

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Aspectos estructurales de peroxidasas de tipo DYP de
Auricularia auricula-judae* y de *Pleurotus ostreatus

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Davó Sigüero

Director

Antonio Romero Garrido

Madrid

© Irene Davó Sigüero, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ASPECTOS ESTRUCTURALES DE PEROXIDASAS
DE TIPO DYP DE *AURICULARIA AURICULA-JUDAE*
Y DE *PLEUROTUS OSTREATUS*.**

**TESIS DOCTORAL DE:
IRENE DAVÓ SIGUERO**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
ANTONIO ROMERO GARRIDO**

Madrid, 2019

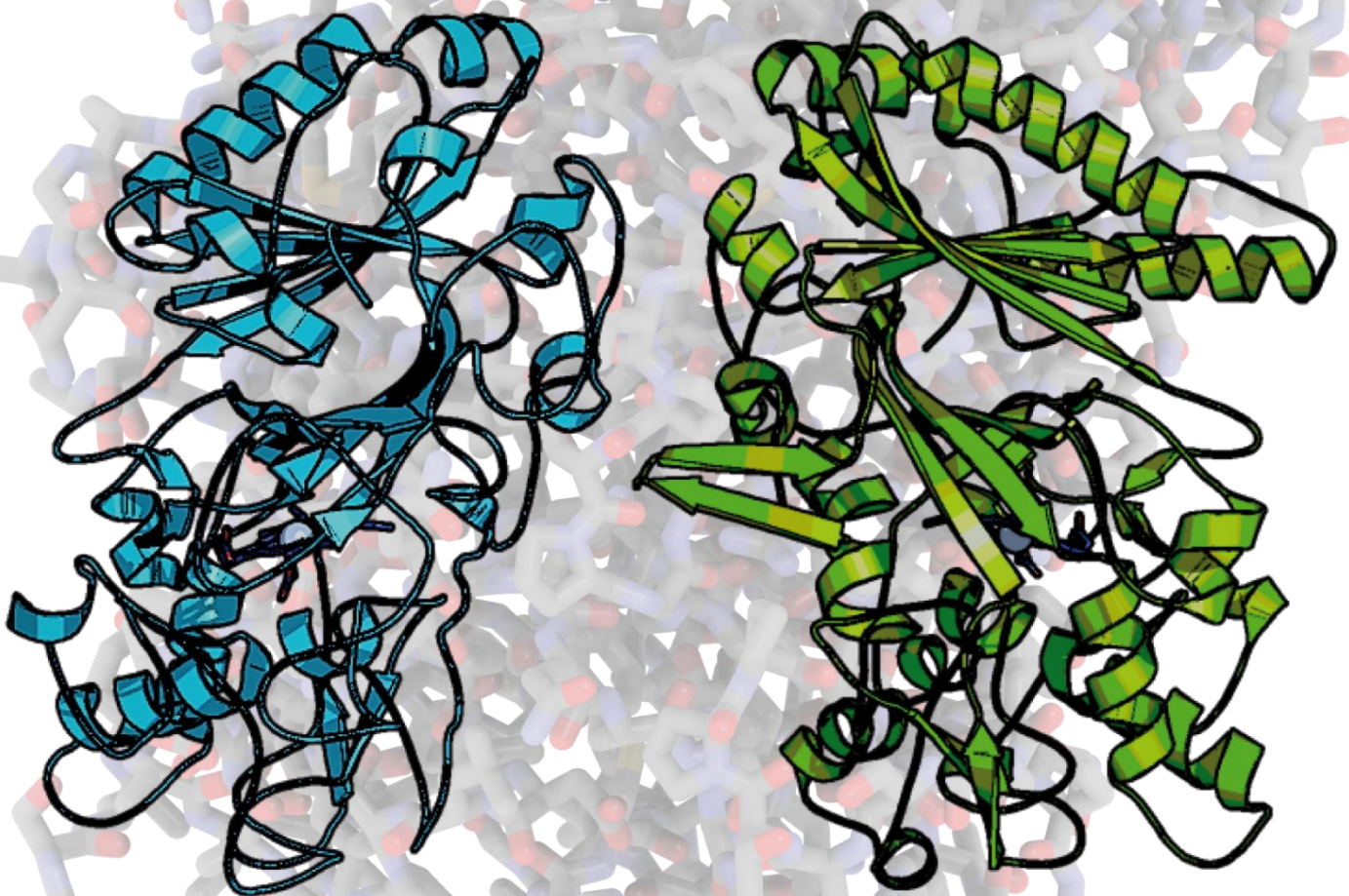


UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE

MADRID

**Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.**

**ASPECTOS ESTRUCTURALES DE PEROXIDASAS
DE TIPO DYP DE *AURICULARIA AURICULA-JUDAE*
Y DE *PLEUROTUS OSTREATUS*.**



Tesis doctoral de **Irene Davó Sigüero**
Bajo la dirección de **Dr. Antonio Romero Garrido**

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña. Irene Davó Sigüero, estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

ASPECTOS ESTRUCTURALES DE PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE AURICULARIA AURICULA-JUDAE Y DE PLEUROTUS OSTREATUS.

y dirigida por: Dr. Antonio Romero Garrido.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 4 de septiembre de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Universidad Complutense de Madrid,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

**ASPECTOS ESTRUCTURALES DE
PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE
AURICULARIA AURICULA–JUDAE Y DE
PLEUROTUS OSTREATUS.**

Memoria presentada por Irene Davó Sigüero para optar al
grado de Doctor
Madrid, 2019.

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Estructural y
Química del **Centro de Investigaciones Biológicas (CIB–CSIC)** bajo la
dirección del **Dr. Antonio Romero Garrido**.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, el Dr. Antonio Romero su confianza, su implicación y su inestimable ayuda en el desarrollo de esta tesis. Quisiera darle las gracias por ofrecerme la oportunidad de descubrir la investigación al acogerme en el laboratorio y por todo el conocimiento que me ha transmitido a lo largo de estos años.

Me gustaría agradecer al departamento de modelado electrónico y atómico de proteínas del Centro Nacional de Supercomputación y al grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica, especialmente al Dr. Ángel T. Martínez, la Dra. Elena Fernández y la Dra. María Dolores Linde, el trabajo realizado y su confianza durante esta colaboración.

A mis compañeros de laboratorio Elena, Mer, Javier, Fede y Andrea, muchas gracias por vuestra generosidad, por acogerme y enseñarme de una manera tan cercana, ha sido un placer trabajar con vosotros durante este periodo.

Fede, gracias por saber poner el toque de humor que nos saca siempre una sonrisa y por estar siempre dispuesto a ayudar compartiendo tu experiencia y conocimientos.

Javier, muchas gracias por introducirme en el “mundo de las peroxidasas” y sentar las bases para poder desarrollar y continuar esta investigación.

Elena y Mer, me siento muy agradecida por vuestra gran implicación y paciencia en mi aprendizaje, ha sido un verdadero privilegio aprender con vosotras. Elena nunca olvidaré toda la fuerza y el respaldo que me has aportado en los momentos más necesarios. Mer, ha sido muy importante la confianza que desde el principio tuviste en mí.

Me gustaría dar las gracias a mis otros compañeros, los vecinos del laboratorio B03, siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda. Marta, Rocío y Nuria, son muchas las aventuras y desafíos en los que nos hemos embarcado, y siempre he podido contar con vosotras para despejar dudas, reír o llorar, junto con Jaime, Eva y Andrés habéis sabido hacer más llevaderos los peores momentos y mejores los más felices.

Marta, han sido muchos los momentos que hemos compartido en esta montaña rusa, muchas las celebraciones en las subidas y las palabras de ánimo en las bajadas, muchas gracias porque en todo momento he contado con tu ayuda y tu apoyo. Tu voluntad y trabajo me han servido como ejemplo, gracias por tu amistad.

Me siento muy afortunada y agradecida por haber contado en esta, como en todas las etapas de mi vida, con el apoyo de mi familia, especialmente de mis padres. Muchas gracias por inculcarme los valores y darme los medios para conseguir alcanzar metas tan importantes como esta. Gracias por guiarme, gracias por estar incondicionalmente y gracias por ser como sois.

Muchas gracias a todos los que me habéis acompañado en este viaje y habéis aportado vuestro granito de arena a esta gran experiencia que ha sido la tesis doctoral.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD	4
AGRADECIMIENTOS	7
ÍNDICE	10
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE TABLAS	18
SUMMARY	20
RESUMEN	24
INTRODUCCIÓN	28
1. HEMO PEROXIDASAS	30
1.1. MECANISMO CATALÍTICO	31
1.2. HEMO PEROXIDASAS FÚNGICAS Y PEROXIDASAS DE TIPO DYP	32
2. ANTECEDENTES ESTRUCTURALES	33
3. CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS PEROXIDASAS DE TIPO DYP	36
3.1. ACTIVIDAD CATALÍTICA Y APLICACIONES	36
3.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	37
4. ESTUDIOS PREVIOS	39
4.1. PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE <i>A. AURICULA-JUDAE</i>	39
4.2. PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE <i>P. OSTREATUS</i>	40
OBJETIVOS	42
MATERIALES & MÉTODOS	46
1. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS MUTANTES PROTEICOS	48
1.1. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE MUTANTES	48
1.2. EXPRESIÓN	49
1.3. PURIFICACIÓN	50
2. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS-X	50
2.1. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	51
2.2. OPTIMIZACIÓN Y VITRIFICACIÓN	52
2.3. RECOGIDA DE DATOS	55
2.4. PROCESAMIENTO DE DATOS	57
2.5. DETERMINACIÓN DE LAS FASES EXPERIMENTALES	58
2.5.1. MÉTODOS DIRECTOS	59
2.5.2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS FASES	59
2.5.3. REEMPLAZO MOLECULAR	59

