234.7	1068.5 \pm 393.5
Mn^{2+}	K_m	267.6 \pm 19.8	224.3 \pm 10.4
	K_{cat}	282.1 \pm 6.1	247.6 \pm 3.2
	K_{cat}/K_m	1054.2 \pm 81.1	1103.9 \pm 53.1

Finalmente, con la intención de verificar si la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 cumplía la función de sitio auxiliar de unión y oxidación de los sustratos en LiPH8, se produjo el mutante quintuple D165N/E168Q/E250Q/D264N/F267I usando como templado el plásmido del mutante cuádruple y los *primer* mutagénicos de E250Q (**Anexo 4**). La hipótesis de trabajo era que al alterar todo el sitio principal de unión de los sustratos, o sea los residuos cercanos al residuo catalítico Trp171, el posible sitio accesorio entraría a jugar un papel en la oxidación de AV. Sin embargo, y de manera similar a las condiciones de

oxidación reportadas para el mutante W171S, no se detectó oxidación alguna de AV hasta alcanzarse concentraciones superiores a $12500 \mu\text{M}$ ³⁸.

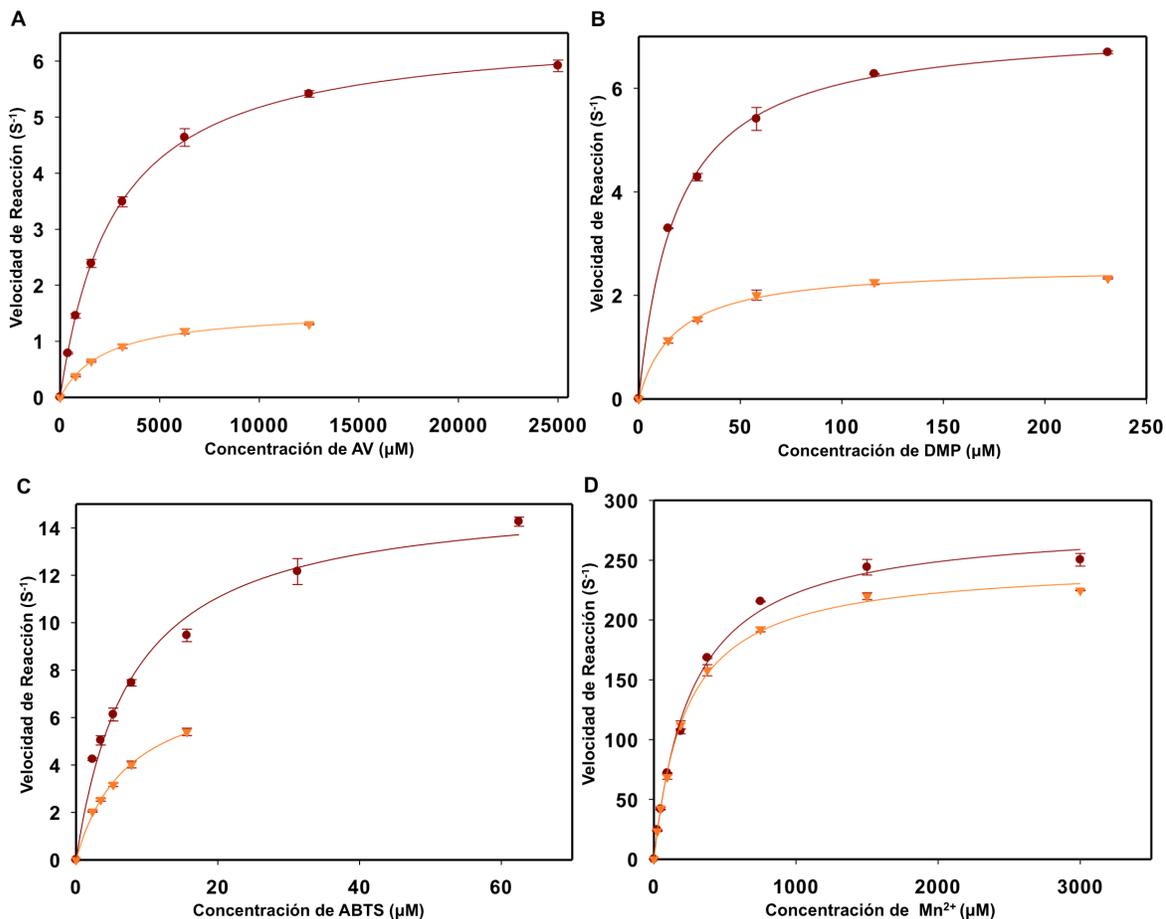


Figura 4.3.1.5. Cinéticas de la oxidación de AV, DMP, ABTS y Mn^{2+} por VP y mutante E243Q en todas las gráficas ●VP ●E243Q.

4.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel semiempírico de mecánica cuántica.

La energía de interacción (ΔE) para el sistema $(\text{LiP-AV})^{*+}$ fue evaluada a un nivel de cálculos de mecánica cuántica semiempírico (Semiempirical Quantum Mechanics (SQM)). Para ello, la enzima silvestre de LiPH8 y los mutantes fueron modelados considerando segmentos moleculares que incluían los residuos ubicados en un radio de 5.5 Å alrededor del Trp171 y siguiendo la metodología descrita en sección 3.3.2.

En una primera aproximación se evaluó la ΔE entre cada aminoácido del segmento de la proteína en su estado silvestre (SEG) y el AV tanto en forma neutra (AV) como radicalaria (AV^{*+}). Los resultados que se presentan en la **Tabla 4.3.2.1** permiten observar que los valores más favorables (más negativos) de ΔE fueron obtenidos entre cada

aminoácido de la proteína silvestre y el AV⁺. Los aminoácidos más próximos al Trp171; residuos Asp165, Asp264, Glu250, Glu168 y Phe267; fueron los que presentaron valores más favorables de ΔE con AV⁺.

Tabla 4.3.2.1. Valores promedio de ΔE (kcal·mol⁻¹) entre AV (neutro y radical catiónico) y los 9 amino ácidos (aa) localizados a menos de 5.5 Å alrededor de Trp171.

aa	ΔE (kcal·mol ⁻¹)	
	aa/AV	aa/ AV ⁺
Trp171	-11.9 ± 0.2	-13.8 ± 0.4
Phe164	-7.4 ± 0.4	-21.5 ± 0.6
Asp165	-10.5 ± 0.2	-87.1 ± 0.7
Leu167	-7.4 ± 0.3	-14.3 ± 0.5
Glu168	-10.2 ± 0.2	-75.7 ± 0.6
Glu250	-10.3 ± 0.2	-76.5 ± 0.5
Lys 260	-10.3 ± 0.3	30.1 ± 0.7
Asp264	-10.4 ± 0.3	-83.1 ± 0.4
Phe267	-7.9 ± 0.3	-22.7 ± 0.6
Ile268	-5.5 ± 0.2	-13.6 ± 0.3

A continuación, se evaluó la energía de interacción entre cada aminoácido del segmento de la proteína en su estado mutado (MSEG) y el sustrato en forma radicalaria (AV⁺) para los mutantes simples del entorno ácido al Trp171 realizados a nivel experimental. Los resultados se presentan en la **Tabla 4.3.2.2** y se puede observar que para todas las variantes generadas, se obtienen valores de ΔE menos favorables (más positivos) entre el aminoácido mutado y el AV⁺ respecto al mismo aa en LipH8 silvestre. La pérdida de afinidad observada a nivel experimental (mayores valores de K_m), es predicha adecuadamente por los cálculos de ΔE y se podría plantear que estos cálculos pueden predecir posibles mutaciones que mejoren o empeoren la interacción enzima-sustrato en el sistema bajo estudio.

Tabla 4.3.2.2. Valores promedio de ΔE (kcal·mol⁻¹) entre AV (radical catiónico) y cada uno de los amino ácidos mutados (Maa) en el entorno ácido del Trp171(MAA)

Aminoácido original (aa)	aa/AV ⁺ ΔE (kcal·mol ⁻¹)	Amino ácidos mutados (Maa)	Maa/AV ⁺ ΔE (kcal·mol ⁻¹)
Asp165	-87.1 ± 0.7	Asn165	-14.7 ± 0.4
Glu168	-75.7 ± 0.6	Gln168	-28.4 ± 0.5
Glu250	-76.5 ± 0.5	Gln250	-22.2 ± 0.4
Asp264	-83.1 ± 0.4	Asn264	-16.6 ± 0.3
Phe267	-22.7 ± 0.6	Ile267	-22.6 ± 0.4

En una siguiente aproximación computacional, se evaluó la ΔE para las interacciones entre el sustrato y los segmentos de las enzimas mutantes (MSEG): D165N, E168Q, E250Q, D264N y F267I. Se estimaron los valores de ΔE entre el sustrato de reacción (AV) y los diferentes MSEG considerando las dos posibles especies de radicales formadas en Trp171 (TrpH⁺ y Trp[•]), descritas por Bernini *et al*⁷⁷. Los resultados presentados en la **Tabla 4.3.2.3** indican valores más favorables de ΔE para TrpH⁺ (**Tabla 4.3.2.3, columna 3**) que para Trp[•] (**Tabla 4.3.2.3, columna 2**). Sin embargo, cuando se consideró la interacción intermolecular entre el producto de la reacción (AV⁺) y el residuo Trp171 ya reducido (Trp), se observaron los valores de ΔE más favorables (más negativos) (**Tabla 4.3.2.3, columna 4**). Estos valores obtenidos de ΔE ponen en evidencia, en términos energéticos, la capacidad de la enzima LiPH8 para estabilizar el AV⁺ en su superficie, lo cual está en concordancia con los resultados de las SDM y la evidencia experimental que ha demostrado la formación del complejo LIP-AV⁺ por EPR³⁷.

Tabla 4.3.2.3. Valores promedio de ΔE (kcal·mol⁻¹) entre AV (neutro y radical catiónico) y los segmentos ubicados a 5.5 Å alrededor del Trp171 en la enzima silvestre (SEG) y mutantes (MSEG). El valor del SASA y el porcentaje de actividad residual son también especificados.

Segmento (SEG y MSEG)	Valores promedio de ΔE (kcal·mol ⁻¹)			Actividad residual ^a (%)	SASA Trp171 (Å ²)
	Trp [•] /AV	TrpH ⁺ /AV	Trp/AV ⁺		
SEG (LiPH8 silvestre)	-10.4 ± 0.4	-29.6 ± 0.4	-161.9 ± 0.2	100 ± 0.9	399 ± 3
MSEG(D165N)	-5.5 ± 0.3	-15.3 ± 0.3	-124.3 ± 0.3	59.0 ± 0.4	385 ± 4
MSEG(E168Q)	-8.1 ± 0.2	-24.4 ± 0.2	-138.4 ± 0.3	68.2 ± 1.3	394 ± 3
MSEG(E250Q)	-4.1 ± 0.2	-5.1 ± 0.3	-109.1 ± 0.2	24.0 ± 0.4	379 ± 2
MSEG(D264N)	-9.8 ± 0.4	-22.7 ± 0.2	-145.8 ± 0.4	92.3 ± 1.8	404 ± 4
MSEG(F267I)	-6.5 ± 0.2	-18.1 ± 0.4	-135.9 ± 0.5	71.0 ± 1.7	390 ± 3

^a La actividad residual fue evaluada en buffer sodio tartrato 0.1 M pH 3.0 usando 0.31 mM de AV (concentración saturante), 0.25 mM H₂O₂ y 0.01 μM de enzima. El porcentaje de actividad residual fue calculado como un cociente entre la actividad enzimática de cada mutante con respecto a la enzima silvestre, y luego fue multiplicado por 100.

Para todos los segmentos de las enzimas mutantes analizadas, la mutación puntual causó un aumento de los valores de ΔE cuando se compararon con el valor de ΔE en la enzima nativa (-161.9 kcal·mol⁻¹). De esta manera, cuando se analizaron los resultados del sistema que presentó los valores más favorables de ΔE (MSEG(Trp)/AV⁺), se observó que la mutación de los residuos Glu250, Asp165, Phe267, Glu168 y Asp264 causó una reducción del valor del ΔE de 32%, 23%, 16%, 14% y 9%, respectivamente; por tanto, la pérdida de afinidad por el AV fue correctamente predicha por los cálculos de ΔE . Al establecer una correlación entre los valores de ΔE y los valores experimentales del porcentaje de actividad catalítica residual para todos los mutantes estudiados (**Tabla**

4.3.2.3, columna 5), se obtiene un buen coeficiente de correlación ($r^2=0.94$), **Figura 4.3.2.1 A**. Un estudio similar en los que las diferencias de la K_m en algunas enzimas mutantes producían diferencias en la catálisis enzimática de una deshidrogenasa fue reportado por Tiwari *et al*⁷⁸.

De lo anterior, es posible sugerir que la metodología SQM empleada tiene el potencial de proporcionar valores de ΔE que permitirían identificar posibles mutaciones que causen cambios en la actividad enzimática de LiPH8.

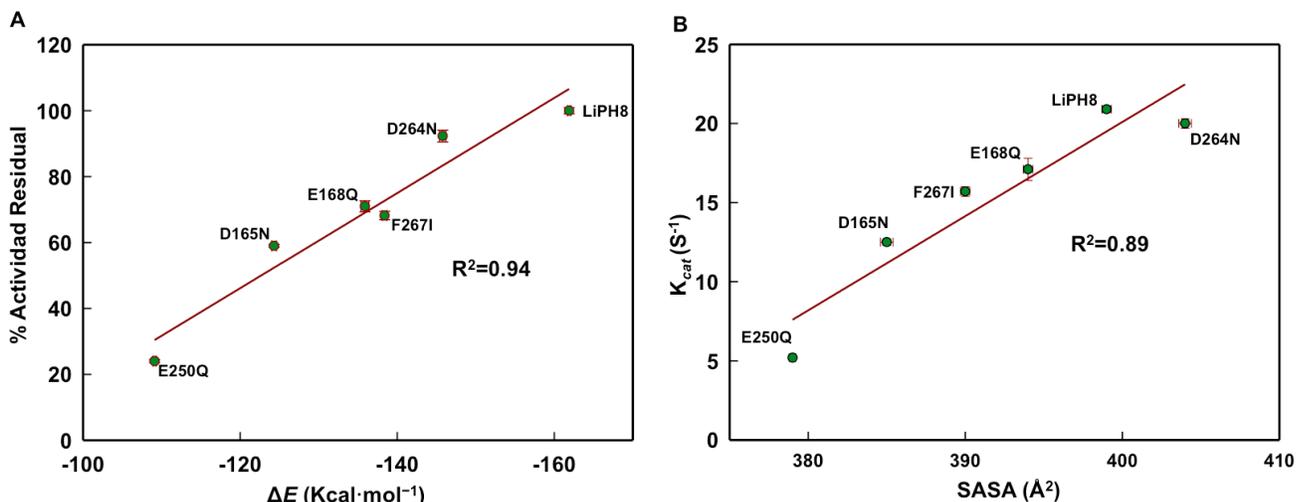


Figura 4.3.2.1. Correlación entre **(A)** Valores experimentales de % de actividad residual vs ΔE de los sistemas Trp/AV⁺ y **(B)** valores experimentales de K_{cat} vs Valores promedio del SASA del Trp171.