2.6. CONSTRUCCIÓN Y REFINAMIENTO DEL MODELO	60
2.7. VALIDACIÓN DEL MODELO	61
3. ENSAYOS CINÉTICOS Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES	63
3.1. DYP1 DE <i>A. AURICULA-JUDAE</i>	63
3.1.1. ANÁLISIS QUIRAL Y ENSAYOS CINÉTICOS	63
3.1.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES	64
3.2. DYP4 DE <i>P. OSTREATUS</i>	65
3.2.1. ENSAYOS CINÉTICOS	65
3.2.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA	66
RESULTADOS	68
1. RESOLUCIÓN DE MODELOS ESTRUCTURALES POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS-X	70
1.1. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	70
1.2. OPTIMIZACIÓN Y VITRIFICACIÓN	71
1.3. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE DATOS	72
1.4. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y REFINAMIENTO DE LOS MODELOS	73
1.4.1. DYP1 DE <i>A. AURICULA-JUDAE</i>	73
1.4.2. DYP4 DE <i>P. OSTREATUS</i>	78
2. MODELOS ESTRUCTURALES	83
2.1. AAUDYP1 Y SUS MUTANTES	83
2.2. PLEOSDYP4 Y SUS MUTANTES	87
3. ENSAYOS CINÉTICOS Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES	92
3.1. AAUDYP1 Y SUS MUTANTES	92
3.1.1. ANÁLISIS QUIRAL Y ENSAYOS CINÉTICOS	92
3.1.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES	93
3.2. PLEOSDYP4 Y SUS MUTANTES	95
3.2.1. ENSAYOS CINÉTICOS	95
3.2.2. SIMULACIONES COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA	97
DISCUSIÓN	100
1. ESTUDIOS ESTRUCTURALES	102
1.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA	102
1.2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL	104
1.3. COMPARACIÓN CON DYPs BACTERIANAS Y FÚNGICAS	107
2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES	110

2.1. ANÁLISIS QUIRAL, CINÉTICO Y COMPUTACIONAL DE AAUDYP1	110
2.2. ENSAYOS CINÉTICOS, SIMULACIONES COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA DE <i>PLEOSDYP4</i>	113
CONCLUSIONES	118
ABREVIATURAS	122
BIBLIOGRAFÍA	128
PUBLICACIONES	138

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DEL GRUPO HEMO TIPO B	30
FIGURA 2. CICLO CATALÍTICO DEL COFACTOR HEMO B.....	31
FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE LAS HEMO PEROXIDASAS SEGÚN PEROXIBASE.....	33
FIGURA 4. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DE PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS.....	34
FIGURA 5. ESTRUCTURAS DE LOS MIEMBROS REPRESENTATIVOS DE LA SUPERFAMILIA PEROXIDASA–CLORITO DISMUTASA	35
FIGURA 6. CLASIFICACIÓN DE PEROXIDASAS DE TIPO DY P SEGÚN LOS DOS MODELOS PROPUESTOS	39
FIGURA 7. ESQUEMA DE UN POCILLO EN UNA PLACA DE CRISTALIZACIÓN	51
FIGURA 8. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN DE VAPOR	53
FIGURA 9. DETALLE DE UN CRISTAL EN UN LAZO DE NYLON (“LOOP”) EQUILIBRADO EN LA SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA.....	54
FIGURA 10. PREPARACIÓN DE LOS CRISTALES PARA SU TRANSPORTE	54
FIGURA 11. LEY DE BRAGG	55
FIGURA 12. ESPECTRO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS–X DE <i>PLEOSDYP4</i> F194Y.....	56
FIGURA 13. ÁNGULOS DE TORSIÓN DEL ENLACE PEPTÍDICO Y DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN	62
FIGURA 14. GRÁFICO DE VALIDACIÓN DEL PROGRAMA POLYGON DEL MUTANTE DE <i>PLEOSDYP4</i> F194Y.....	63
FIGURA 15. OXIDACIÓN DE SULFUROS	63
FIGURA 16. MODELO DE INTERACCIÓN ENTRE EL COMPUESTO I DE <i>AAUDYP1</i> Y MPS	65
FIGURA 17. CRISTALES OBTENIDOS EN PLACAS DE OPTIMIZACIÓN.....	71
FIGURA 18. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE DY P DE <i>B. ADUSTA</i> Y <i>A. AURICULA– JUDAE</i>	74
FIGURA 19. DIAGRAMAS DE RAMACHANDRAN DE LOS MODELOS ESTRUCTURALES DE <i>AAUDYP1</i>	77
FIGURA 20. MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA ($2F_o-F_c$) DE LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE MET331 Y TYR337 PARA LOS MODELOS ESTRUCTURALES DE <i>A. AURICULA–JUDAE</i>	78
FIGURA 21. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE DY P DE <i>P. OSTREATUS</i> , <i>B. ADUSTA</i> Y <i>A. AURICULA–JUDAE</i>	79
FIGURA 22. RAMACHANDRAN DE LAS ESTRUCTURAS DE <i>PLEOSDYP4</i> , EL COMPLEJO CON MANGANESO Y LOS MUTANTES E190A Y F194W	81
FIGURA 23. RAMACHANDRAN DE LAS ESTRUCTURAS DE <i>PLEOSDYP4</i> Y LOS MUTANTES F194Y Y D196A.....	82
FIGURA 24. FRAGMENTOS DE LOS MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA DE <i>PLEOSDYP4</i> Y SUS MUTANTES DE UNA SECCIÓN DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA (ILE358 – PHE365).....	83

FIGURA 25. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE AAUDYP1	84
FIGURA 26. ESTRUCTURA DE AAUDYP1 NATIVA.....	85
FIGURA 27. DETALLE DE LAS LÁMINAS B CENTRALES DE AAUDYP1	85
FIGURA 28. DOMINIO C–TERMINAL DE AAUDYP1	86
FIGURA 29. ENTORNO DEL GRUPO HEMO DE AAUDYP1.....	86
FIGURA 30. DIMENSIONES DEL CANAL DE ACCESO AL GRUPO HEMO EN LAS ESTRUCTURAS DE AAUDYP1 NATIVA Y SUS MUTANTES. EL CANAL DE ACCESO SE REPRESENTA COMO UNA SUPERFICIE GRIS. EN LA PARTE D	87
FIGURA 31. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PLEOSDYP4.....	88
FIGURA 32. ESTRUCTURA DE PLEOSDYP4 NATIVA	89
FIGURA 33. DETALLE DE LAS B–LÁMINAS CENTRALES DE PLEOSDYP4	89
FIGURA 34. DOMINIO C–TERMINAL DE PLEOSDYP4	90
FIGURA 35. ENTORNO DEL GRUPO HEMO DE PLEOSDYP4.....	90
FIGURA 36. RESIDUOS MUTADOS EN PLEOSDYP4 DENTRO DE SU DENSIDAD ELECTRÓNICA	91
FIGURA 37. LOCALIZACIÓN DEL ION MANGANESO EN LA ESTRUCTURA DE PLEOSDYP4	91
FIGURA 38. SIMULACIONES OBTENIDAS POR PELE DE AAUDYP1 Y SUS MUTANTES FRENTE A MPS Y MTS.....	94
FIGURA 39. CINÉTICAS DE OXIDACIÓN DE Mn^{2+} DE PLEOSDYP4 Y LOS MUTANTES CON VALORES MÁS REPRESENTATIVOS.....	97
FIGURA 40. SIMULACIÓN PELE DE LA DIFUSIÓN DE Mn^{2+} EN PLEOSDYP4.....	98
FIGURA 41. SIMULACIÓN QM/MM DE LA CADENA DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA PARA LA OXIDACIÓN DEL Mn^{2+}	98
FIGURA 42. ESPECTROS DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR)	99
FIGURA 43. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE AAUDYP1 Y DE PLEOSDYP4.....	103
FIGURA 44. COMPARACIÓN ENTRE LAS ESTRUCTURAS DE AAUDYP1 Y DE PLEOSDYP4	105
FIGURA 45. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE AAUDYP1 Y PLEOSDYP4.....	106
FIGURA 46. ENTORNO DEL GRUPO HEMO DE PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE CLASE D O V	107
FIGURA 47. ESTRUCTURAS DE PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE CLASE AVANZADA (V)	108
FIGURA 48. COMPARACIÓN DE LA ZONA INTERDOMINIOS DE PEROXIDASAS DE TIPO DYP.....	109
FIGURA 49. ACCESO AL BOLSILLO HEMO DE LAS DISTINTAS CLASES DE PEROXIDASAS DE TIPO DYP	110
FIGURA 50. CANAL DE ACCESO Y BOLSILLO DEL GRUPO HEMO DE AAUDYP1 NATIVA, EL MUTANTE L357G Y F359G	111

FIGURA 51. ACCESOS AL BOLSILLO HEMO DE PEROXIDASA DE RÁBANO Y DE LAS DYPS:
TFUDYP Y *AAUDYP1* 113

FIGURA 52. CADENA DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DE *PLEOSDYP4*..... 115

FIGURA 53. RESIDUOS IMPLICADOS EN LA OXIDACIÓN DE Mn^{2+} 116

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS DISTINTOS MUTANTES EN LAS REACCIONES DE PCR. 48

TABLA 2. PLACAS DE OPTIMIZACIÓN. 52

TABLA 3. CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN. 70

TABLA 4. ESTADÍSTICAS OBTENIDAS DURANTE EL PROCESAMIENTO DE DATOS DE AAUDYP1 Y SUS MUTANTES. 72

TABLA 5. ESTADÍSTICAS DEL PROCESADO DE *PLEOSDYP4* Y SUS MUTANTES. 73

TABLA 6. PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE REEMPLAZO MOLECULAR PARA AAUDYP1. 75

TABLA 7. ESTADÍSTICAS OBTENIDAS EN LA CONSTRUCCIÓN Y REFINAMIENTO DE LOS MODELOS DE AAUDYP1. 75

TABLA 8. REEMPLAZO MOLECULAR DE *PLEOSDYP4* Y SUS MUTANTES 79

TABLA 9. ESTADÍSTICAS DEL REFINADO DE *PLEOSDYP4* Y SUS MUTANTES. 80

TABLA 10. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA QUIRAL DE LOS PRODUCTOS DE LAS REACCIONES DE MPS Y MTS RESULTANTES DE LA CATÁLISIS CON AAUDYP1 Y SUS MUTANTES. 92

TABLA 11. CONSTANTES CINÉTICAS DE AAUDYP1 Y SUS MUTANTES PARA LA OXIDACIÓN DE MPS Y MTS. 93

TABLA 12. DENSIDAD DE SPIN MEDIANTE SIMULACIONES QM/MM DE AAUDYP1 Y EL MUTANTE F359G. 95

TABLA 13. CONSTANTES CINÉTICAS DE ESTADO ESTACIONARIO DE *PLEOSDYP4* Y SUS MUTANTES. 96

SUMMARY

SUMMARY

Heme peroxidases catalyse the hydrogen peroxide-dependent oxidation of a wide variety of substrates. Dye-decolorizing peroxidases are bacterial, archaeal, protist and fungal heme proteins with a high diversity of amino acid sequences. This family has a remarkable stability at extreme temperature, pressure and pH values. A distinct characteristic of these enzymes is their ability to oxidize a broad range of compounds, including poorly biodegradable materials such as lignin. DyPs exhibit a high decolorizing activity by oxidizing recalcitrant and dispersive dyes such as anthraquinone and azo dyes. Its high stability and its catalytic activity against poorly biodegradable compounds, arouses a great biotechnological interest in different fields such as bioremediation, biofuels production, bioconversion of raw materials or organic synthesis.

In collaboration with Biotechnology for the Lignocellulosic Biomass group at Biological Research Center (CSIC), in this thesis we have solved the structures of two fungal dye-decolorizing peroxidases from white-rot basidiomycetes: DyP1 from *Auricularia auricula-judae* and DyP4 from *Pleurotus ostreatus*.

Previous crystallographic and kinetic studies of DyP1 from *A. auricula-judae* have reported the structures of wild type enzyme and several variants. This work reveals that the oxidation of bulky substrates is produced by surface exposed aromatic residues, tyrosine and tryptophan, and mediated by a long-range electron transfer. The purpose of this work is to increase the accessibility of the small substrates to heme pocket, by engineering the heme access channel. In order to obtain a better access to this heme cofactor, mutants L357G and F359G were designed. All of wild types and mutant enzymes were cloned into the pET23a vector and expressed in *Escherichia coli*. The "In vitro" refolding of these proteins is required before purification by ion exchange chromatography. Afterwards kinetic and computational analysis were performed, and visually high-quality crystals were obtained in the crystallization experiments. Then diffraction patterns were collected using synchrotron radiation and maximum resolution was obtained in the diffraction data of F359G variant that achieves 1.1Å resolution.

The structures were solved by molecular replacement allowing to verify that the global characteristic topology of the DyP family is conserved. The structure is formed by two domains, each of them include α -helices and antiparallel β -strains, these β -sheets of each domain are packed against each other, forming a β -barrel. The enzyme mutations cause a heme pocket enlargement, more significant in the F359G variant while in L357G variant a wider channel opening at the protein surface was observed. These results together with those obtained in catalytic activity assays and computational simulations indicate that the direct sulfoxidation capacity of the F359G variant is due a better access of the substrates to the reactive heme cofactor, showing more favorable interaction energies. In addition, studies of the sulfoxidation reaction products shows that F359G is highly stereoselective with up to 99% excess of the S enantiomer.

DyP4 produced by *P. ostreatus* is able to oxidize Mn^{2+} to Mn^{3+} in the presence of H_2O_2 . The catalytic efficiency of this reaction is similar to the one reported in manganese peroxidases (MnP) and in versatile peroxidases (VPs) from this and other white-rot fungi members. To identify the electron transfer pathway involved in the manganese oxidation and due to the absence of a structural model, a set of mutants was designed: E190A, F194W, F194Y, D196A, D215A, Y339A, E345A, D352A, D354A, D352A/D354A and E345A/D352A/D354A. These variants present mutations in aromatic and acidic residues

(phenylalanine, tyrosine, aspartic or glutamic acids) that are located in the heme propionates environment. All variants and the wild-type enzyme were cloned into pET15b vector adding a His-tag at the N-terminal end, followed by their expression in *E. coli* and their purification by affinity chromatography (Ni-NTA column). Crystals of wild-type *Pleos*DyP4 and four of its mutants (E190A, F194W, F194Y and D196A) were obtained by vapour diffusion experiments and the diffraction patterns were collected using synchrotron radiation.

The structures were solved by molecular replacement; it allowed the identification of two domains formed by α -helices and antiparallel β -strains that adopt a ferredoxin-like folding with the heme cofactor located at the C-terminal domain. Co-crystallization experiments with manganese have allowed to identify its union site in the surface of protein. This information in addition to the catalytic activity assays and the computational simulations, establish that E345 is involved in the initial electron transfer from Mn^{2+} to Y339.

To summarize, the structures of two variants of DyP1 from *A. auricula-judae*, L357G and F359G in addition to catalytic activity studies and computational simulations have allowed to determine the sulfoxidation mechanism of thioanisole (methyl phenyl sulfide) and methyl *p*-tolyl sulfide. Likewise, high stereoselectivity has been reported in F359G mutant with possible applications in organic synthesis.

With reference to DyP4 from *P. ostreatus*, the first structural models have been obtained allowing to characterize the molecular mechanism involved in Mn^{2+} oxidation, this skill has not been reported before for any other fungal DyP. These structural models provide the basis for the most recent research on new fungal DyP in which manganese oxidation is reported.

RESUMEN

RESUMEN

Las hemo peroxidasas son proteínas que catalizan reacciones de óxido-reducción de una gran variedad de sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas de tipo DyP, también denominadas peroxidasas decolorantes de tinte (“*dye-decolorizing peroxidases*”), son hemo peroxidasas presentes en bacterias, arqueas, protistas y hongos, con una gran diversidad de secuencia. Estas enzimas se caracterizan por su gran estabilidad frente a las condiciones más extremas de pH, temperatura y presión. Catalizan la oxidación de sustratos muy variados entre los que se encuentran compuestos poco biodegradables como la lignina o los colorantes antraquinónicos y azoicos, actividad que da nombre a este peculiar grupo. Su gran estabilidad y su actividad catalítica frente a sustratos poco biodegradables ha suscitado un gran interés en el campo de la biotecnología, con aplicaciones en ámbitos tan variados como la biorremediación de medios contaminados por residuos industriales, la producción de biocombustibles, el tratamiento de materias primas para uso industrial o la síntesis orgánica de compuestos.

En esta tesis, en colaboración con el grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), se han resuelto las estructuras de dos enzimas fúngicas de hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca, pertenecientes a las peroxidasas de tipo DyP: DyP1 de *Auricularia auricula-judae* y DyP4 de *Pleurotus ostreatus*.

En estudios previos de DyP1 de *A. auricula-judae* se resolvieron las estructuras de la enzima nativa y de una serie de mutantes que, junto a los ensayos de actividad enzimática, permitieron determinar la ruta de transferencia electrónica de largo alcance desde residuos aromáticos de la superficie (triptófano y tirosinas) hasta el grupo hemo para la oxidación de sustratos voluminosos. Con esta información decidimos diseñar mutaciones que afectaran al canal de acceso al grupo hemo, con el objetivo de hacer más accesible este bolsillo y permitir el paso de sustratos poco voluminosos. Para ello, se diseñaron dos mutantes L357G y F359G ubicados en la entrada del canal. La enzima nativa y sus dos mutantes se clonaron en el vector pET23a, se expresaron en *E. coli* y se purificaron, previo replegado “*in vitro*”, mediante cromatografía de intercambio iónico. Se realizaron análisis cinéticos y computacionales, y en los ensayos de cristalización se obtuvieron cristales de calidad suficiente para acometer su resolución estructural. Se recogieron los datos de difracción empleando radiación sincrotrón, alcanzándose en el caso del mutante F359G una resolución de 1.1 Å.

Las estructuras se resolvieron mediante reemplazo molecular, pudiéndose comprobar que todas ellas conservan la topología característica de las DyPs, con dos dominios que contienen hélices α y láminas β antiparalelas que forman un barril β . Los cambios más notables se observaron en la región donde se introdujeron las mutaciones con una ampliación del bolsillo hemo, más significativo en el mutante F359G mientras que para L357G se observó un aumento en el diámetro del canal de acceso a la cavidad. Estos resultados, junto con los obtenidos en los ensayos de actividad enzimática y las simulaciones computacionales, han podido explicar que la capacidad de sulfoxidación del mutante F359G se produce por un mejor acceso del sustrato al cofactor hemo, con unas energías de interacción más favorables. Además, el análisis de los productos de esta reacción de sulfoxidación muestra la alta estereoselectividad observada para el mutante F359G, con hasta un 99% de exceso del enantiómero S.

La peroxidasa de tipo DyP (DyP4) de *P. ostreatus* cataliza la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , en presencia de H_2O_2 , con una eficiencia similar a la descrita en peroxidasas de

manganeso (MnPs) y peroxidasas versátiles (VPs) de éste y otros hongos de podredumbre blanca. Como no se disponía de ningún modelo estructural, con el objetivo de identificar la ruta de transferencia electrónica implicada en la oxidación del manganeso se abordó la resolución de la estructura tridimensional de la enzima DyP4 en su forma nativa, y se diseñó una batería de mutantes basados en la información estructural disponible de peroxidasas que presentan esta actividad enzimática. Las mutaciones afectan a residuos aromáticos (fenilalanina y tirosina) y residuos ácidos (aspárticos y glutámicos): E190A, F194W, F194Y, D196A, D215A, Y339A, E345A, D352A, D354A, D352A/D354A y E354A/D352A/D354A. Estos mutantes y la enzima nativa se clonaron en el vector pET15b, que añade una cola de histidinas en el extremo N-terminal, se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad (columna de Ni-NTA). Se obtuvieron cristales de la proteína nativa *PleosDyP4* y de cuatro de los mutantes (E190A, F194W, F194Y y D196A) mediante técnicas de difusión de vapor y se recogieron los datos de difracción empleando radiación sincrotrón.

Las estructuras se resolvieron por reemplazamiento molecular, permitiendo la identificación de dos dominios que contienen hélices α y láminas β antiparalelas, que adoptan un plegamiento tipo ferredoxina, el cofactor hemo se aloja en el dominio C-terminal. Ensayos de cocristalización con manganeso han permitido establecer su sitio de unión en la superficie enzimática. Esta información junto a los resultados obtenidos en los ensayos de actividad y simulaciones computacionales confirman la importancia del E345 y la Y339 en la transferencia de electrones inicial del Mn^{2+} .

En conclusión, en este trabajo se presentan las estructuras de dos mutantes (L357G y F359G) de la enzima DyP1 de *A. auricula-judae* que, junto a ensayos de actividad enzimática y simulaciones computacionales, han permitido determinar el mecanismo de reacción de sulfoxidación del tioanisol (metil-fenil sulfuro) y del metil *p*-tolil sulfuro. Además, se ha observado una alta estéreo selectividad del mutante F359G, actividad con posibles aplicaciones en síntesis orgánica de valor añadido.

En el caso de DyP4 de *P. ostreatus* se han obtenido los primeros modelos estructurales que han permitido caracterizar el mecanismo molecular implicado en la oxidación de Mn^{2+} de la primera DyP fúngica que presenta esta actividad. Los modelos estructurales pueden servir de base a los estudios más recientes, realizados en nuevas DyP fúngicas en las que se está reportando actividad frente a manganeso.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En esta tesis hemos caracterizado peroxidasas de tipo DyP (“*dye decolorizing peroxidases*”), de dos especies de hongos basidiomicetos: *Auricularia auricula-judae* y *Pleurotus ostreatus*, que producen un tipo de degradación denominada podredumbre blanca de la madera.