Al analizar los valores del SASA (Solvent Accesible Surface Area) para el Trp171 en los segmentos de las enzimas mutantes E250Q, D165N, F267I y E168Q, y comparando los resultados con el segmento de la enzima silvestre (SEG), se observó una reducción parcial de 8%, 4%, 2% y 1%, respectivamente en los valores de SASA (**Tabla 4.3.2.3, columna 6**). Por tanto, las mutaciones indicadas causaron una compactación del espacio alrededor del Trp171 como se ilustra en la **Figura 4.3.2.2 B, C, D, F**. Por el contrario, la mutación D264N generó una apertura y expansión de los residuos que forman la cavidad alrededor del Trp171 (**Figura 4.3.2.2 E**) y generó un aumento del valor del SASA, favoreciendo así la interacción entre Trp171 y AV⁺ y por tanto se observan los valores de ΔE más favorables.

Al establecerse una correlación entre los valores experimentales del K_{cat} y los obtenidos a partir del SASA (**Tabla 4.3.2.3, columna 6**), se presenta un coeficiente de

correlación de $r^2=0.89$ (**Figura 4.3.2.1 B**). Por tanto, se podría sugerir que para la catálisis de LiPH8 es importante el acceso del sustrato al Trp171, dado que para que ocurra la transferencia electrónica entre enzima y sustrato es necesaria una adecuada orientación y distancia del sustrato sobre la superficie de la enzima.

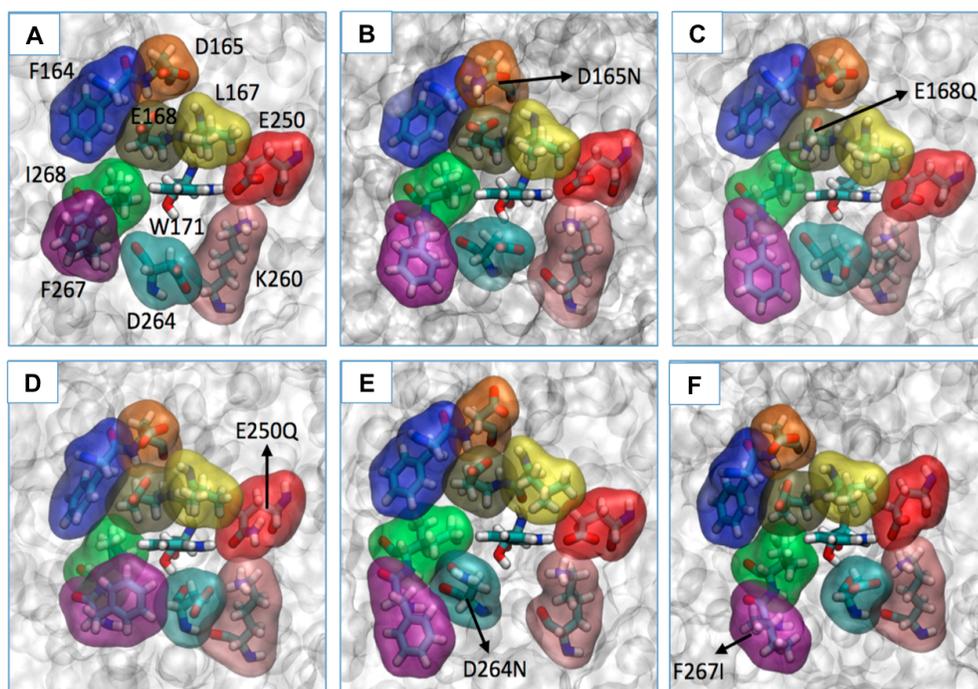


Figura 4.3.2.2. Análisis de SASA para Trp171 en los sistemas de la enzima LiPH8 silvestre y mutantes.

Para los sistemas LiPH8 nativa y mutantes D264N y E250Q se seleccionaron los 100 complejos con los valores ΔE más favorables con el objetivo de analizar las principales interacciones intermoleculares que se presentaron entre Trp171 y AV²⁺ (**Figura 4.3.2.3**). El análisis mostró la presencia de interacciones π - π stacking borde-cara entre el anillo aromático del AV y el anillo indólico del Trp171, pero estas interacciones se registraron en diferentes porcentajes para los sistemas estudiados (67%, 100% y 80%, para LiPH8 nativa, E250Q y D264N, respectivamente). La cavidad ligeramente menos compacta alrededor de Trp171 en los sistemas de LiPH8 nativa y mutante D264N, permitió generar 33% y 7% de interacciones π -stacking cara-cara (**Figura 4.3.2.3 B, E**). Además, se identificó un 43% de enlaces de hidrógeno entre el residuo Asn y el AV en el mutante D264N (**Figura 4.3.2.3 D**). De este último, el 13% correspondió a complejos estabilizados sólo con este tipo de interacción, y el 30% a complejos que se estabilizaron con enlaces de hidrógeno e

interacciones π - π stacking borde-cara de manera conjunta (**Figura 4.3.2.3 D**). Probablemente, esta variedad de interacciones intermoleculares contribuyeron a obtener valores de ΔE similares a los observados en la enzima LiPH8 nativa. Por otro lado, la cavidad compactada, y su mayor impedimento estérico alrededor de Trp171 en el mutante E250Q, sólo permitió generar interacciones π - π stacking borde-cara que tenían mayores distancias de unión (diferencias de aproximadamente 0.25 Å en promedio) y, por lo tanto, menor estabilidad que las generadas en LiPH8 nativa obteniéndose con ello valores de energía de interacción menos favorables.

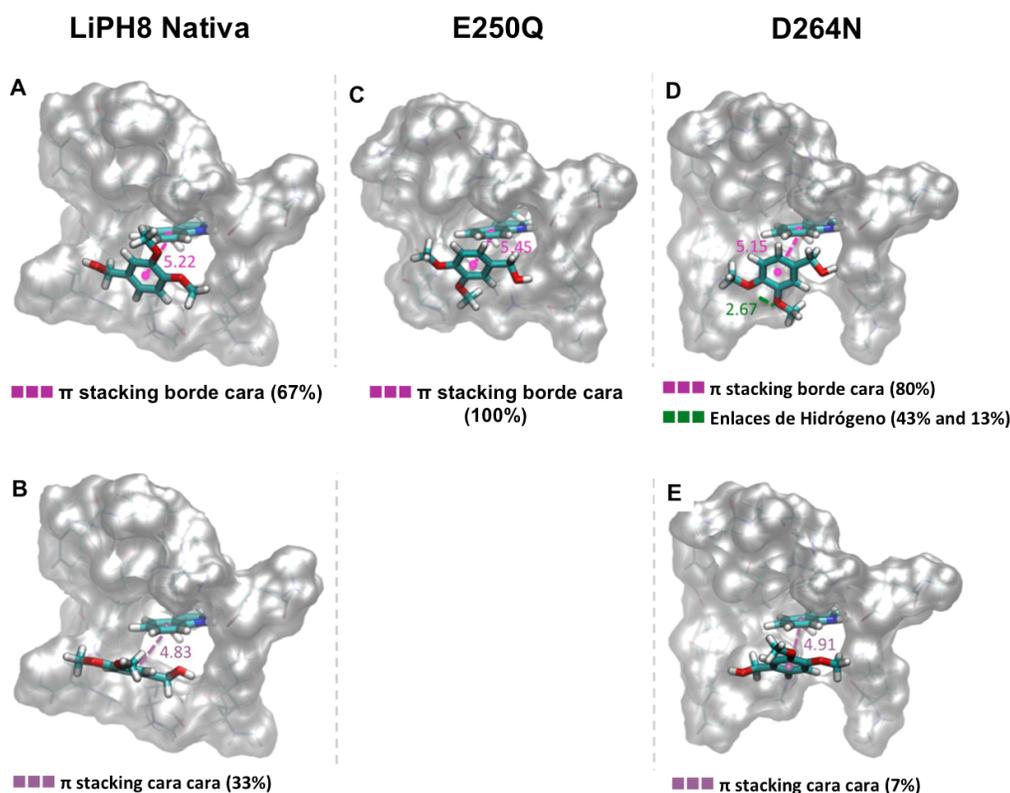


Figura 4.3.2.3. Principales interacciones de Trp171-AV⁺ en los 100 complejos con valores de ΔE más favorables para (**A,B**) LiPH8 nativa, (**C**) mutante E250Q, (**D,E**) mutante D264N.

4.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín.

Con el fin de entender los cambios experimentales registrados en la K_{cat} en el mutante E250Q de LiPH8, se realizaron cálculos de densidad de espín a un nivel de cálculos híbridos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). Reportes previos han empleado esta metodología como un indicador adecuado que permite explicar los

cambios de reactividad en sistemas enzimáticos donde se presentan eventos catalíticos que implican la transferencia de electrones^{69,79,80}. Al considerar en el cálculo QM/MM tanto el sustrato como la enzima es posible esclarecer si un electrón desapareado producto de la oxidación enzimática es energéticamente más estable en los orbitales moleculares del agente oxidante o reductor.

Para la enzima nativa de LiPH8, y el mutante E250Q, se realizó un análisis de densidad de espín. Varias conformaciones de las estructuras de las enzimas mencionadas fueron extraídas desde las SDMs donde las estructuras alcanzaron un RMSD estable (Anexo 5), luego a estas estructuras se les realizó un muestreo conformacional siguiendo la metodología especificada en la **Figura 3.2.2.1. paso 3 y 4**, y se calculó la ΔE entre AV y Trp171. A las estructuras con los valores de energía más favorables se les procedió a calcular la densidad espín. Se consideró en la región QM el residuo Trp171 y el sustrato AV y en la región MM se incluyó el resto de la enzima sin tener presente iones y moléculas del solvente. Se calculó el estado electrónico doblete de la capa QM usando la aproximación QM/MM y utilizando el siguiente nivel de teoría: funcional M06-2L base 6-31G⁺* para la región QM y los parámetros del campo de fuerza OPLS-2005 para la región MM.

Inicialmente, se encontró que aquellas estructuras en las que se establecía una interacción π -stacking borde-cara entre AV y Trp171 eran estructuras en las que se compartía densidad de espín. Por tanto, y como criterio final de selección de las estructuras a las que se le realizó muestreo conformacional, se estableció la selección de aquellas estructuras con valores de ΔE más favorables y que presentaran la interacción π stacking borde-cara entre el sustrato y el residuo Trp171.

Diez estructuras fueron seleccionadas para los sistemas de LiPH8 nativa y mutante E250Q y se evaluó la variación de la densidad de espín por átomo a través del análisis de la población electrónica estimada por el método de partición de Mulliken⁷⁰, con el objetivo de determinar la deslocalización electrónica desde el agente reductor (AV) al agente oxidante (Trp171).

En la **Figura 4.3.3.1 A,B,C** se puede observar que hay una mayor densidad de espín sobre el AV en el sistema E250Q que en LiPH8 nativa, indicando esto que una mayor transferencia de electrones desde el AV hacia el Trp171 ocurriría en la enzima mutante E250Q que en la enzima nativa. Estos resultados no están en concordancia con la evidencia experimental porque al disminuir la K_{cat} en la enzima mutante E250Q, se esperaría una disminución de la densidad de espín sobre el AV en el sistema mutante y no un aumento como es observado.

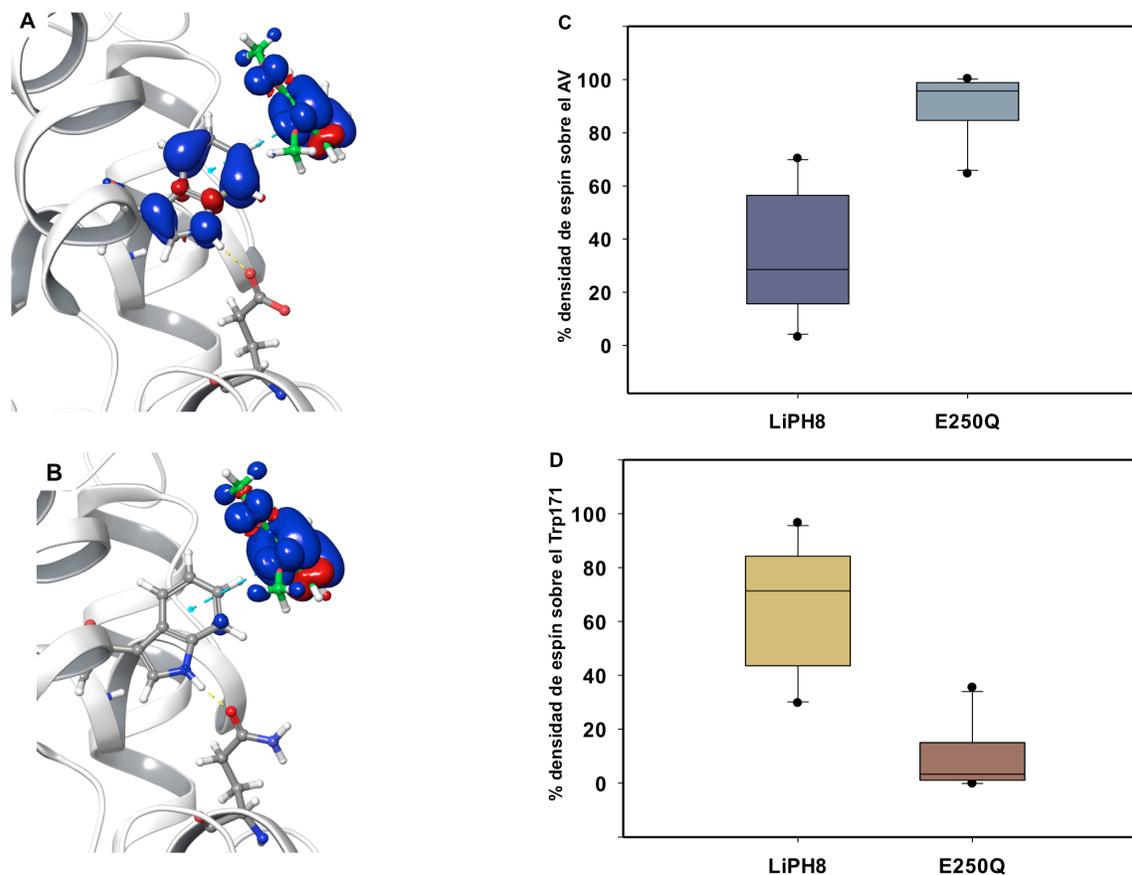


Figura 4.3.3.1. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín en Trp171 y AV (**A**) densidad de espín para la distribución de un electrón en LiPH8, (**B**) densidad de espín para la distribución de un electrón en E250Q, (**C**) representación en un diagrama de caja de la distribución de la densidad de espín sobre AV en LiPH8 nativa y variante E250Q (**D**) representación en un diagrama de caja de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 en LiPH8 nativa y variante E250Q.