Las peroxidasas son enzimas presentes en todos los seres vivos. Son óxido-reductasas que utilizan distintos peróxidos para catalizar reacciones de oxidación de sustratos muy variados (Dunford and Stillman 1975). Participan en infinidad de procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo, la defensa y la detoxificación entre otros. Este grupo se divide en dos grandes familias sin relación evolutiva entre sí, las que presentan un cofactor hemo o hemo peroxidasas, y las que no lo presentan, denominadas no-hemo peroxidasas (Fawal et al. 2013).

1. HEMO PEROXIDASAS:

Las hemo peroxidasas, son enzimas ubicuas, que participan en numerosos procesos biológicos entre los que destacan la síntesis y degradación de biomasa, la respuesta inmune, la patogenicidad y la detoxificación celular. Se caracterizan por contener un grupo prostético hemo de tipo B (hierro protoporfirina IX) representado en la **Figura 1**. El centro del cofactor presenta un átomo de Fe (III) pentacoordinado con los nitrógenos del anillo tetrapirrólico de la porfirina y el nitrógeno de una histidina axial situada en su cara proximal, que estabiliza el grupo hemo. El sexto ligando varía a lo largo del ciclo catalítico.

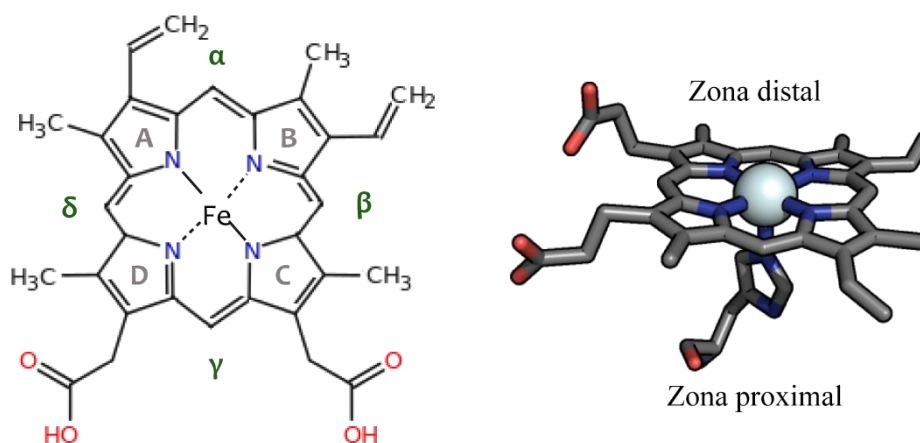


Figura 1. Representación del grupo hemo tipo B (hierro protoporfirina IX). Presenta dos grupos vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), dos propionatos ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) y cuatro grupos metilo. Se indican sus distintas caras (α , β , γ y δ) y sus anillos pirrólicos (A, B, C y D). En la imagen de la derecha se muestra la pentacoordinación del grupo hemo con los nitrógenos pirrólicos y la histidina proximal.

Los grupos propionato interactúan con residuos cercanos formando puentes de hidrógeno que determinan el posicionamiento del grupo hemo. Estos residuos, junto a la histidina proximal, fijan la porfirina a la enzima. Este grupo suele situarse en el “*core*” de la enzima, en el denominado bolsillo hemo que presenta un número variable de canales, de mayor o menor diámetro, para el acceso de los diferentes sustratos.

1.1. MECANISMO CATALÍTICO:

Las hemo peroxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para producir la oxidación de los sustratos en dos pasos secuenciales (Welinder 1992) siguiendo el ciclo catalítico que se muestra en la **Figura 2**.

Inicialmente, la enzima reacciona con un equivalente de H_2O_2 ocupando la sexta posición de coordinación del Fe (III) en una reacción de óxido-reducción de dos electrones, en la que el H_2O_2 es reducido a H_2O . Esta da lugar al primer intermediario de la reacción con la formación de un centro oxoferrilo ($\text{O}=\text{Fe}[\text{IV}]$), con el átomo de oxígeno procedente del H_2O_2 , y un radical catiónico π porfirínico ($+ \bullet$) en la mayoría de las peroxidasas, o aminoacídico como en las peroxidasas tipo VP o LiP donde el radical queda ubicado en un triptófano. Este complejo intermedio se denomina compuesto I.

El compuesto I puede oxidar una molécula de sustrato (RH) mediante transferencia electrónica, formándose un radical del sustrato ($\text{R}\bullet$) y se libera un protón. Con la oxidación del sustrato se forma el compuesto II con el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ coordinado a la porfirina, que recupera su electrón. Finalmente, el compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato y la enzima retorna a su estado de reposo.

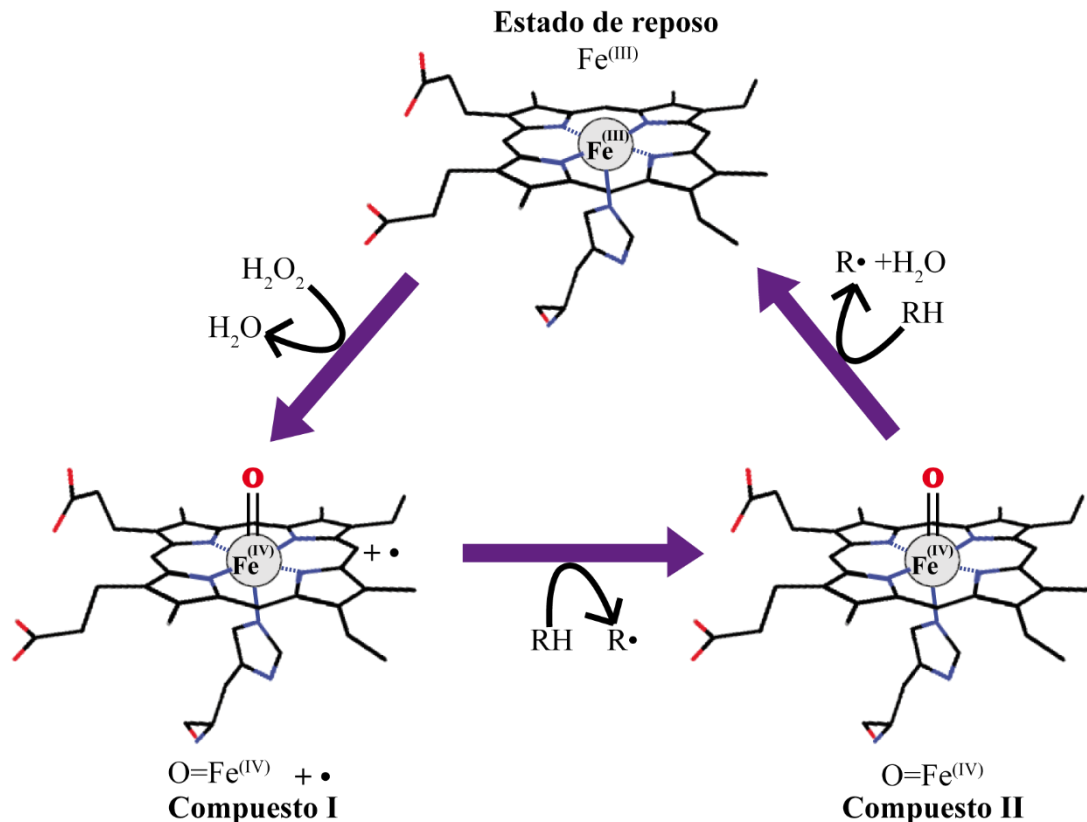


Figura 2. Ciclo catalítico del cofactor hemo B. En estado de reposo el grupo hemo Fe (III) reacciona con H_2O_2 produciendo un centro oxiferrilo $\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})$ combinado con un radical porfirínico o aminoacídico ($+ \bullet$). Este último radical oxida una molécula de sustrato (RH) formando el compuesto II ($\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})$). La oxidación de la segunda molécula de sustrato hace que el grupo hemo vuelva a su estado de reposo.

Los residuos del entorno distal del grupo hemo que participan en la desprotonación y posterior ruptura heterolítica del enlace O–O del H₂O₂, varían de unas familias a otras. En las catalasas y ciclooxigenasas son una histidina y una arginina, en hemo peroxidasas de clase II una histidina y una arginina y en las peroxidasas de tipo DyP una arginina y un aspártico (Zamocky et al. 2015). El tipo de aminoácidos presente en la zona distal del grupo hemo puede determinar la accesibilidad de determinados sustratos al centro activo.

1.2. HEMO PEROXIDASAS FÚNGICAS Y PEROXIDASAS DE TIPO DYP:

Los hongos de podredumbre blanca son los organismos más eficientes en la degradación de biopolímeros recalcitrantes como la lignina (Welinder 1992). Para ello secretan peroxidasas de alto potencial redox que catalizan reacciones de oxidación, generando radicales libres o cationes reactivos, que a su vez oxidan lignina, sustratos húmicos y compuestos tóxicos (Liers et al. 2012). Estas enzimas son hemo peroxidasas que pertenecen a la superfamilia de las peroxidasas no animales que abarca distintas clases. La clase II está formada por peroxidasas fúngicas de secreción y se divide en cuatro familias: las lignina peroxidasas (LiP), las peroxidasas dependientes de manganeso o manganeso peroxidasas (MnP), las peroxidasas genéricas (GP) y las peroxidasas versátiles (VP) (Fawal et al. 2013; Zamocky et al. 2014).

Así, la clase II está formada por enzimas exclusivas de hongos basidiomicetos productores de podredumbre blanca, como las lignina peroxidasas responsables de la despolimerización en la degradación de la lignina (Glenn et al. 1983; Tien and Kirk 1983); las manganeso peroxidasas que oxidan el manganeso (II) generando iones (Mn³⁺) que difunden fácilmente en la estructura de la lignocelulosa aumentando así la biodegradación de lignina (Janusz et al. 2017); y las peroxidasas versátiles que combinan la capacidad catalítica de los otros componentes de esta clase (Ruiz-Dueñas et al. 1999). El cuarto tipo lo forman las peroxidasas genéricas (GP) que incluyen peroxidasas no-ligninolíticas de bajo potencial redox capaces de oxidar fenoles sencillos, como la peroxidasa de *Coprinopsis cinerea* (CiP) (Baunsgaard et al. 1993)

Las peroxidasas de tipo DyP, pese a una presencia significativa en basidiomicetos lignolíticos, constituyen una nueva clase ya que no presentan relaciones filogenéticas ni estructurales con el resto de hemo peroxidasas. Los análisis de las secuencias nucleotídicas de distintos representantes de esta clase y la presencia de estas enzimas en bacterias termófilas anaerobias facultativas del filo firmicutes o endobacteria, sugieren que las DyP se diversificaron a partir de estos organismos, a hongos y eucariotas inferiores (Zamocky et al. 2015)

La clasificación actual se describe en la base de datos Peroxibase, también denominada Redoxibase (Fawal et al. 2013) y se detalla en la **Figura 3**.