Al analizar la densidad de espín sobre el Trp171 en el sistema mutante y LiPH8 nativa (**Figuras 4.3.3.1 B, D**) se aprecia poca densidad de espín sobre el Trp171 del variante E250Q, demostrando esto que el Trp171 en la variante de E250Q es poco estable energéticamente para albergar un electrón desapareado, lo cual concuerda con la

evidencia experimental y computacional disponible. Para dar mayor claridad a esto, el análisis de la oxidación del Trp171 por LiPH8 como compuesto I fue realizado siguiendo la metodología indicada en la **sección 3.3.3**.

Los resultados presentados en la **Figura 4.3.3.2** muestran el modelado QM/MM de la oxidación del Trp171 por parte de la enzima como compuesto I en LiPH8 nativa y variante E250Q considerando el estado electrónico cuarteto. Como se puede observar en los mapas de densidad de espín (**Figure 4.3.3.2 B, C**), dos electrones se establecen en los orbitales mixtos dxz/dyz y px/py del Fe^{2+} y el oxígeno acorde a reportes previos⁸¹ y en la deslocalización del tercer electrón desapareado es donde se establecen diferencias en los sistemas bajo estudio. En LiPH8 nativa, el tercer electrón desapareado está mayoritariamente posicionado sobre el Trp171 (~80%) (**Figura 4.3.3.2 A,B**) mientras que en el mutante E250Q se observa un menor posicionamiento en ese electrón desapareado sobre el Trp171 (~55%) (**Figura 4.3.3.2 A,C**). Adicionalmente, se observa como compensación una mayor localización de densidad espín sobre los grupos propionato del anillo porfirínico en E250 (**Ver Figura 4.3.3.2 C**).

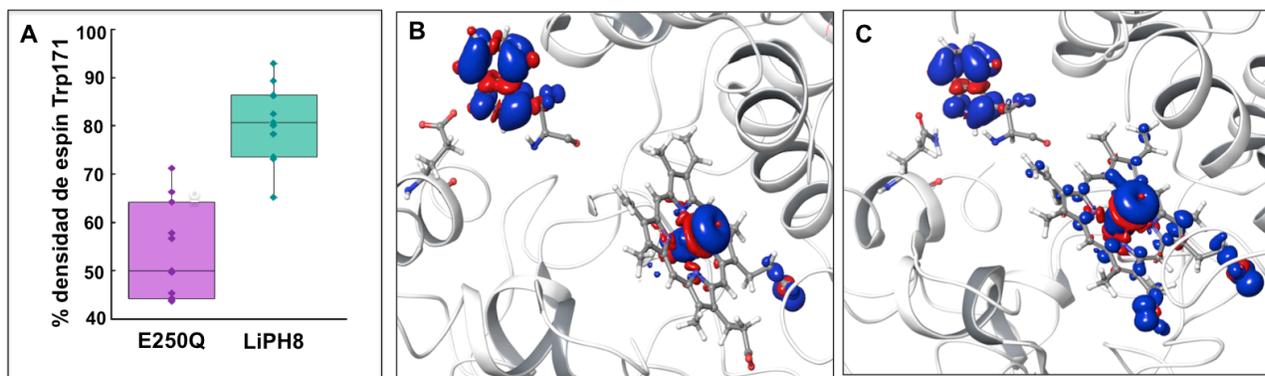


Figura 4.3.3.2. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín en Trp171 y el grupo hemo (**A**) representación en diagrama de caja de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 en LiPH8 nativa y variante E250Q, (**B**) densidad de espín para la distribución de tres electrones en LiPH8, (**C**) densidad de espín para la distribución de tres electrones en E250Q.

La deslocalización de electrones estimada por los mapas de densidad de espín ha demostrado estar bien correlacionada con la fuerza impulsora de la transferencia de electrones para determinar la estabilidad del electrón no apareado en los orbitales moleculares del donante o aceptor^{79,80,82}. Además, la deslocalización de densidad de espín es comparable a la afinidad electrónica y, por tanto, una enzima debe tener una alta

capacidad de aceptar electrones de manera eficiente⁸³, que es uno de los criterios que se debe cumplir para que cualquier enzima peroxidasa sea considerada como un catalizador eficiente. Por lo tanto, las densidades de espín calculadas mediante el enfoque QM/MM proporcionan información cuantitativa que demuestra que la mutación en el residuo Glu250 implica un aumento de la afinidad electrónica en Trp171 y, por lo tanto, la reactividad enzimática de la LiP tiende a disminuir porque la LiP como compuesto I en el mutante E250Q extrae un electrón de Trp171 con menor eficiencia que la enzima nativa de LiPH8.

CAPÍTULO V:

Conclusiones

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, por metodologías de SDM se estudiaron las interacciones entre LiP y el AV en su estado neutro (AV) y como radical catiónico (AV^{•+}). Estos estudios evidenciaron que la interacción del AV con LiP podría ocurrir principalmente en dos sitios de LiP, una cavidad hidrofóbica cercana al residuo catalítico Trp171 y el entorno ácido del Trp171. Para ambos sitios se caracterizaron los aminoácidos involucrados en la interacción con el AV o AV^{•+} y se halló la predominancia de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas respectivamente.

Mediante estudios de cinética enzimática de mutantes simples de los principales residuos de LiP que interactuaban con AV en las SDM se observó que la mutación los residuos Phe129, Ile268, Gln274 y Pro279 pertenecientes a la cavidad hidrofóbica cercana al Trp171, no producía cambios en las constantes de cinética enzimática de LiP. Por lo tanto, aunque dichos residuos demostraron interactuar con el AV en las SDM, no tienen un rol significativo en el ciclo catalítico de LiP.

Por otra parte, la mutación de algunos residuos pertenecientes al entorno ácido del Trp171 sí afectó los parámetros cinéticos de LiP. Al mutar los residuos Glu168, Glu250 y Phe267 la K_m aumentó y al mutar el Glu250 la K_{cat} disminuyó. La racionalización de estos resultados usando cálculos de energía de interacción de LiP-AV a nivel semiempírico de mecánica cuántica, demostró que los valores de la energía de interacción (ΔE) eran más favorables para la interacción con el AV en su estado radicalario que neutro y los valores más favorables de ΔE se presentaron para el complejo producto de la reacción enzimática (Trp-AV^{•+}) que para los posibles complejos sustrato-enzima (TrpH^{•+}/AV o Trp[•]/AV).

El estudio de la oxidación del residuo Trp171 por parte del compuesto I en la variante LiP E250Q a través de cálculos QM/MM demostró que el Trp171 en esta variante presenta una mayor afinidad electrónica. Esto conlleva a que la oxidación del Trp por el compuesto I sea menos eficiente y este fenómeno, en conjunto con un menor SASA observado para el Trp171, posiblemente serían la causa de la disminución de los valores de K_{cat} .

Las propiedades catalíticas de LiPH8 están moduladas por los residuos Glu168, Glu250 y Phe267 cercanos al Trp171. La mutación de estos residuos permite optimizar la afinidad y catálisis de LiPH8 por diferentes sustratos. En esta tesis esto fue demostrado al generar el mutante cuádruple D165N/E168Q/E250Q/F267I de LiPH8 que demostró tener mayor afinidad por el ABTS por haberse neutralizados las cargas cercanas al Trp171 y haberse removido un aminoácido voluminosos (Phe267).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Smith, A.; Doyle, W. Engineered Peroxidases with Veratryl Alcohol Oxidase Activity. WO 2006/114616 A1, 2006.
- (2) Carrillo-Nieves, D.; Rostro Alanís, M. J.; de la Cruz Quiroz, R.; Ruiz, H. A.; Iqbal, H. M. N.; Parra-Saldívar, R. Current Status and Future Trends of Bioethanol Production from Agro-Industrial Wastes in Mexico. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *102* (September 2018), 63–74.
- (3) Salvachúa, D.; Prieto, A.; López-Abelairas, M.; Lu-Chau, T.; Martínez, Á. T.; Martínez, M. J. Fungal Pretreatment: An Alternative in Second-Generation Ethanol from Wheat Straw. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (16), 7500–7506.
- (4) Kumari, D.; Singh, R. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes for Biofuel Production: A Critical Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *90* (March), 877–891.
- (5) Hu, F.; Ragauskas, A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Res.* **2012**, *5* (4), 1043–1066.
- (6) Vermaas, J. V.; Petridis, L.; Qi, X.; Schulz, R.; Lindner, B.; Smith, J. C. Mechanism of Lignin Inhibition of Enzymatic Biomass Deconstruction. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, 1–16.
- (7) Alonso, D. M.; Wettstein, S. G.; Dumesic, J. A. Bimetallic Catalysts for Upgrading of Biomass to Fuels and Chemicals. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (24), 8075–8098.
- (8) Qin, L.; Li, W.-C.; Liu, L.; Zhu, J.-Q.; Li, X.; Li, B.-Z.; Yuan, Y.-J. Inhibition of Lignin-Derived Phenolic Compounds to Cellulase. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9* (1), 70.
- (9) Li, K.; Wan, J.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, J. Comparison of Dilute Acid and Alkali Pretreatments in Production of Fermentable Sugars from Bamboo: Effect of Tween 80. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *83*, 414–422.
- (10) Lu, J.; Li, X.; Yang, R.; Zhao, J.; Qu, Y. Tween 40 Pretreatment of Unwashed Water-Insoluble Solids of Reed Straw and Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water to Obtain High Concentrations of Bioethanol. *Fuel Prod. from Non-Food Biomass Corn Stover* **2015**, 77–99.
- (11) Yang, B.; Wyman, C. E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 611–617.
- (12) Liu, H.; Zhu, J. Y.; Fu, S. Y. Effects of Lignin-Metal Complexation on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (12), 7233–7238.
- (13) Akimkulova, A.; Zhou, Y.; Zhao, X.; Liu, D. Improving the Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Wheat Straw by Metal Ion Blocking of Non-Productive Cellulase Adsorption on Lignin. *Bioresour. Technol.* **2016**, *208*, 110–116.
- (14) Yang, Q.; Pan, X. Correlation between Lignin Physicochemical Properties and Inhibition to Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113* (6), 1213–1224.
- (15) Plácido, J.; Capareda, S. Ligninolytic Enzymes: A Biotechnological Alternative for Bioethanol Production. *Bioresour. Bioprocess.* **2015**, *2* (1), 23.
- (16) Shirkavand, E.; Baroutian, S.; Gapes, D. J.; Young, B. R. Combination of Fungal and Physicochemical Processes for Lignocellulosic Biomass Pretreatment - A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *54*, 217–234.
- (17) Masran, R.; Zanirun, Z.; Bahrin, E. K.; Ibrahim, M. F.; Lai Yee, P.; Abd-Aziz, S. Harnessing the Potential of Ligninolytic Enzymes for Lignocellulosic Biomass Pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 1–16.
- (18) Arora, D. S.; Chander, M.; Gill, P. K. Involvement of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Laccase in Degradation and Selective Ligninolysis of Wheat Straw. *Int. Biodeterior.*

- Biodegrad.* **2002**, *50* (2), 115–120.
- (19) Peralta-Yahya, P. P.; Zhang, F.; del Cardayre, S. B.; Keasling, J. D. Microbial Engineering for the Production of Advanced Biofuels. *Nature* **2012**, *488* (7411), 320–328.
- (20) Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete Chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **1988**, *161* (1985), 238–249.
- (21) Choinowski, T.; Blodig, W.; Winterhalter, K. H.; Piontek, K. The Crystal Structure of Lignin Peroxidase at 1.70 Å Resolution Reveals a Hydroxy Group on the C(β) of Tryptophan 171: A Novel Radical Site Formed during the Redox Cycle. *J. Mol. Biol.* **1999**, *286* (3), 809–827.
- (22) Banci, L.; Bartalesi, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Tien, M. Unfolding and PH Studies on Manganese Peroxidase: Role of Heme and Calcium on Secondary Structure Stability. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2003**, *72* (1), 38–47.
- (23) Erman, J. E.; Vitello, L. B.; Miller, M. A.; Shaw, A.; Brown, K. A.; Kraut, J. Histidine 52 Is a Critical Residue for Rapid Formation of Compound I of Cytochrome c Peroxidase. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9798–9806.
- (24) Vitello, L. B.; Erman, J. E.; Miller, M. A.; Wang, J.; Kraut, J. Effect of Arginine-48 Replacement on the Reaction between Cytochrome c Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Biochemistry* **1993**, *32* (37), 9807–9818.
- (25) Hiner, A. N. P.; Raven, E. L.; Thorneley, R. N. F.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N. Mechanisms of Compound I Formation in Heme Peroxidases. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91* (1), 27–34.
- (26) Banci, L.; Bertini, I.; Turano, P.; Tien, M.; Kirk, T. K. Proton NMR Investigation into the Basis for the Relatively High Redox Potential of Lignin Peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (16), 6956–6960.
- (27) Khindaria, A.; Aust, S. D. EPR Detection and Characterization of Lignin Peroxidase Porphyrin π -Cation Radical. *Biochemistry* **1996**, *35* (40), 13107–13111.
- (28) Harvey, P. J.; Palmer, J. M.; Schoemaker, H. E.; Dekker, H. L.; Wever, R. Pre-Steady-State Kinetic Study on the Formation of Compound I and II of Ligninase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1989**, *994* (1), 59–63.
- (29) Wariishi, H.; Gold, M. H. Lignin Peroxidase Compound III. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, *36* (3–4), 317.
- (30) Tonon, F.; Odier, E. Influence of Veratryl Alcohol and Hydrogen Peroxide on Ligninase Activity and Ligninase Production by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54* (2), 466–472.
- (31) Koduri, R.; Tien, M. Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (38), 22254–22258.
- (32) Ollikka, P.; Alhonmaki, K.; Leppanen, V. M.; Glumoff, T.; Raijola, T.; Suominen, I. Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59* (12), 4010–4016.
- (33) Tien, M.; Ma, D. Oxidation of 4-Methoxymandelic Acid by Lignin Peroxidase: Mediation by Veratryl Alcohol. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (14), 8912–8917.
- (34) Candeias, L. P.; Harvey, P. J. Lifetime and Reactivity of the Veratryl Alcohol Radical Cation. Implications for Lignin Peroxidase Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, pp 16745–16748.
- (35) Baciocchi, E.; Bietti, M.; Gerini, M. F.; Lanzalunga, O. The Mediation of Veratryl Alcohol in

- Oxidations Promoted by Lignin Peroxidase: The Lifetime of Veratryl Alcohol Radical Cation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293* (2), 832–835.
- (36) Houtman, C. J.; Maligaspe, E.; Hunt, C. G.; Fernández-Fueyo, E.; Martínez, A. T.; Hammel, K. E. Fungal Lignin Peroxidase Does Not Produce the Veratryl Alcohol Cation Radical as a Diffusible Ligninolytic Oxidant. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (13), 4702–4712.
- (37) Khindaria, a; Nie, G.; Aust, S. D. Detection and Characterization of the Lignin Peroxidase Compound II-Veratryl Alcohol Cation Radical Complex. *Biochemistry* **1997**, *36* (46), 14181–14185.
- (38) Doyle, W.; Blodig, W.; Veitch, N.; Piontek, K.; Smith, A. Two Substrate Interaction Sites in Lignin Peroxidase Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **1998**, *37* (43), 15097–15105.
- (39) Recabarren, R.; Fuenzalida-Valdivia, I.; Alzate-Morales, J. Studying the Binding Mechanisms of Veratryl Alcohol to *P. Chrysosporium* Lignin Peroxidase: Insights from Theoretical Approaches. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135* (3), 1–12.
- (40) Sollewijn Gelpke, M. D.; Lee, J.; Gold, M. H. Lignin Peroxidase Oxidation of Veratryl Alcohol: Effects of the Mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. *Biochemistry* **2002**, *41* (10), 3498–3506.
- (41) Acebes, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Toubes, M.; Sáez-Jiménez, V.; Pérez-Boada, M.; Lucas, M. F.; Martínez, A. T.; Guallar, V. Mapping the Long-Range Electron Transfer Route in Ligninolytic Peroxidases. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (16), 3946–3954.
- (42) Pogni, R.; Baratto, M. C.; Teutloff, C.; Giansanti, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Choinowski, T.; Piontek, K.; Martínez, A. T.; Lenzian, F.; Basosi, R. A Tryptophan Neutral Radical in the Oxidized State of Versatile Peroxidase from *Pleurotus Eryngii*: A Combined Multifrequency EPR and Density Functional Theory Study. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (14), 9517–9526.
- (43) Smith, A. T.; Doyle, W. A.; Dorlet, P.; Ivancich, A. Spectroscopic Evidence for an Engineered, Catalytically Active Trp Radical That Creates the Unique Reactivity of Lignin Peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (38), 16084–16089.
- (44) Bernini, C.; Pogni, R.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, A. T.; Basosi, R.; Sinicropi, A. EPR Parameters of Amino Acid Radicals in *P. Eryngii* Versatile Peroxidase and Its W164Y Variant Computed at the QM/MM Level. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (11), 5078–5098.
- (45) Bernini, C.; Pogni, R.; Basosi, R.; Sinicropi, A. Prediction of Hydrogen-Bonding Networks around Tyrosyl Radical in *P. Eryngii* Versatile Peroxidase W164Y Variants: A QM/MM MD Study. *Mol. Simul.* **2014**, *40* (6), 485–490.
- (46) Ruiz-Dueñas, F. J.; Morales, M.; Rencoret, J.; Gutiérrez Suárez, A.; del Río Andrade, J. C.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. *Peroxidasas Mejoradas*, 2010.
- (47) Schrödinger LLC. Schrödinger Suite Protein Preparation Wizard. New York, NY 2015.
- (48) Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical PKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (2), 525–537.
- (49) Schrödinger LLC. Qsite. New York, NY 2015.
- (50) D.E Shaw Research. Desmond Molecular Dynamics System. New York, NY, USA 2017.
- (51) Martyna, G. J.; Klein, M. L.; Tuckerman, M. Nosé-Hoover Chains: The Canonical Ensemble via Continuous Dynamics. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2635–2643.
- (52) Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant Pressure Molecular Dynamics Algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101* (5), 4177–4189.

- (53) Schrödinger LLC. Maestro. New York, NY, USA 2016.
- (54) Schrödinger LLC. MacroModel. 2016.
- (55) Durham, E.; Dorr, B.; Woetzel, N.; Staritzbichler, R.; Meiler, J. Solvent Accessible Surface Area Approximations for Rapid and Accurate Protein Structure Prediction. *J. Mol. Model.* **2009**, *15* (9), 1093–1108.
- (56) Humphrey; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- (57) Puigbò, P.; Guzmán, E.; Romeu, A.; Garcia-Vallvé, S. OPTIMIZER: A Web Server for Optimizing the Codon Usage of DNA Sequences. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (SUPPL.2), 126–131.
- (58) Doyle, W. A.; Smith, A. T. Expression of Lignin Peroxidase H8 in Escherichia Coli : Folding and Activation of the Recombinant Enzyme with Ca²⁺ and Haem. *Biochem. J.* **1996**, *315* (1), 15–19.
- (59) Smith, A. T.; Doyle, W. a; Dorlet, P.; Ivancich, A. Spectroscopic Evidence for an Engineered, Catalytically Active Trp Radical That Creates the Unique Reactivity of Lignin Peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (38), 16084–16089.
- (60) Durán-Lara, E. F.; López-Cortés, X. A.; Castro, R. I.; Avila-Salas, F.; González-Nilo, F. D.; Laurie, V. F.; Santos, L. S. Experimental and Theoretical Binding Affinity between Polyvinylpyrrolidone and Selected Phenolic Compounds from Food Matrices. *Food Chem.* **2015**, *168*, 464–470.
- (61) Durán-Lara, E. F.; Ávila-Salas, F.; Galaz, S.; John, A.; Maricán, A.; Gutiérrez, M.; Nachtigall, F. M.; Gonzalez-Nilo, F. D.; Santos, L. S. Nano-Detoxification of Organophosphate Agents by PAMAM Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26* (3), 580–591.
- (62) Avila-Salas, F.; Sandoval, C.; Caballero, J.; Guinez-Molinos, S.; Santos, L. S.; Cachau, R. E.; Gonzalez-Nilo, F. D. Study of Interaction Energies between the PAMAM Dendrimer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Using a Distributed Computational Strategy and Experimental Analysis by ESI-MS/MS. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (7), 2031–2039.
- (63) Fan, C. F.; Olafson, B. D.; Blanco, M.; Hsu, S. L. Application of Molecular Simulation To Derive Phase Diagrams of Binary Mixtures. *Macromolecules* **1992**, *25* (14), 3667–3676.
- (64) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, *19* (1), 1–32.
- (65) Stewart, J. J. P. MOPAC2016 Computational Chemistry. Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA 2016.
- (66) Accelrys Software Inc. BIOVIA Discovery Studio Visualizer Software. Windows: San Diego, CA, USA 2018.
- (67) Polak, E.; Ribiere, G. Note Sur La Cvergence de Méthodes de Directions Conjuguées. *ESAIM Math. Model. Numer. Anal. - Modélisation Mathématique Anal. Numérique* **1969**, *3* (R1), 35–43.
- (68) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. A New Local Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Transition Metal Bonding, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (19).
- (69) Linde, D.; Pogni, R.; Marina, C.; Lucas, F.; Guallar, V.; Baratto, M. C.; Sinicropi, A.; Saéz-Jiménez, V.; Coscolín, C.; Antonio, R.; Medrand, F. J.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, Á. T. Catalytic Surface Radical in Dye-Decolorizing Peroxidase: A Computational, Spectroscopic and Site-Directed Mutagenesis Study. *Biochem J.* **2015**, *466*, 253–262.

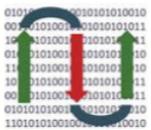
- (70) Mulliken, R. S. Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. I. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23* (10), 1833–1840.
- (71) Sievers, F.; Higgins, D. G. Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences. *Protein Sci.* **2018**, *27* (1), 135–145.
- (72) Dunford, H. B. *Heme Peroxidases*; Raven, E., Dunford, H. B., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2016; Vol. 2.
- (73) Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33* (7), 1870–1874.
- (74) Fernández-Fueyo, E.; Acebes, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, M. J.; Romero, A.; Medrano, F. J.; Guallar, V.; Martínez, A. T. Structural Implications of the C-Terminal Tail in the Catalytic and Stability Properties of Manganese Peroxidases from Ligninolytic Fungi. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (12), 3253–3265.
- (75) Acebes, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Toubes, M.; Sáez-Jiménez, V.; Pérez-Boada, M.; Lucas, M. F.; Martínez, A. T.; Guallar, V. Mapping the Long-Range Electron Transfer Route in Ligninolytic Peroxidases. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (16), 3946–3954.
- (76) Pérez-Boada, M.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Pogni, R.; Basosi, R.; Choinowski, T.; Martínez, M. J.; Piontek, K.; Martínez, A. T. Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-Directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-Range Electron Transfer Pathways. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354* (2), 385–402.
- (77) Bernini, C.; Pogni, R.; Basosi, R.; Sinicropi, A. The Nature of Tryptophan Radicals Involved in the Long-Range Electron Transfer of Lignin Peroxidase and Lignin Peroxidase-like Systems: Insights from Quantum Mechanical/Molecular Mechanics Simulations. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2012**, *80* (5), 1476–1483.
- (78) Tiwari, M. K.; Kalia, V. C.; Kang, Y. C.; Lee, J. K. Role of a Remote Leucine Residue in the Catalytic Function of Polyol Dehydrogenase. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10* (12), 3255–3263.
- (79) Lucas, M. F.; Monza, E.; Jørgensen, L. J.; Ernst, H. A.; Piontek, K.; Bjerrum, M. J.; Martínez, A. T.; Camarero, S.; Guallar, V. Simulating Substrate Recognition and Oxidation in Laccases: From Description to Design. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (3), 1462–1467.
- (80) Monza, E.; Lucas, M. F.; Camarero, S.; Alejaldre, L. C.; Martínez, A. T.; Guallar, V. Insights into Laccase Engineering from Molecular Simulations: Toward a Binding-Focused Strategy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (8), 1447–1453.
- (81) Bathelt, C. M.; Mulholland, A. J.; Harvey, J. N. QM/MM Studies of the Electronic Structure of the Compound i Intermediate in Cytochrome c Peroxidase and Ascorbate Peroxidase. *Dalt. Trans.* **2005**, No. 21, 3470–3476.
- (82) Artz, K.; Williams, J. C.; Allen, J. P.; Lenzian, F.; Rautter, J.; Lubitz, W.; Feher, G. Relationship between the Oxidation Potential and Electron Spin Density of the Primary Electron Donor in Reaction Centers from Rhodobacter Sphaeroides. *Biophys. Approv.* **1997**, *94* (December), 13582–13587.
- (83) De Visser, S. P. What Affects the Quartet - Doublet Energy Splitting in Peroxidase Enzymes? *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (48), 11050–11057.

Anexo 1. Publicación 2019.