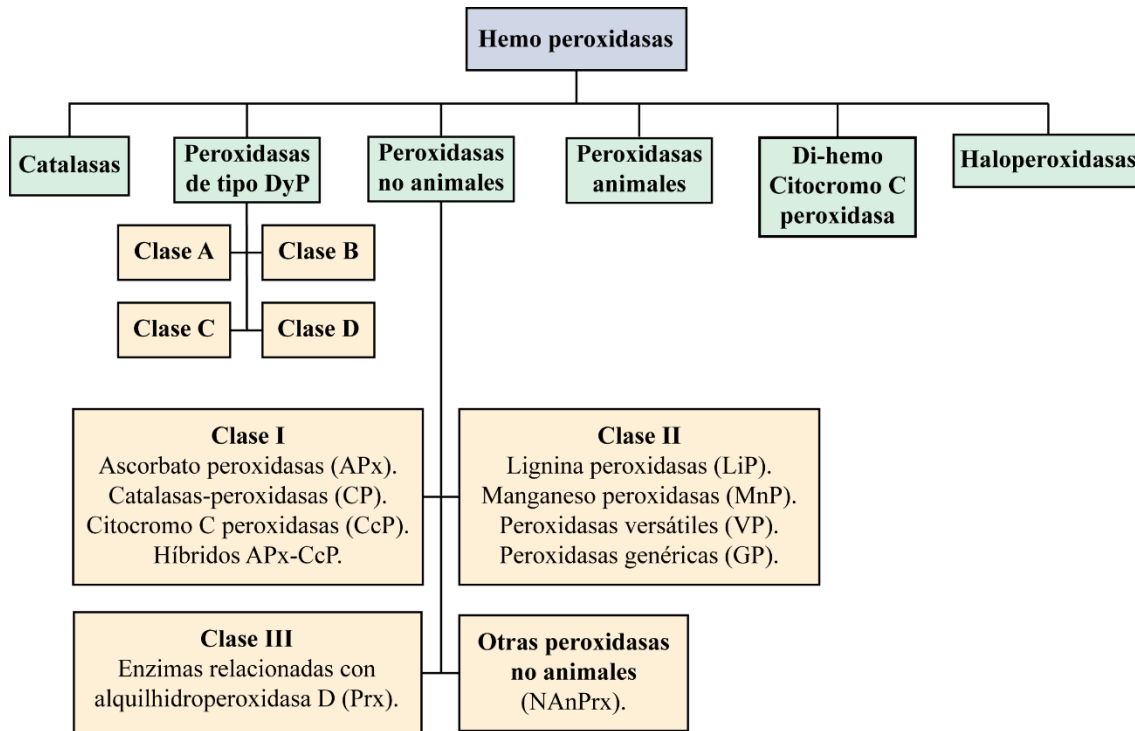


Figura 3. Clasificación de las hemo peroxidasas según Peroxibase (Fawal et al. 2013).

Pese a las diferencias mencionadas, las peroxidasas de clase II y las DyP también presentan convergencias en su actividad catalítica con sustratos comunes como los compuestos modelo de lignina o los colorantes (Brown et al. 2012; Fernández-Fueyo et al. 2015; Linde, Ruiz-Dueñas, et al. 2015). En algunos miembros de peroxidasas de tipo DyP, se ha descrito un sitio de unión a manganeso (Mn^{2+}) (Brown et al. 2012; Fernández-Fueyo et al. 2015; Rahmanpour and Bugg 2015), al igual que en las MnP y las VP (Ruiz-Dueñas et al. 2008). Además, en VPs, LiPs y algunos representantes de las peroxidasas de tipo DyP se ha descrito que la oxidación superficial de algunos sustratos voluminosos está mediada por una cadena de transferencia electrónica. Dicha cadena comienza en un radical triptofanilo superficial y finaliza en el grupo hemo (Perez-Boada et al. 2005; Ruiz-Dueñas et al. 2008; Linde, Pogni, et al. 2015; Shrestha et al. 2016).

2. ANTECEDENTES ESTRUCTURALES:

Teniendo en cuenta las similitudes en la actividad enzimática de las peroxidasas de clase II y las de tipo DyP mostramos una comparación estructural en la **Figura 4**.

Por un lado, las peroxidasas de clase II son proteínas globulares constituidas preferentemente por hélices α , repartidas en dos dominios α bien diferenciados. El grupo hemo se posiciona en la cavidad central definida por los dos dominios (**Figura 4A**). Todas ellas contienen puentes disulfuro que confieren rigidez a la estructura y dos sitios de unión a calcio. Se caracterizan por la presencia de una histidina en la zona proximal del grupo hemo y los residuos catalíticos de la cara distal son una histidina y una arginina (**Figura 4B**) (Blodig et al. 2001; Perez-Boada et al. 2005; Fernández-Fueyo et al. 2014).

Por otro lado, las peroxidasas de tipo DyP presentan dos dominios que contienen hélices α y láminas β antiparalelas, a diferencia de las peroxidasas de clase II que son

fundamentalmente proteínas α -helicoidales. El plegamiento es similar a la ferredoxina, con una lámina β central y el grupo hemo está ubicado en el dominio C-terminal (**Figura 4D**). No contienen iones calcio ni puentes disulfuro, a diferencia de las peroxididasas de clase II. Los residuos del entorno del grupo hemo son una histidina proximal conservada y, en la zona distal, una arginina y un ácido aspártico, éste último reemplaza a la histidina distal de las peroxididasas de clase II (**Figura 4C**) (Sugano et al. 2007; Rahmanpour and Bugg 2016).

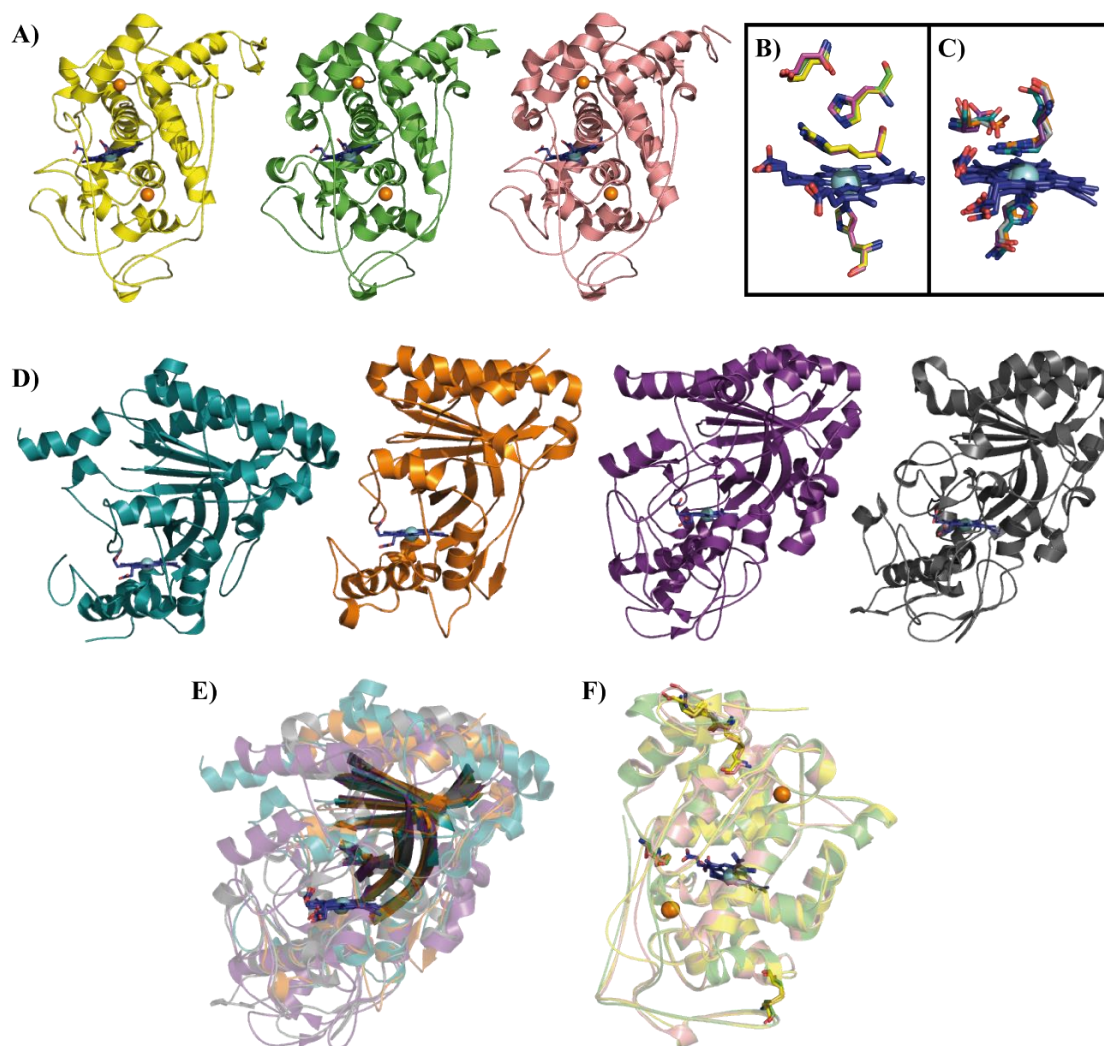


Figura 4. Comparación estructural de peroxididasas ligninolíticas. **A)** Estructuras de LiP de *Phanerochaete chrysosporium* (código PDB: 1B85, en amarillo) (Blodig et al. 2001), MnP4 de *P. ostreatus* (código PDB:4BM1, en verde) (Fernández-Fueyo et al. 2014) y VP1 de *P. ostreatus* (código PDB: 4BLK, en rosa) (Fernández-Fueyo et al. 2014). Los iones Ca^{2+} estructurales, se representan como esferas naranjas. **B)** Detalle del entorno del grupo hemo de las peroxididasas de la clase II. **C)** Detalle de la arginina y ácido aspártico distales y la histidina proximal del centro activo en DyPs. **D)** Estructuras de peroxididasas de tipo DyP: *TfuDyP* de *T. fusca* (código PDB: 5FW4, en cian) de la clase A (Rahmanpour et al. 2016), TyrA de *Shewanella oneidensis* (código PDB: 2IIZ, en naranja) representante de la clase B (Zubieta et al. 2007), DyP2 de *Amycolatopsis sp.* (código PDB: 4G2C, en morado) de la clase C (Brown et al. 2012) y DyP de *B. adusta* (código PDB: 2D3Q, en gris) perteneciente a la clase D (Yoshida et al. 2011). **E)** Superposición de las estructuras de las distintas clases de DyPs destacando el barril β central. **F)** Superposición de los modelos estructurales de LiP, MnP4 y VP1 destacando los puentes disulfuro y los iones Ca^{2+} estructurales.

Asimismo, Goblirsch y *col.* propusieron una nueva clasificación para peroxidadas que, pese a su gran diversidad de secuencia, abarcara enzimas con una arquitectura similar, incluyendo en esta superfamilia a las clorito dismutasas (Cld), las peroxidadas de tipo DyP y los miembros de la superfamilia estructural EfeB (Goblirsch et al. 2011). A este grupo se le denominó “CDE”, acrónimo de las tres familias bien caracterizadas que contienen el grupo hemo: Clds (clorito dismutasas), DyPs y EfeBs (una contracción de *Escherichia coli* y Fe). Posteriormente las enzimas EfeB fueron incluidas dentro de las peroxidadas de tipo DyP, y la superfamilia CDE pasó a denominarse peroxidasa–clorito dismutasa (Zamocky et al. 2015).

Esta superfamilia se caracteriza por la presencia de un núcleo central con plegamiento de barril β (“ β -barrel”), similar a la ferredoxina, formado por láminas β antiparalelas. Otros elementos estructurales característicos son la posición del bolsillo hemo, ubicado en el dominio C-terminal y su peculiar arquitectura formada por α -hélices en el plano proximal de la porfirina, con una histidina estrictamente conservada, mientras la zona distal está formada por la lámina- β central en la que se posiciona la arginina que interacciona con el grupo hemo (**Figura 5**) (Goblirsch et al. 2011).

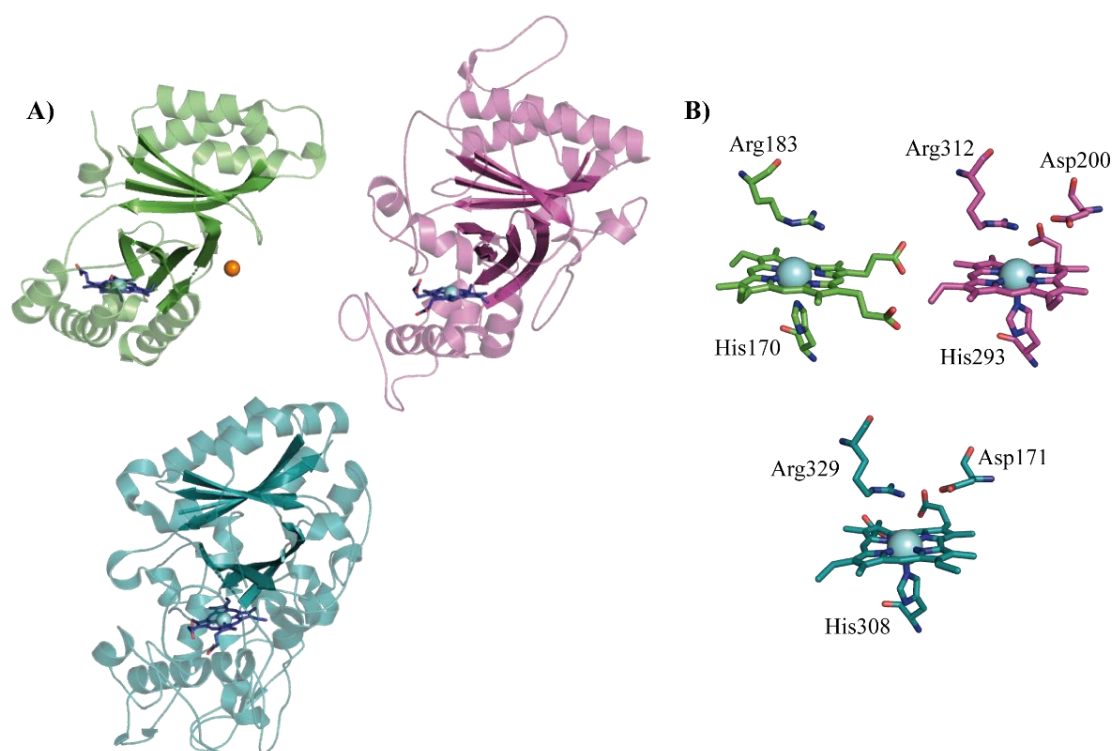


Figura 5. Estructuras de los miembros representativos de la superfamilia peroxidasa–clorito dismutasa. A) Estructuras de DA–Cld de *Dechloromonas aromatica* (código PDB:3Q08, en verde) (Goblirsch et al. 2010), hemo–EfeB de *E. coli* (código PDB:3O72, en magenta) (Liu et al. 2011) y DyP de *B. adusta* (código PDB:2D3Q, en cian) (Yoshida et al. 2011), destacando los motivos estructurales característicos de la familia. B) Detalle del grupo hemo, en la cara distal se encuentra la arginina y en la zona proximal una histidina estrictamente conservada. En la cara distal de EfeB y DyP hay un ácido aspártico, ausente en DA–Cld.

Pese a los elementos comunes, esta familia también presenta diferencias estructurales entre sus componentes, como la arquitectura en la zona distal y el posicionamiento del

cofactor hemo como puede apreciarse en la **Figura 5**. En la zona distal del grupo hemo se encuentra la región interdominios con una estructura secundaria más laxa (“loop”) donde se dispone el aspártico adicional en EfeB (Liu et al. 2011) y DyP (Yoshida et al. 2011). En la clorito dismutasa DA-Cld (Goblirsch et al. 2010) esta zona interdominios presenta una hélice con una posición alejada del grupo hemo, lo que implica la ausencia de este aspártico en el centro activo. En cuanto a la disposición del grupo hemo, en la estructura de DA-Cld de *D. aromatica*, los grupos propionato presentan una rotación de 90° en el plano de la porfirina con respecto a su posición en las estructuras de EfeB (Liu et al. 2011) y DyP de *B. adusta* (Yoshida et al. 2011). Esta disposición del grupo hemo provoca un cambio en la red de puentes de hidrógeno que se establece con los residuos de la cadena polipeptídica.

3. CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS PEROXIDASAS DE TIPO DYP:

3.1. ACTIVIDAD CATALÍTICA Y APLICACIONES:

Las DyPs forman una clase muy diversa de enzimas presentes en hongos, mixomicetos, bacterias y arqueas (Fawal et al. 2013). El papel fisiológico que desempeñan todavía es incierto, aunque hay evidencias de su participación en la respuesta frente a estrés oxidativo y en la degradación de la biomasa (Liers et al. 2012).

Los componentes de esta familia son activos a pHs ácidos (pH 3 – 4), elevadas temperaturas (entre 50 – 67°C) y alta presión (8 – 10 kbar) (Liers et al. 2009; Puhse et al. 2009; Linde et al. 2014). Su masa molecular (43 – 69 kDa) está dentro del rango de las hemo peroxidasas, aunque es superior a la de peroxidasas de clase II (40 – 50 kDa). Presentan una baja especificidad de sustrato, oxidando compuestos muy variados (Sugano 2009). Estas características generan un gran interés desde el punto de vista biotecnológico con aplicaciones en los diferentes ámbitos que se describen a continuación.

El nombre de este grupo proviene de su capacidad de decolorar tintes ácidos y dispersivos. Las DyPs son capaces de oxidar colorantes antraquinónicos de elevado potencial redox, azoicos y carotenoides (Kim and Shoda 1999; Sugano et al. 2000; Fernández-Fueyo et al. 2015). Estos colorantes son muy comunes en la industria textil y papelera, por lo que esta familia podría desempeñar un papel importante en el tratamiento de efluentes de estas industrias.

Se ha descrito que las peroxidasas de tipo DyP oxidan compuestos modelo de lignina como el alcohol veratrílico (Brown et al. 2012) y compuestos relacionados como el 2,6-dimetoxifenol (DMP) y el guaiacol entre otros (Roberts et al. 2011; Liers et al. 2012), participando en el sistema biocatalítico degradador de la lignina (Janusz et al. 2017). Sin embargo, existen ciertas dudas sobre su actividad lignolítica ya que las DyPs fúngicas tienen una actividad extremadamente baja sobre dímeros modelo no fenólicos de lignina, aunque son capaces de oxidar los modelos fenólicos, de acuerdo con su actividad sobre fenoles simples y colorantes (Linde et al. 2014; Linde, Ruiz-Dueñas, et al. 2015). En la industria papelera se aplican métodos de deslignificación en los que se podrían incluir estas enzimas, evitando la utilización de sustancias químicas y reduciendo la energía empleada en obtener la pasta de celulosa. También podrían emplearse en procesos de bioconversión en biorrefinerías de lignocelulosa (Fernández-Fueyo et al. 2014; Huang et al. 2017).

Por otro lado, se ha descrito la sulfoxidación enantioselectiva de sulfuros fenólicos catalizada por una peroxidasa de tipo DyP de *Thermobifida fusca* (Van Bloois et al. 2010). La sulfoxidación enantioselectiva tiene una gran importancia en síntesis orgánica, al producir sulfóxidos quirales que debido a su alta especificidad óptica, catalizan la estereoquímica en transformaciones asimétricas (Fernández and Khiar 2003). En otros grupos de peroxidasas, como en la peroxidasa de rábano (HRP), también se han descrito reacciones de sulfoxidación e hidroxilación enantioselectivas (Ortiz de Montellano et al. 1995; Rantwijk and Sheldon 2000). Entre las enzimas de interés para la sulfoxidación asimétrica se encuentran las flavoenzimas (Van Berkel et al. 2006), incluidas las monooxigenasas de Baeyer–Villiger, las hemo peroxidasas y las monooxigenasas del citocromo P450 (Hrycay and Bandiera 2012). La modificación de la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) es uno de los ejemplos más característicos de la eficacia de la evolución dirigida (Reetz et al. 2010). Un claro ejemplo de su aplicabilidad biotecnológica es la producción enzimática del omeprazol, un fármaco muy demandado que genera grandes beneficios, en cuya síntesis interviene una CHMO modificada (Matsui et al. 2014).