ELSEVIER





COMPUTATIONAL
AND STRUCTURAL
BIOTECHNOLOGY
JOURNAL



journal homepage: www.elsevier.com/locate/csbj

Binding and Catalytic Mechanisms of Veratryl Alcohol Oxidation by Lignin Peroxidase: A Theoretical and Experimental Study

Jefferson O. Romero ^{a,b}, Elena Fernández-Fueyo ^{c,d}, Fabián Avila-Salas ^{e,f}, Rodrigo Recabarren ^a, Jans Alzate-Morales ^{a,*}, Angel T. Martínez ^{c,*}

^a Centro de Bioinformática, Simulación y Modelado (CBSM), Departamento de Bioinformática, Facultad de Ingeniería, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 721, Talca, Chile
^b Doctorado en Ciencias Mención Investigación y Desarrollo de Productos Bioactivos, Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 747, Talca, Chile
^c Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28006 Madrid, Spain
^d Department of Bionanoscience, Delft University of Technology, van der Maasweg 9, 2629, HZ, Delft, The Netherlands
^e Centro de Nanotecnología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Chile
^f Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Chile

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 May 2019
Received in revised form 3 July 2019
Accepted 7 July 2019
Available online 10 July 2019

Keywords:
Phanerochaete chrysosporium
Lignin peroxidase
Veratryl alcohol
Site-directed mutagenesis
Interaction energy
SQM
QM/MM

ABSTRACT

Lignin peroxidase (LiP) and its natural substrate veratryl alcohol (VA) play a crucial role in lignin degradation by white-rot fungi. Understanding the molecular determinants for the interaction of this enzyme with its substrates is essential in the rational design of engineered peroxidases for biotechnological application. Here, we combine computational and experimental approaches to analyze the interaction of *Phanerochaete chrysosporium* LiP (iso-enzyme H8) with VA and its radical cation (VA^{•+}, resulting from substrate oxidation by the enzyme). Interaction energy calculations at semiempirical quantum mechanical level (SQM) between LiP and VA/VA^{•+} enabled to identify those residues at the acidic environment of catalytic Trp171 involved in the main interactions. Then, a battery of variants, with single and multiple mutations at these residues (Glu168, Asp165, Glu250, Asp264, and Phe267), was generated by directed mutagenesis, and their kinetics parameters were estimated on VA and two additional substrates. The experimental results show that Glu168 and Glu250 are crucial for the binding of VA, with Glu250 also contributing to the turnover of the enzyme. The experimental results were further rationalized through new calculations of interaction energies between VA/VA^{•+} and LiP with each of the single mutations. Finally, the delocalization of spin density was determined with quantum mechanics/molecular mechanics calculations (QM/MM), further supporting the contribution of Glu250 to VA oxidation at Trp171.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/>)

Computational Modeling Methods for Understanding the Interaction of Lignin and Its Derivatives with Oxidoreductases as Biocatalysts

Jans Alzate-Morales, Rodrigo Recabarren,
Isabel Fuenzalida-Valdivia, Jefferson Romero and
Angel T. Martinez

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70554>

Abstract

This chapter will be presented as follow. First, a brief introduction to structure and characterization of lignin and its derivatives is presented, as well as their importance as chemical scaffolds for obtaining value-added products in chemical, food, pharmaceutical and agriculture industry. Second, an extensive review of different reports using computational modeling methods—like molecular dynamics simulations, quantum mechanics and hybrid calculation methods, among others—in the understanding of enzyme-substrate interaction and biocatalysis will be presented. Third, and as last part of chapter, some hand picked examples from literature will be chosen as successful cases where the interplay between experiment and computation has given as a result protein engineered oxidoreductases with improved catalytic capabilities.

Keywords: lignin, oxidoreductases, QM-MM, docking, molecular dynamics, biocatalysis

Anexo 3. Poster de participación nacional 2017.

“Crucial Residues Associated with Phenol degradation by Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* an approximation based on Molecular Dynamics with virtual Alanine Scanning”

Jefferson O. Romero^{1*}, Isabel Fuenzalida-Valdivia¹, Wendy González¹, Jans Alzate-Morales¹

Centre for Bioinformatics and Molecular Simulation, School of Bioinformatics Engineering, 2 Norte 685 Casilla 721, Universidad de Talca, Talca, Chile

*Email: Jeromero@utalca.cl

Introduction

Lignin peroxidase (LIP) from *Phanerochaete chrysosporium* has been shown to mineralize a variety of recalcitrant aromatic compounds and to oxidize a number of phenolic and polycyclic aromatic compounds through a direct or indirect oxidation pathway that was previously described (Figure 1)¹.

The key amino acids involved in this function have not been reported yet. In this work, using Molecular Dynamics (MD) simulation and Computational Alanine Scanning (CAS), it was possible to identify a possible binding place to phenol oxidation next to catalytic residue Trp171. The most important interactions and residues responsible for the stabilization of the substrate at the protein surface was characterized and three experimental mutants were proposed to confirm the information presented.

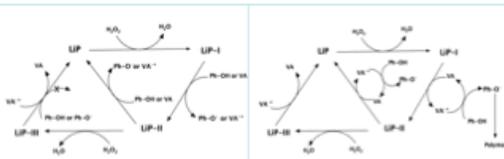


Fig 1. The catalytic cycle of LIP in the degradation of phenolic compounds. (left) Direct pathway (right) Indirect pathway

Methodology

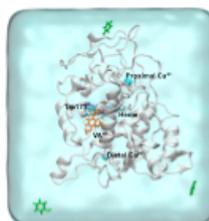


Fig2. Representation of system of DM

The crystal structure of LIP (PDB code 1LLP) was used in this study. The structure was prepared with the protein preparation wizard tool of Maestro². Docking calculations of VA in its radical state at Trp171 were performed with the Glide³ program generating 40 poses. The conformation with the better value of ΔG calculate with MMGBSA approach was selected, three molecules of Phenol were added and the system was prepared to run molecular dynamics (MD) simulations with the program Desmond and the OPLS-2005 force field. Frames in which an interaction between Protein and Phenol was detected through Simulation Interaction Diagram (SID) were clustered and the structures with a difference of 5 kcal/mol of the minimum ΔG value in every cluster were submitted to Computational Alanine Scanning (CAS). The enzymatic variants were generated with the residue scanning module of Bioluminate⁴, ΔG value for these structures were also evaluated and a final $\Delta\Delta G_{binding}$ value were calculated to every structure according to equation 1.

$$\Delta\Delta G_{binding} = \Delta G_{binding-mutante} - \Delta G_{binding-wild\ type} \quad (1)$$

Results and discussion

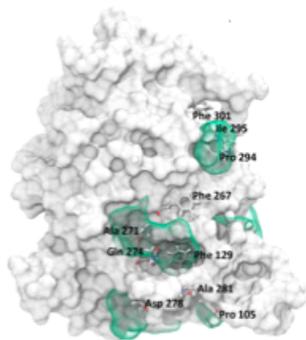


Fig 3. Volumetric map of the Phenol occupancy obtained using VMD's volmap plugin⁵

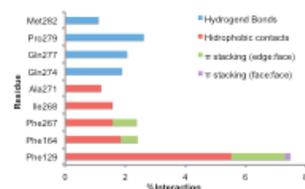


Fig 4. Simulation Interaction Diagram for 3 MD of 200ns

Tabla 1. Calculated binding free energy for the Phenol binding to the WT and representative mutants in each cluster.

Cluster	Contribution	$\Delta G_{binding}$ (kcal/mole)	$\Delta\Delta G_{binding}$ (kcal/mole)
Cluster 1	Wild Type	-25.873(1.546)	-
	Phe164Ala	-20.987(1.945)	4.886(0.614)
Cluster 2	Wild Type	-36.033(1.637)	-
	Phe129Ala	-33.227(1.808)	2.806(0.851)
Cluster 3	Wild Type	-21.413(1.605)	-
	Gln274Ala	-17.236(1.643)	4.177(2.920)

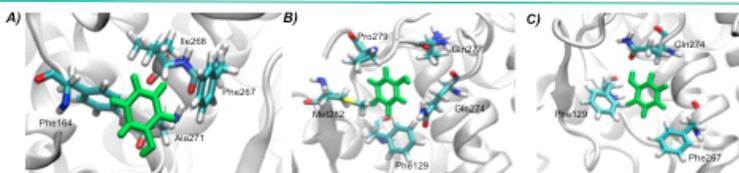


Fig 5. Representative structures from clustering calculations derived from MD, A) Cluster 1 B) Cluster 2 C) Cluster 3

Conclusions

- The residues Phe129, Phe164, Gln274 of the hydrophobic ditch next to Trp171 may constitute a possible binding place to Phenol and other phenolic compounds.
- Based on Computational Alanine Scanning, we can propose evaluate experimentally the effect in the binding free energy in the mutants Phe129Ala, Phe164Ala and Gln274Ala. This information is precised to confirm the theoretical information presented here.

References

- Chung, N.; Aust, S. D. Inactivation of Lignin Peroxidase by Hydrogen Peroxide During the Oxidation of Phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995, pp 851–855
- Maestro, version 10.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- Glide, version 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.
- Bioluminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schuttlen, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38

Acknowledgements

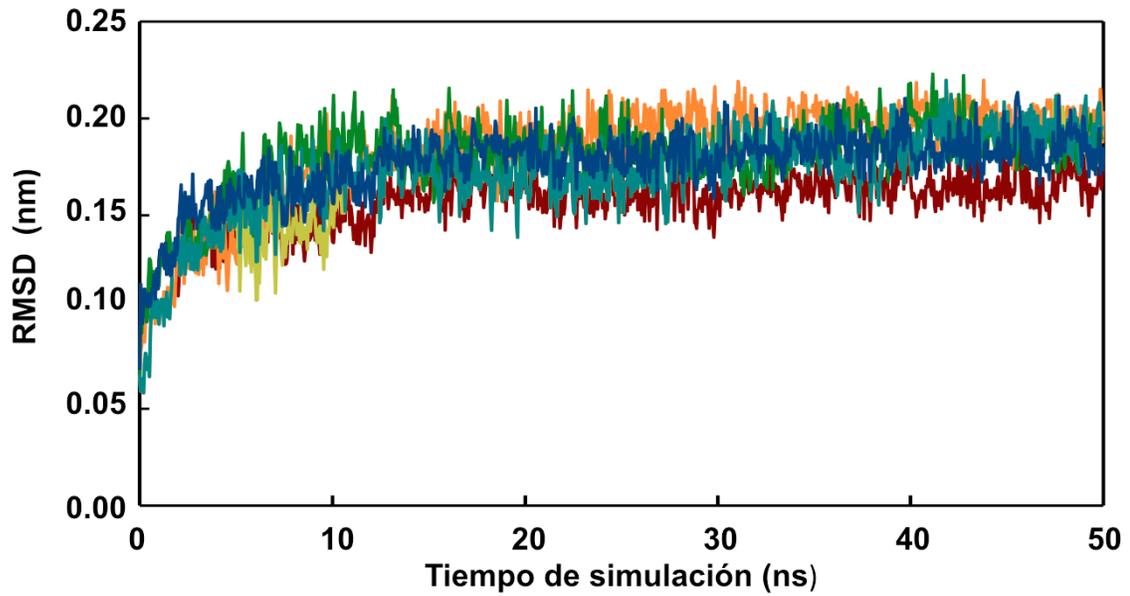
JAM and IF thank financial support from project FONDECYT N° 1140618. JOR thanks for doctoral scholarship to CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional 2016 Folio N° 21160905

Anexo 4. Partidores mutagénicos empleados para generar los variantes de LiPH8 y VP.

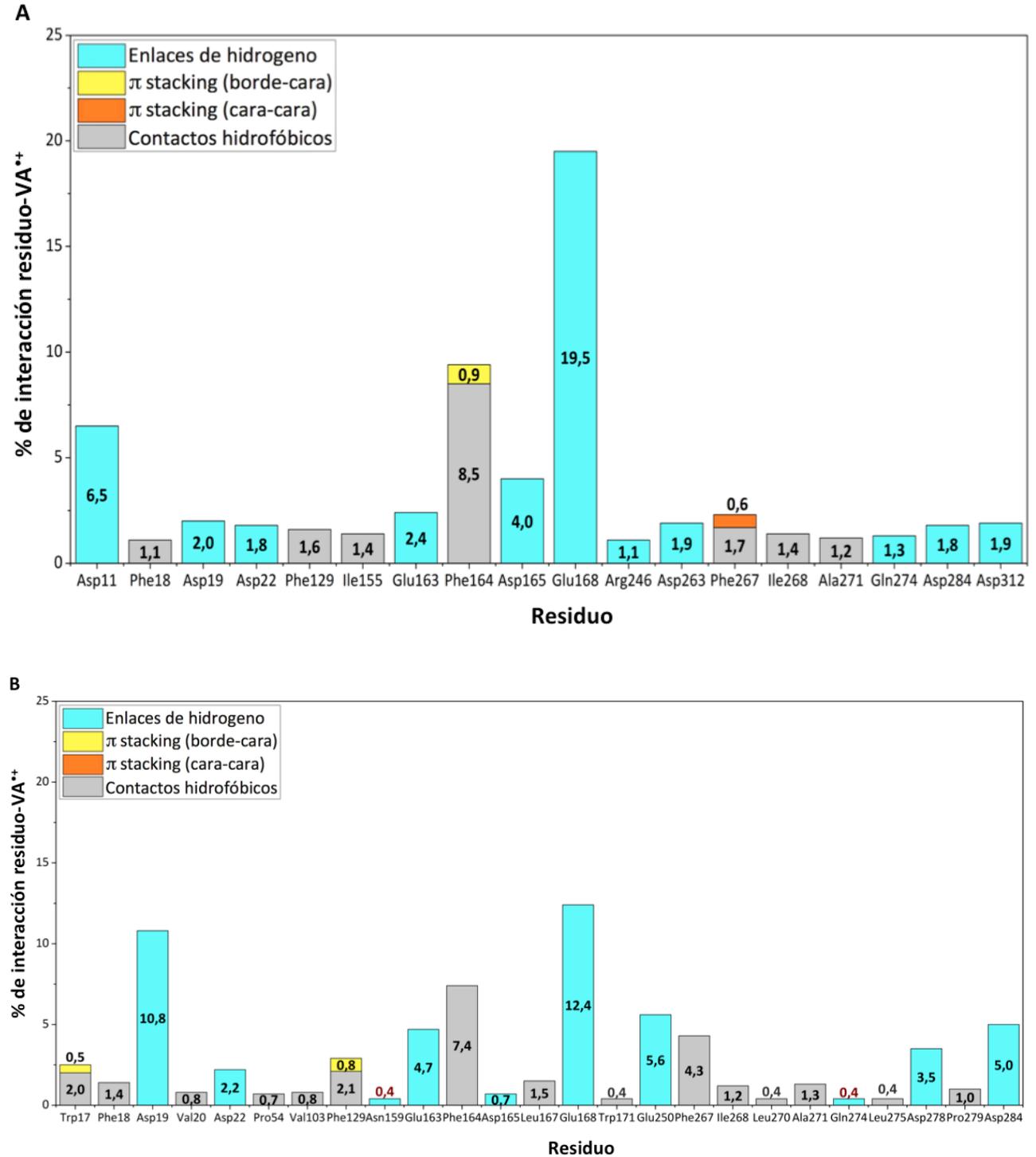
Tabla 1. Partidores (forward y reverse) empleados para generar las variantes de LiPH8 y VP. Los nucleótidos mutados son resaltados en verde

Mutación	Primer	Secuencia
E243Q	fwd	CAG ACT GCC TGC CAA TGG CAG TCC ATG G
	rev	CCA TGG ACT GCC ATT GGC AGG CAG TCT G
F129A	fwd	G ATG AAC TTC GCC ACC GGT CGT GCG CCG GCG
	rev	C GCC GGC GCA CGA CCG GTG GCG AAG TTC ATC
F164A	fwd	GAC GCG GGT GAA GCC GAC GAA CTG GAA CTG G
	rev	CCA GTT CCA GTT CGT CGG CTT CAC CCG CGT C
D165A	fwd	GCG GGT GAA TTC AAC GAA CTG GAA CTG GTT TGG
	rev	CCA AAC CAG TTC CAG TTC GTT GAA TTC ACC CGC
E168Q	fwd	GAC GAA CTG CAA CTG GTT TGG ATG CTG TCT GCG
	rev	CGC AGA CAG CAT CCA AAC CAG TTG CAG TTC GTC
E250Q	fwd	CGT ACC GCG TGC CAA TGG CAG TCT TTC GTT AAC
	rev	GTT AAC GAA AGA CTG CCA TTG GCA CGC GGT ACG
D264N	fwd	CTG GTT GAC AAC TTC CAG TTC ATC TTC CTG GCG
	rev	CGC CAG GAA GAT GAA CTG GAA GTT GTC AAC CAG
F267I	fwd	GAC GAC TTC CAG ATC ATC TTC CTG GCG CTG ACC C
	rev	GGG TCA GCG CCA GGA AGA TGA TCT GGA AGT CGT C
I268A	fwd	GAC TTC CAG TTC GCC TTC CTG GCG CTG ACC CAG C
	rev	GCT GGG TCA GCG CCA GGA AGG CGA ACT GGA AGT C
Q274A	fwd	GCG CTG ACC GCG CTG GGT CAG GAC CCG AAC GCG
	rev	CGC GTT CGG GTC CTG ACC CAG CGC GGT CAG CGC
P278A	fwd	G GGT CAG GAC GCG AAC GCG ATG ACC GAC TGC
	rev	G CAG TCG GTC ATC GCG TTC GCG TCC TGA CCC
D264N/F267I	fwd	CTG GTT GAC AAC TTC CAG ATC ATC TTC CTG GCG
	rev	CGC CAG GAA GAT GAT CTG GAA GTT GTC AAC CAG
D165N/E168Q	fwd	GGT GAA TTC AAC GAA CTG CAA CTG GTT TGG ATG CTG
	rev	CAG CAT CCA AAC CAG TTG CAG TTC GTT GAA TTC ACC

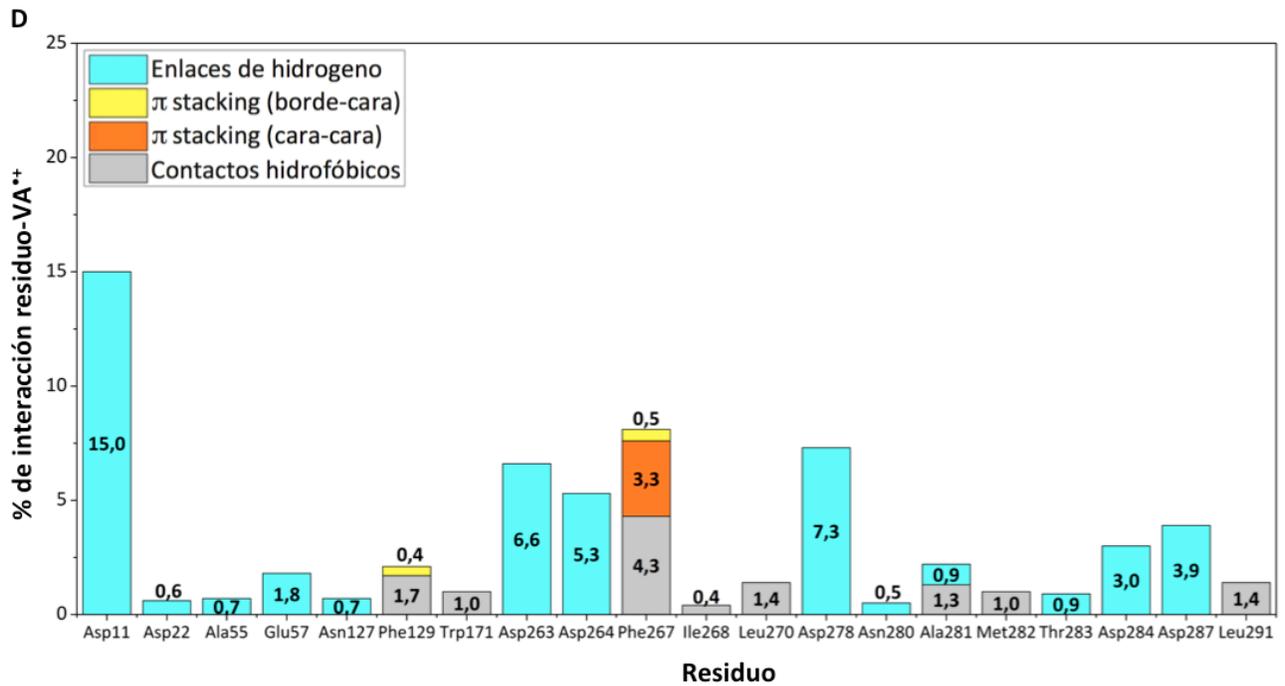
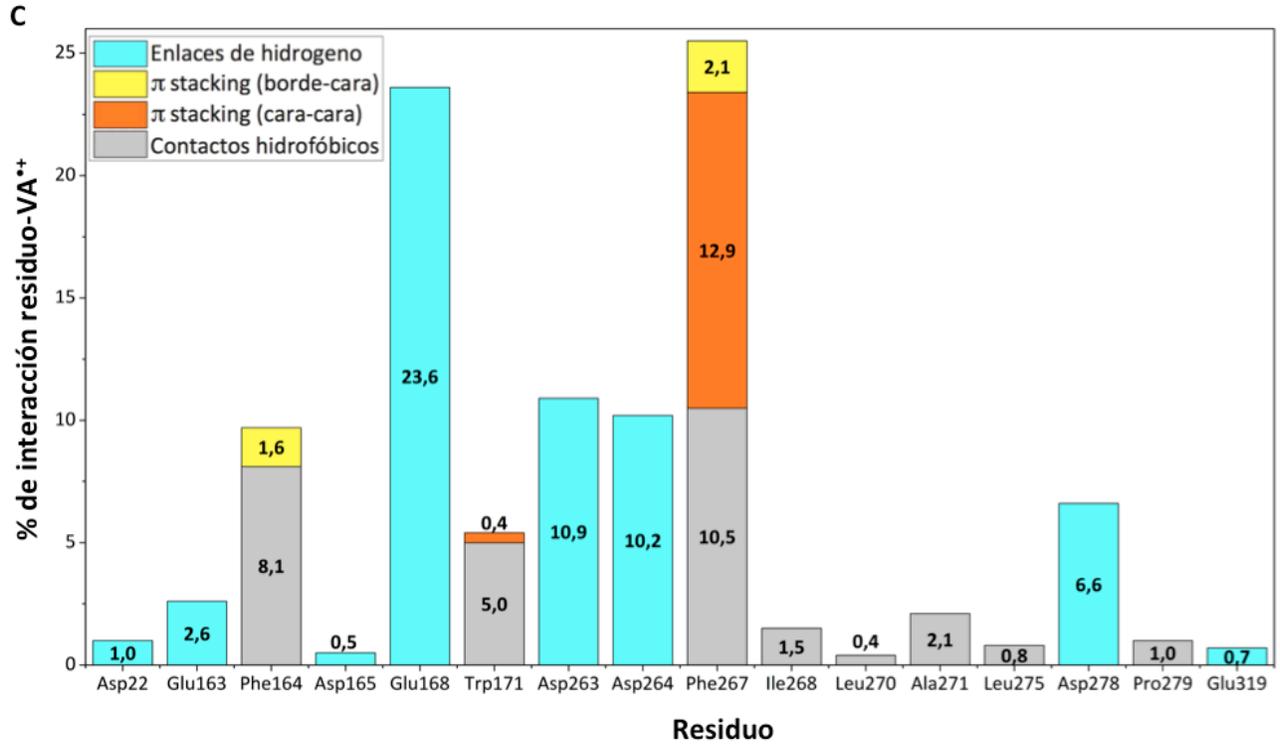
Anexo 5. Análisis de RMSD para el backbone de la proteína de los sistemas LiPH8 silvestre y mutantes del entorno ácido con respecto a la estructura cristalográfica PDB 1LLP: ■ LiPH8, ■ D165N, ■ D264N, ■ E168Q, ■ E250Q y ■ F267I.



Anexo 6. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV⁺. (A) Réplica 1, (B) Réplica 2.

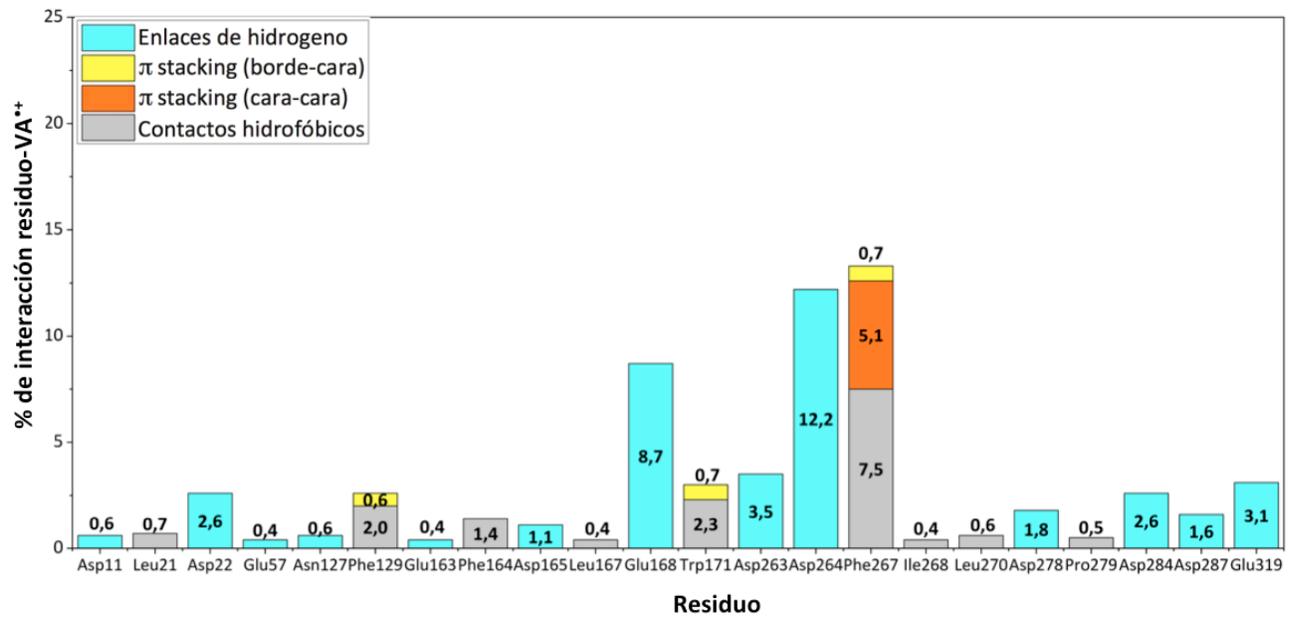


Anexo 6. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV⁺. (C) Réplica 3, (D) Réplica 4.

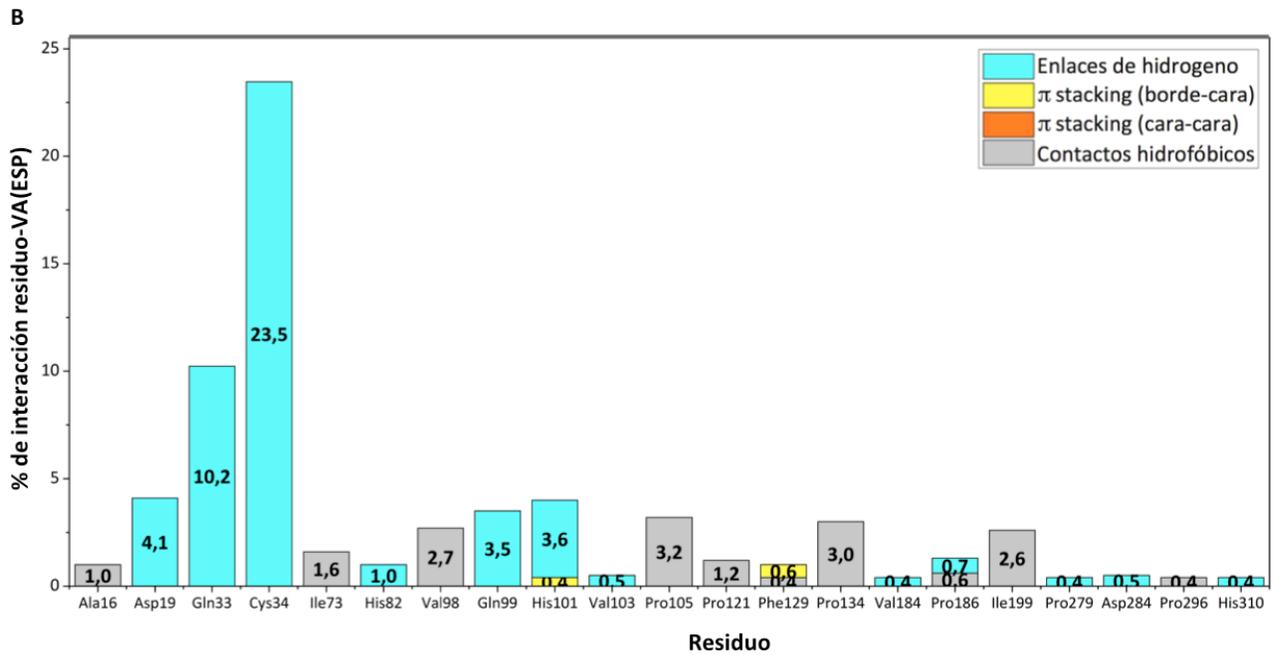
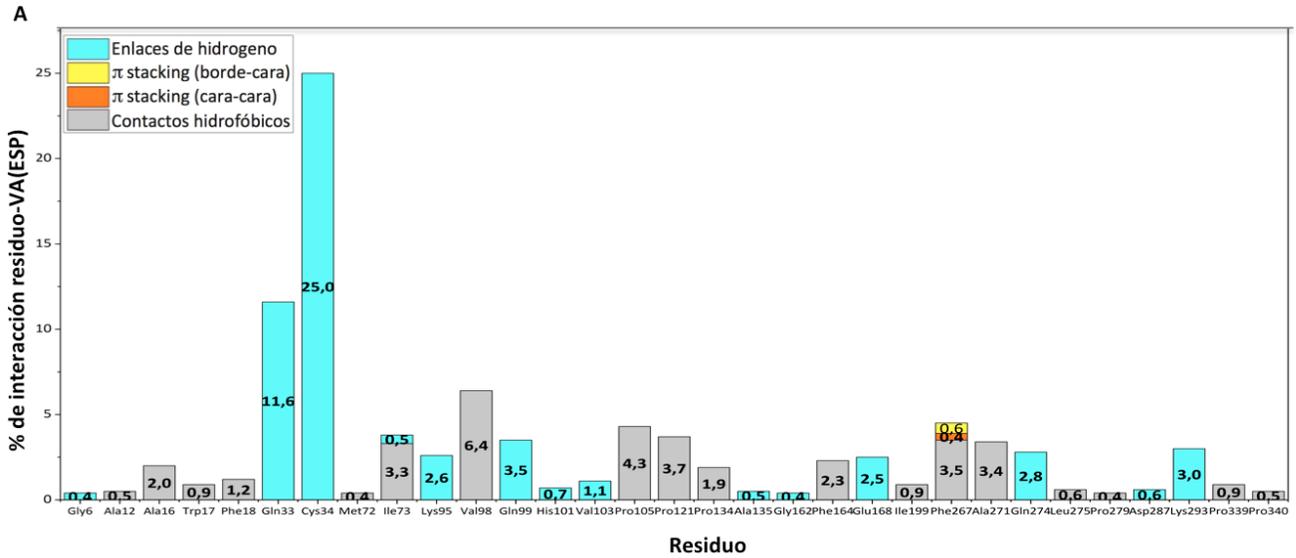


Anexo 6. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV⁺. (E) Réplica 5.