3.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES:

Las peroxidasas de tipo DyP presentan una gran diversidad de secuencia pero comparten un mismo mecanismo de oxidación utilizando H_2O_2 como aceptor de electrones y su especificidad por sustratos, como los colorantes antraquinónicos (Sugano 2009; Hofrichter et al. 2010).

Se han publicado dos clasificaciones diferentes para esta familia de enzimas. Según la base de datos Peroxibase (Fawal et al. 2013) éstas pueden clasificarse en cuatro clases (A, B, C y D) en función de su secuencia y sus características bioquímicas:

➤ Clase A: compuesta principalmente por proteínas de origen bacteriano. Presentan una secuencia señal que contiene un motivo de translocación tipo Tat (“twin arginine translocation”) para su secreción al espacio periplasmático (Sturm et al. 2006; Santos et al. 2014). Pueden extraer el hierro del grupo hemo preservando el anillo de tetrapirrol intacto (Letoffe et al. 2009). En uno de sus componentes, TfuDyP (código PDB:5FW4) de *Thermobifida fusca*, se ha descrito la sulfoxidación enantioselectiva de sustratos (Rahmanpour et al. 2016).

➤ Clase B: abarca enzimas bacterianas, de eucariotas inferiores y de ascomicetos. Forman operones con el gen codificante para la enzima y un gen que codifica encapsulinas. Al expresarse forman cápsulas icosaédricas estables que permiten el paso de moléculas pequeñas como el H_2O_2 (Sutter et al. 2008). Presentan actividad oxidativa residual de Mn^{2+} y actividad ligninolítica mediada por una cadena de transferencia electrónica (Roberts et al. 2011). Tyr A (código PDB:2IIZ) de *Shewanella oneidensis*, es uno de los representantes de esta clase (Zubieta et al. 2007).

➤ Clase C: enzimas bacterianas y de basidiomicetos, filogenéticamente cercana a la clase D. Catalizan la oxidación de Mn^{2+} dependiente de H_2O_2 y también producen oxidación de sustratos dependiente de Mn^{2+} (Brown et al. 2012). Uno de los miembros de esta clase es DyP2 (código PDB:4G2C) de *Amiclatopsis sp.* (Brown et al. 2012).

➤ Clase D: mayoritariamente presentes en hongos basidiomicetos (Yoshida and Sugano 2015). Presentan cierta actividad catalítica frente a compuestos modelo no fenólicos de lignina (Liers et al. 2009; Liers et al. 2012). Este grupo abarca, entre otras,

las proteínas DyP de *Bjerkandera adusta* (código PDB: 2D3Q) (Yoshida et al. 2011), *AauDyP1* (código PDB: 4W7J) de *A. auricula-judae* (Liers et al. 2009; Linde, Pogni, et al. 2015) y *PleosDyP4* de *P. ostreatus* (Fawal et al. 2013).

Con la resolución de las estructuras de algunos de los componentes de estas clases, se definieron una serie de características estructurales comunes. Así, las peroxidases de tipo DyP presentan dos dominios similares a α , β -ferredoxina, dispuestos en una arquitectura de tipo α , β -sándwich. Cada dominio está formado por una lámina β con cuatro cadenas antiparalelas rodeadas de α -hélices. Las láminas β están enfrentadas entre sí formando un motivo de barril β en disposición “*up-and-down*” (Zubieta et al. 2007). En estas DyPs el propionato del pirrol D del grupo hemo se posiciona inclinado hacia la zona distal, debido a la formación de puentes de hidrógeno con los residuos altamente conservados de esta zona. Estos residuos son una arginina y el motivo (GXXDG). En la cara proximal del cofactor hemo se sitúa la histidina que actúa como ligando del átomo de hierro (Sugano 2009; Yoshida et al. 2011).

La clasificación más reciente fue propuesta por Yasushi Sugano y Toru Yoshida, está basada en análisis de las secuencias aminoacídicas realizados con MATRAS (Kawabata 2003) y en estudios de las estructuras terciarias de los distintos componentes de esta familia (Sugano 2009; Yoshida and Sugano 2015):

- Clase P o primitiva: abarca las DyPs bacterianas, de ascomicetos y eucariotas inferiores (clase B). Presentan una estructura terciaria compacta con dos accesos al grupo hemo, un canal situado en la zona distal y una apertura en la región de los grupos propionatos. En la superficie enzimática presentan una cavidad hidrofóbica que podría actuar como sitio de unión de sustratos voluminosos como la lignina (Roberts et al. 2011).
- Clase I o intermedia: DyPs bacterianas que componían la clase A. Conservan la secuencia aminoacídica de la clase P, con algunas secciones añadidas. Disponen de un gran lazo (“loop”) entre los dominios N y C-terminal, que sufre distintos cambios conformacionales para facilitar el acceso de los sustratos al centro activo de las enzimas (Liu et al. 2011).
- Clase V o avanzada: compuesta por las clases C y D de la peroxidase. Presentan mayor número de adiciones en su secuencia aminoacídica y una mayor eficiencia catalítica que las demás clases de esta familia. Comparten con la clase P la capacidad de oxidar sustratos voluminosos en la superficie proteica, mediante una cadena de transferencia electrónica.

En la **Figura 6** se muestran las estructuras de los representantes de las distintas clases, con los motivos conservados característicos de la familia de peroxidases de tipo DyP.

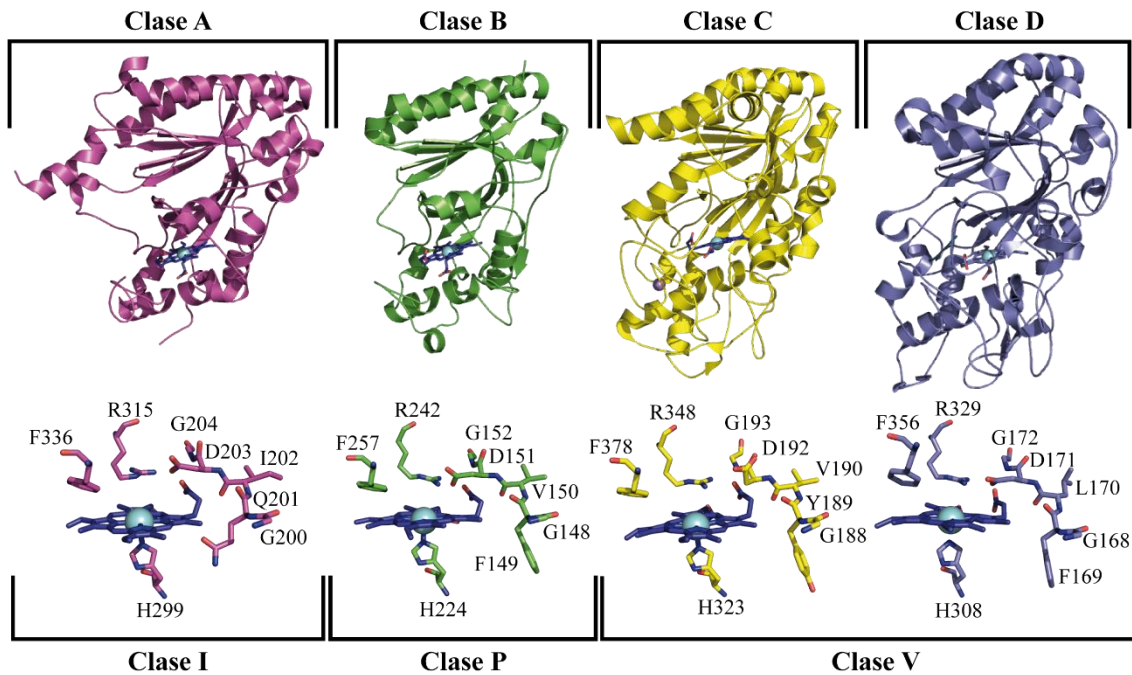


Figura 6. Clasificación de peroxidosas de tipo DyP según los dos modelos propuestos. Se muestran las estructuras de *TfuDyP* de *T. fusca* (código PDB: 5FW4, en magenta) (Rahmanpour et al. 2016), *TyrA* de *S. oneidensis* (código PDB: 2IIZ, en verde) (Zubieta et al. 2007), *DyP2* de *Amycolatopsis sp.* (código PDB:4G2C, en amarillo) (Brown et al. 2012) y *DyP* de *B. adusta* (código PDB: 2D3Q, en azul) (Yoshida et al. 2011). En la parte inferior se muestra el entorno del grupo hemo con los residuos característicos de la zona distal y proximal, y el motivo GXXDG.

4. ESTUDIOS PREVIOS:

4.1. PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE A. AURICULA–JUDAE:

En estudios genéticos realizados con la especie *A. auricula–judae* se observó la presencia de dos isoformas de un gen que codifican para dos variantes de la familia DyP (*Aau–dyp1* y *Aau–dyp2*). En esta tesis hemos trabajado con una secuencia de ADN sintético, que codifica para la proteína madura (CDS) *AauDyP1* (código GenBank: JQ650250) sintetizado por “ATG–biosynthetics” (Merzhausen, Alemania). Los codones se optimizaron previamente para su expresión en *E. coli*, obteniendo un gen con 1527 nucleótidos que codifica 509 aminoácidos.

Una de las características más valoradas en el ámbito biotecnológico es la estabilidad de las enzimas frente a valores extremos de presión, temperatura y pH. Esta enzima se mantiene estable en un rango de temperaturas de 30 – 65°C y mantiene más del 80% de su actividad en un rango de pH entre 3 – 9 (Jeske et al. 2019). Los pHs óptimos de oxidación varían entre 3 y 4.5, manteniendo una gran estabilidad frente a cambios de temperatura. A pHs básicos, sin embargo, la actividad se ve más influenciada por la temperatura. La glicosilación postraduccional de la proteína ejerce un papel importante en su estabilidad frente al pH (Liers et al. 2012).

En estudios cinéticos realizados con *AauDyP1* se obtuvo una gran eficiencia catalítica con valores de la constante k_{cat}/K_m en un rango de $10^7 – 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ frente a ABTS (2,2’–azino–bis [3–etilbenzotiazolin–6–sulfónico]), colorantes antraquinónicos (“*Reactive blue*

5”), DMP (2,6-dimetoxifenol) o colorantes azoicos (“*Reactive black 5*”). En el caso de los compuestos carotenoides (achiote) y el alcohol veratrílico, la eficiencia catalítica es significativamente menor con valores de $6.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $4.8 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Liers et al. 2009; Behrens et al. 2016).