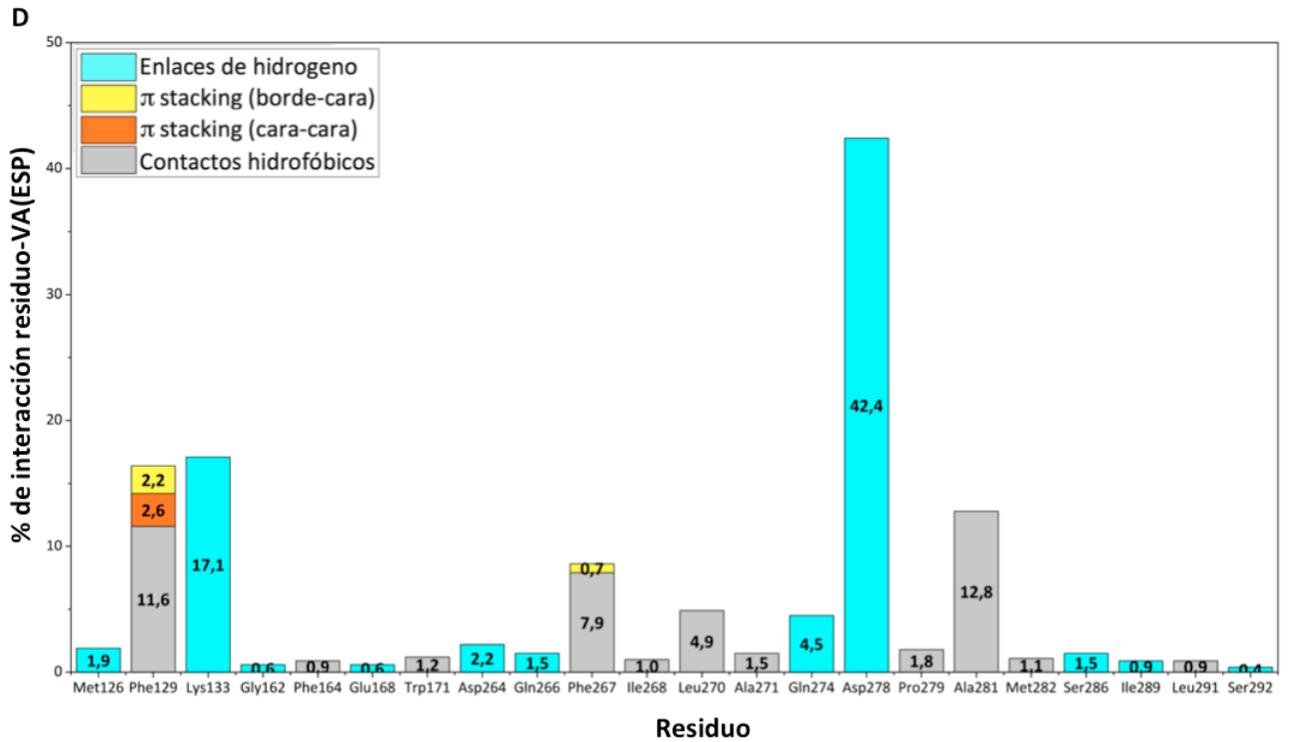
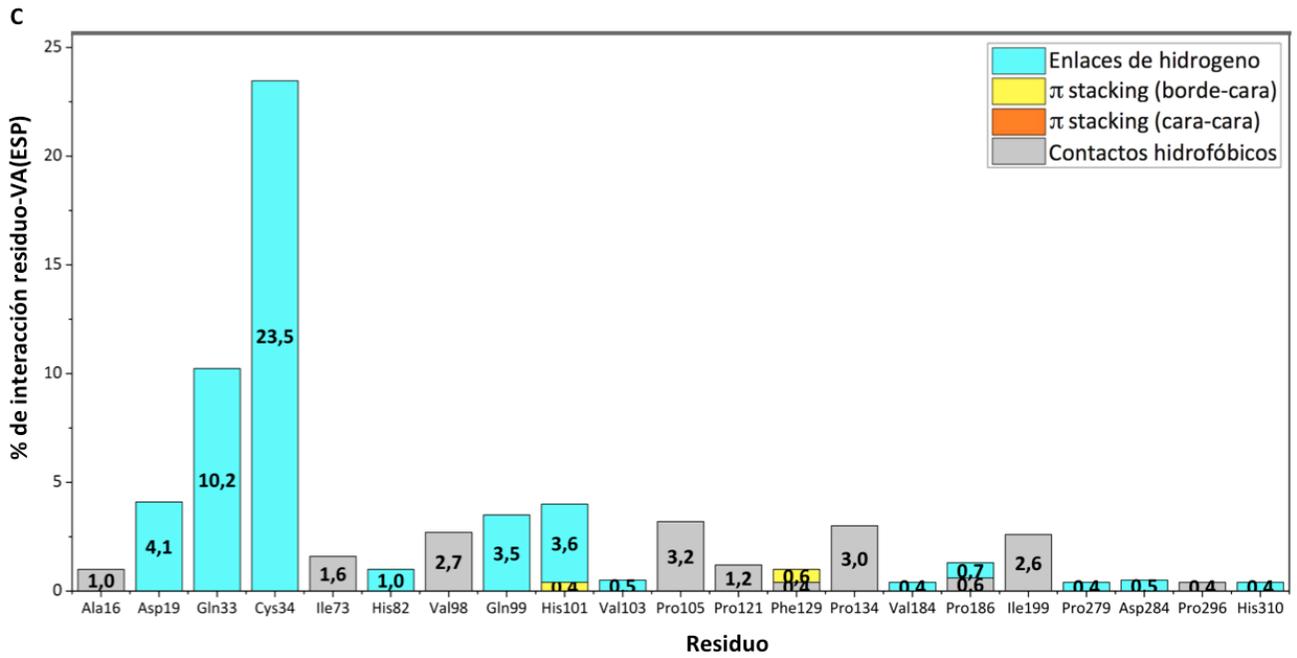
E



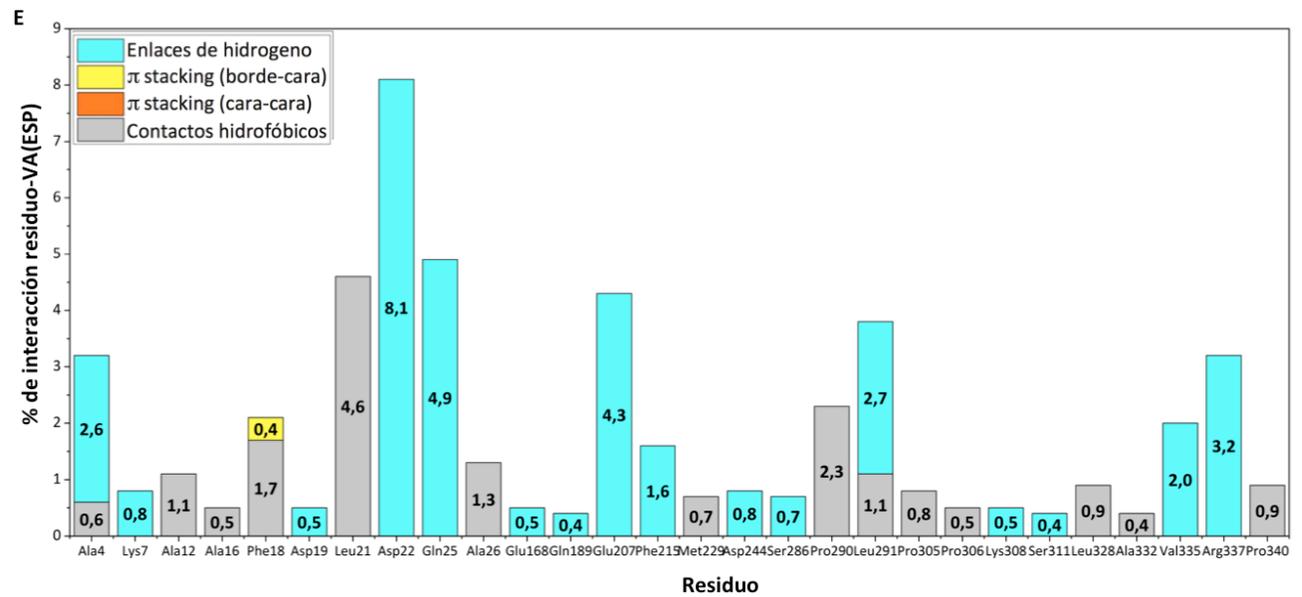
Anexo 7. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(ESP). (A) Réplica 1, (B) Réplica 2.



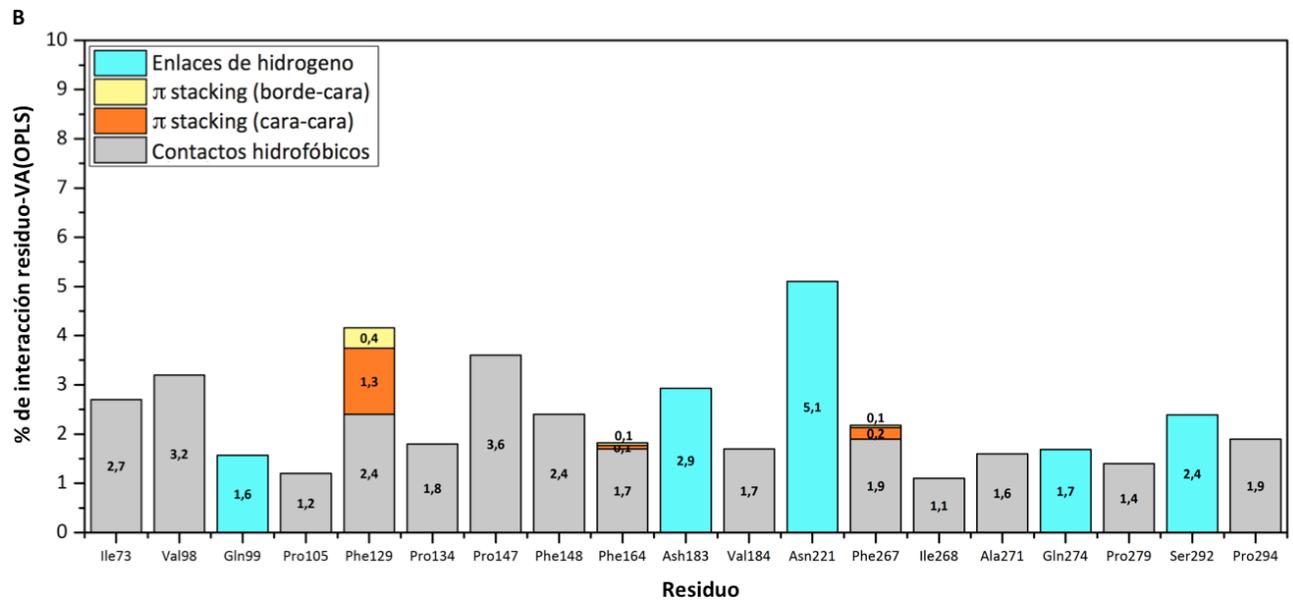
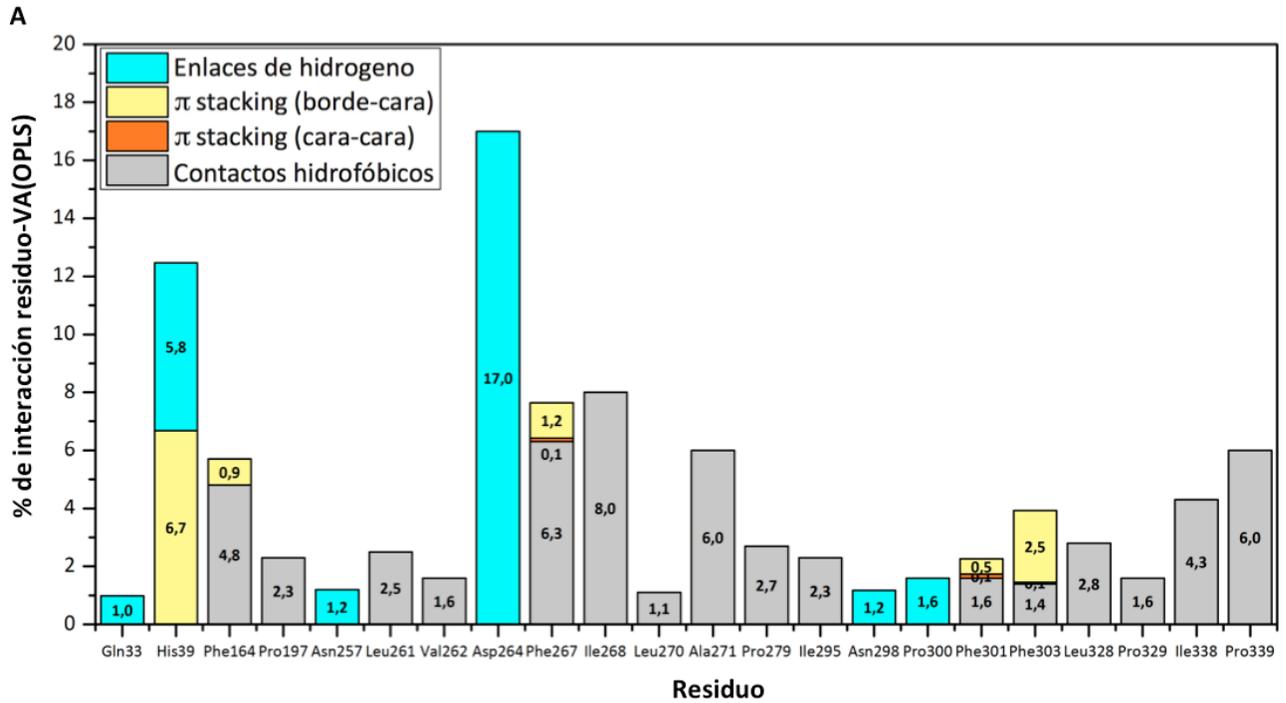
Anexo 7. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(ESP). (C) Réplica 3, (D) Réplica 4.



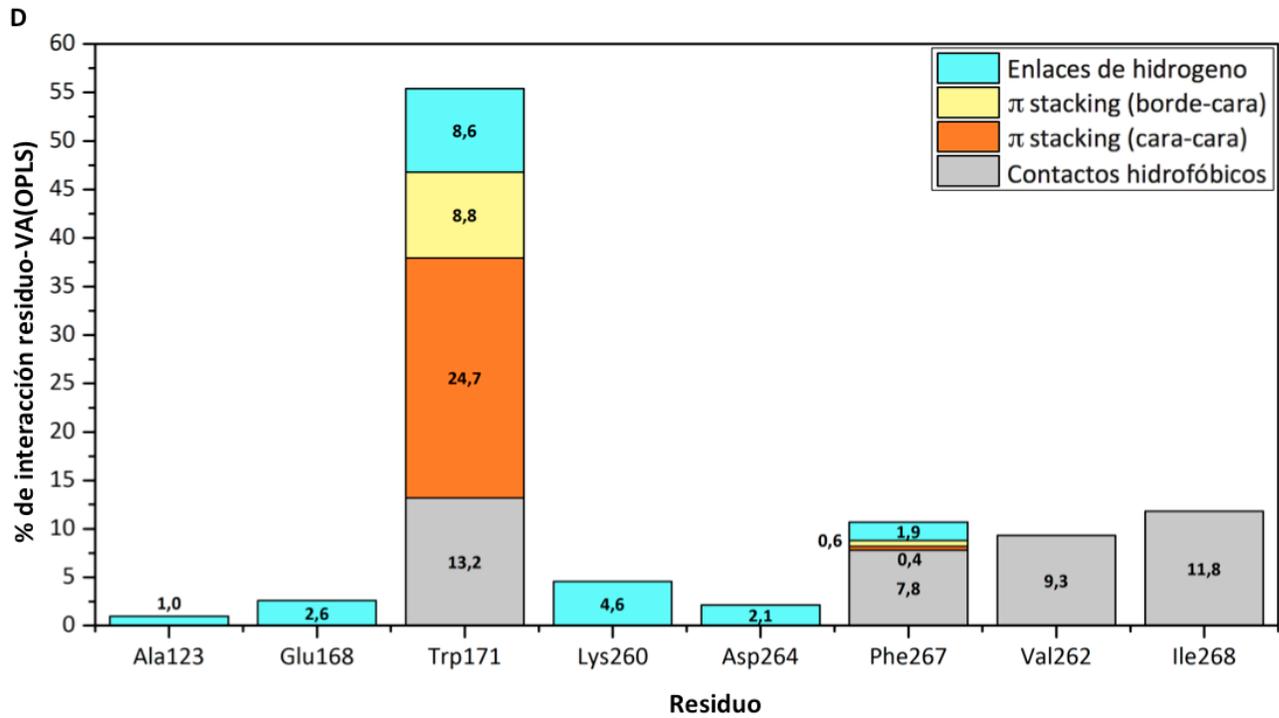
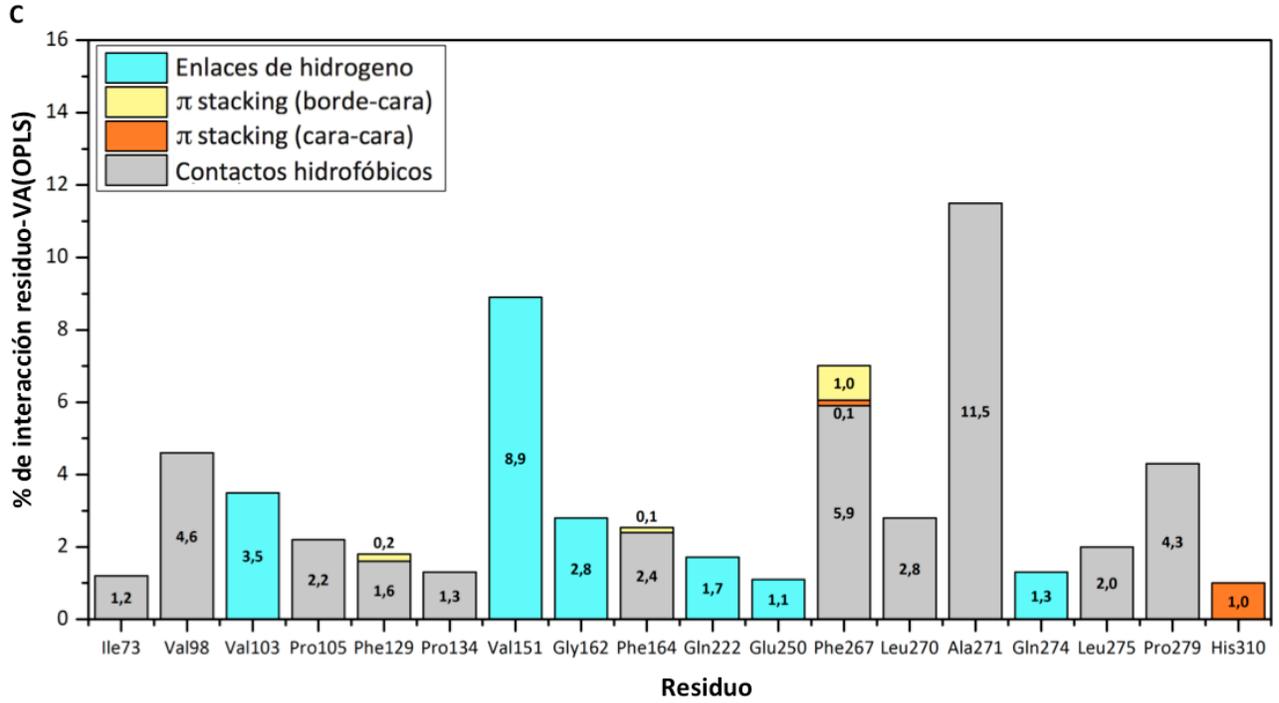
Anexo 7. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(ESP). (E) Réplica 5.



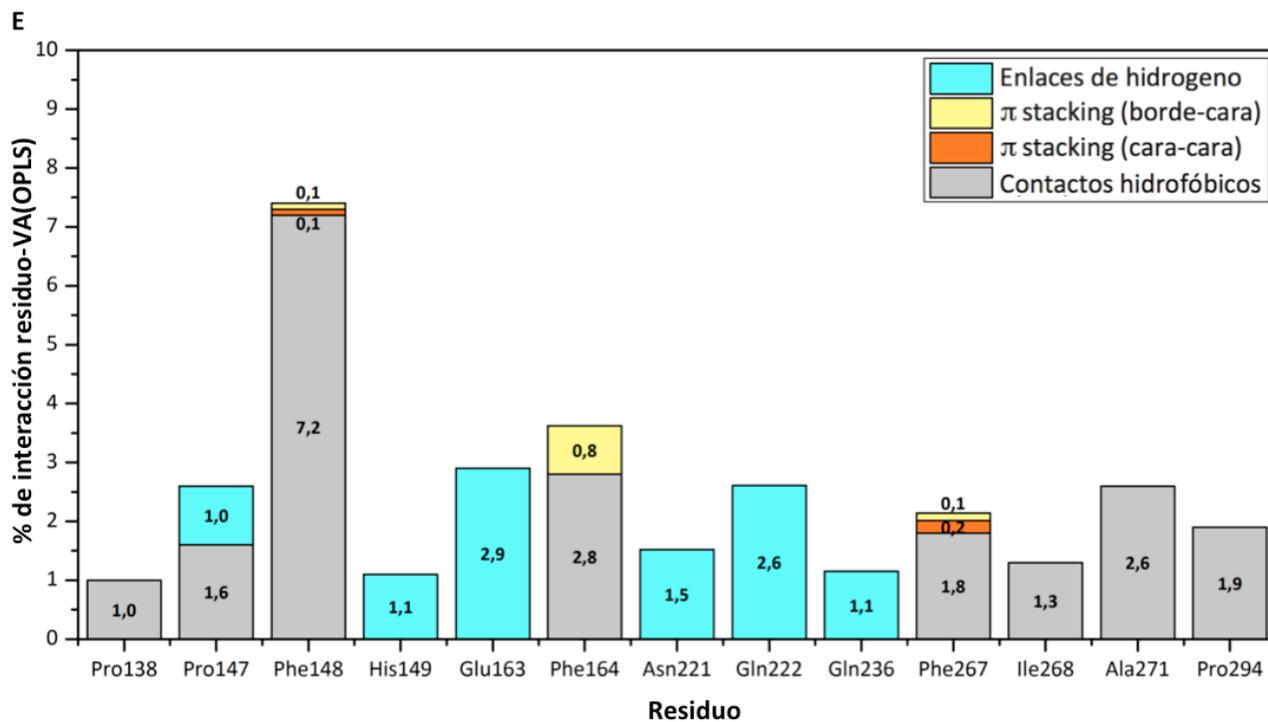
Anexo 8. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(OPLS). (A) Réplica 1, (B) Réplica 2.



Anexo 8. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(OPLS). (C) Réplica 3, (D) Réplica 4.



Anexo 8. Diagramas de interacción para las réplicas de las SDM del sistema LiP-AV(OPLS). (E) Réplica 5.



LiPH8 CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC | 546
D165N CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCACGGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
E168Q CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
E250Q CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
D264N CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
F267I CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
D165N_E168Q CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCACGGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
E168Q_E250Q CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
D264N_F267I CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCGACGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC
D165N_E168Q_D264N_F267I CGTGTTAACGACGCGGGTGAATTCACGGAACGGAACGTTGGATGCTGCTGCGCACCTGTGCGGGCGGTTAAC

LiPH8 GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC | 624
D165N GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
E168Q GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
E250Q GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
D264N GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
F267I GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
D165N_E168Q GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
E168Q_E250Q GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
D264N_F267I GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC
D165N_E168Q_D264N_F267I GACGTTGACCCGACCGTTACAGGTTCTGCCGTTGACTCTACCCCGGGTATCTTCGACTCTCAGTCTCTCGTTGAAACC

LiPH8 CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT | 702
D165N CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
E168Q CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
E250Q CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
D264N CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
F267I CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
D165N_E168Q CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
E168Q_E250Q CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
D264N_F267I CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT
D165N_E168Q_D264N_F267I CAGCTGCGTGGTACC CGGTTCCCGGGTCTGGTGGTAACAGGGTGAAGTTGAATCTCCGCTGCCGGGTGAAATCCCGT

LiPH8 ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA | 780
D165N ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
E168Q ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
E250Q ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
D264N ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
F267I ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
D165N_E168Q ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
E168Q_E250Q ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
D264N_F267I ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA
D165N_E168Q_D264N_F267I ATCCAGTCTGACCACACCATCGCGCGTGACTCTCGTACC CGGTCGCAATGGCAGTCTTTCGTTAAACAACAGCTCTAAA

LiPH8 CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT | 858
D165N CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
E168Q CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
E250Q CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
D264N CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
F267I CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
D165N_E168Q CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
E168Q_E250Q CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
D264N_F267I CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT
D165N_E168Q_D264N_F267I CTGGTTGACGACTTCCAGTTCATCTTCTGCGCTGACCCAGCTGGGTGAGGACCCGAAACCGCATGACCCGACTGCTCT

LiPH8 GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC | 936
D165N GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
E168Q GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
E250Q GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
D264N GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
F267I GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
D165N_E168Q GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
E168Q_E250Q GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
D264N_F267I GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC
D165N_E168Q_D264N_F267I GACGTTATCCCGCAGTCTAAACCGATCCCGGGTAACCTGCCGTTCTCTTTCTTCCCGCGGGTAAAACCATCAAAGAC

LiPH8 GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC | 1014
D165N GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
E168Q GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
E250Q GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
D264N GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
F267I GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
D165N_E168Q GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
E168Q_E250Q GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC

```
D264N_F267I      GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
D165N_E168Q_D264N_F267I GTTGAACAGGCGTGCGCGGAAACCCCGTTCCCGACCTGACCACCTGCCGGGTCCGGAAACCTCTGTTCAGCGTATC
*****

LiPH8            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
D165N            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
E168Q            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
E250Q            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
D264N            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
F267I            CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
D165N_E168Q     CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
E168Q_E250Q     CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
D264N_F267I     CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
D165N_E168Q_D264N_F267I CCGCCGCCGCCGGGTGCGTAAGGATCC
*****

|1041
```