En numerosos estudios llevados a cabo con enzimas de función similar, se han introducido mutaciones para modificar la actividad catalítica, como los realizados con el mutante F41L de peroxidasa de rábano (HRP) (Ozaki 1995; Savenkova et al. 1996) o en los que se evaluó el efecto del mutante W51L de la citocromo C peroxidasa (CcP) (Miller et al. 1992). En ellos, se comprobó que estas mutaciones producen una ampliación del canal de acceso al bolsillo hemo, que se traduce en un aumento de la eficiencia en la sulfoxidación de sustratos.

En este contexto, decidimos trabajar con mutantes que amplíen el canal de acceso al grupo hemo para evaluar su efecto sobre la actividad catalítica con sulfuros aromáticos poco voluminosos.

4.2. PEROXIDASAS DE TIPO DYP DE *P. OSTREATUS*:

Estudios genéticos en monocariontes (PC15) de la especie *P. ostreatus*, revelaron la presencia de cuatro genes que codifican peroxidasas de tipo DyP: *Pleos-dyp1* (código JGI: 62271), *Pleos-dyp2* (código JGI: 1092668), *Pleos-dyp3* (código JGI: 52170) y *Pleos-dyp4* (código JGI:1069077) (Ruiz-Dueñas et al. 2011). En esta tesis trabajamos con un gen sintético de *Pleos-dyp4* (código GenBank: KP973936), que se diseñó en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína madura depositada en la base de datos del “*JOINT GENOME INSTITUTE*” (JGI (Nordberg et al. 2014) y sintetizado por “*ATG-biosynthetics*” (Mezhausen, Germany). Este gen sintético está compuesto por 1515 nucleótidos que codifican para una enzima de 504 aminoácidos denominada *PleosDyP4* (Fernández-Fueyo et al. 2015).

PleosDyP4 es una enzima muy estable que mantiene el 80% de su actividad catalítica a pHs comprendidos entre 2 y 9, y conserva el 90% de su actividad catalítica a temperaturas entre 60 y 80° C. Presenta una actividad óptima a pHs ácidos con valores entre 2 y 5 dependiendo del tipo de sustrato (Fernández-Fueyo et al. 2015).

Esta enzima se caracteriza por ser la primera DyP fúngica identificada que cataliza la oxidación de Mn^{2+} , aunque presenta una eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}}/K_m = 1.96 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) un orden de magnitud inferior a las manganeso-peroxidasas y las peroxidasas versátiles (Fernández-Fueyo et al. 2014). Los sustratos sobre los que presenta mayor eficiencia catalítica son DMP ($k_{\text{cat}}/K_m = 2.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$), colorantes antraquinónicos (“*Reactive blue 19*”, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y ABTS ($k_{\text{cat}}/K_m = 3.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). En los estudios de actividad enzimática realizados con *PleosDyP4* no se detectó la oxidación de alcohol veratrílico (VA) ni de tintes carotenoides como el achiote (Fernández-Fueyo et al. 2014; Behrens et al. 2016).

La oxidación de Mn^{2+} se ha descrito en otras DyPs de origen bacteriano (*R. jostii*, *Amycolatopsis sp.* y *Pseudomonas fluorescens*), en dos de ellas se han detallado los mecanismos moleculares que intervienen en esta reacción. Mientras que en DyP B de *R. jostii* el Mn^{2+} accede al bolsillo hemo por una cavidad de carácter ácido que favorece su interacción con uno de los propionatos del grupo hemo (Roberts et al. 2011), en DyP2 de *Amycolatopsis sp.* la oxidación se realiza mediante una cadena de transferencia electrónica con un sitio de unión superficial de carácter ácido (Brown et al. 2012).

Con estos antecedentes decidimos caracterizar los elementos estructurales que intervienen en la oxidación de manganeso en *PleosDyP4*. Para ello, se diseñó una batería de mutantes basada en los residuos que intervienen en la oxidación de manganeso de las DyPs bacterianas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El gran interés biotecnológico e industrial de las peroxidasas de tipo DyP debido a su gran estabilidad, versatilidad catalítica y capacidad de oxidar diversos colorantes recalcitrantes o biopolímeros como la lignina, suscita nuevos planteamientos dirigidos a la modificación de las propiedades catalíticas de esta familia de enzimas.

El objetivo general planteado en esta Tesis Doctoral fue la caracterización estructural de dos peroxidasas de tipo DyP con el fin de comprender los mecanismos implicados en la sulfoxidación asimétrica en el caso de *AauDyP1* y en la oxidación del Mn^{2+} en *PleosDyP4*.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Sobreexpresar y purificar los mutantes L357G y F359G de *AauDyP1*, así como *PleosDyP4* nativa y una batería de mutantes seleccionados en estrecha colaboración con el grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica del CIB.
- Obtener cristales de tamaño y calidad suficientes que permitan la recogida de datos de difracción en instalaciones de radiación sincrotrón.
- Resolver las estructuras tridimensionales mediante el método de reemplazo isomorfo.
- Caracterizar los cambios estructurales en el bolsillo del grupo hemo para los mutantes de *AauDyP1* que nos permitan dilucidar si presentan estereoselectividad.
- Identificar el sitio de unión a Mn^{2+} en *PleosDyP4* y correlacionar los estudios estructurales con los ensayos cinéticos y computacionales.

MATERIALES & MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS MUTANTES PROTEICOS:

La purificación y los ensayos cinéticos, tanto de las proteínas nativas como de sus mutantes abordados en este trabajo, se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de Biotecnología para la Biomasa Lignocelulósica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), liderado por el profesor de investigación Ángel Tomás Martínez Ferrer. Las simulaciones computacionales se realizaron en colaboración con el departamento de modelado electrónico y atómico de proteínas del Centro Nacional de Supercomputación (BSC).

1.1. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE MUTANTES:

Se diseñaron mutaciones puntuales en diferentes regiones de estas enzimas. En DyP1 de *A. auricula-judae* (*AauDyP1*) se obtuvieron dos mutantes en la región de acceso al grupo hemo, con el objetivo de esclarecer su potencial actividad en procesos de sulfoxidación asimétrica. Con este fin, se mutaron dos residuos en la entrada del canal, la leucina 357 por una glicina (L357G) y la fenilalanina 359 por otra glicina (F359G).

Para la enzima de *P. ostreatus* (*PleosDyP4*) se diseñaron mutantes para identificar el/los potencial/es sitios de unión y oxidación del Mn^{2+} . Se diseñó una batería de mutantes simples: E190A, F194W, F194Y, D196A, D215V, Y339A, E345A, D352A, D354A y W405S. Además, se produjeron un doble mutante (D352A/ D354A) y un mutante triple (E345A/D352A/ D354A).

Para la obtención de los distintos mutantes se utilizó el método de mutagénesis dirigida (Kit de Stratagene's QuikChange), empleando oligonucleótidos solapantes con la mutación de interés (Linde et al. 2016). El clonaje de los mutantes de DyP1 de *A. auricula-judae* se realizó en el plásmido pET23a (Novagen), mientras que los mutantes de DyP4 de *P. ostreatus* se clonaron en el plásmido pET15b, ambos presentan un gen de resistencia a ampicilina.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los distintos mutantes en las reacciones de PCR.

Enzima	Mutante	Secuencia
<i>AauDyP1</i>	L357G	5'- CT CAG GAG CGC GGC <u>GGA</u> GCG TTT GTG GCA TAC-3'
	F359G	5'- CT CAG GAG CGC GGC CTT GCG <u>GGA</u> GTG GCA TAC-3'
<i>PleosDyP4</i> **	E190A	5'- C GCC CAT <u>GCA</u> CAC TTC GGC TTC CTC GAC GGT ATC TCC-3'
	F194W	5'- C GCC CAT GAA CAC TTC GGC <u>TGG</u> CTC GAC GGT ATC TCC-3'
	F194Y	5'- C GCC CAT GAA CAC TTC GGC <u>TAC</u> CTC GAC GGT ATC TCC-3'
	D196A	5'- C GCC CAT GAA CAC TTC GGC TTC CTC <u>GCC</u> GGT ATC TCC-3'

Enzima	Mutante	Secuencia
PleosDyP4 **	D215V	5'– C CCG CTC CCA GGT CAA <u>GTT</u> CCG ATC AGA CCG GGC–3'
	Y339A	5'– GCT GCT CAC ATC AGA AAG ACC <u>GCC</u> CCG CGC AAC GAT TTG GAG GGC CC–3'
	E345A	5'– C CCG CGC AAC GAT TTG <u>GCG</u> GGC CCG CC–3'
	D352A	5'– GGC CCG CCT TTG AAA GCT <u>GCT</u> ATT GAC AAC CG–3'
	D354A	5'– GG CCC GCC TTTG AAA GCT GAT ATT <u>GCC</u> AAC CGT AGA ATC ATC CGC–3'
	W405S	5'– C CAC TTC ATT CAG GAA TCT <u>TGG</u> GCC AAT GCC C–3'
	D352A/ D354A	5'– GGC CCG CCT TTG AAA <u>GCT</u> GCT ATT <u>GCC</u> AAC CGT AGA ATC ATC CGC–3'

Para la obtención del triple mutante E345A/D352A/D354A se utilizó el gen del doble mutante D352A/D354A, con los cebadores que se emplearon para el mutante E345A (Tabla 1**).

Los plásmidos recombinantes se transformaron en células de *E. coli* DH5 α , seleccionando las colonias transformadas en placas de Luria Bertani broth (LB)–agar suplementadas con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Se extrajo el ADN de los plásmidos seleccionados, cuantificándose en un NanoDrop y, posteriormente, se secuenciaron para comprobar la presencia de la mutación deseada en los plásmidos recombinantes (Servicio de Secuenciación CIB; SECUGEN).

1.2. EXPRESIÓN:

Una vez obtenidos los clonajes en sus plásmidos correspondientes, se introdujeron en células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, que presentan resistencia a cloranfenicol, para la posterior expresión de las enzimas recombinantes.

Para la expresión de las enzimas de *A. auricula-judae* se crecieron pre-cultivos en medio Luria Bertani (LB), suplementado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, durante toda la noche a 37°C con agitación. Estos cultivos se usaron para inocular 1 L de medio Terrific Broth (TB), con las mismas concentraciones de ampicilina y cloranfenicol, y se cultivaron a 37°C y 200 rpm durante 3 h, hasta que alcanzaron aproximadamente una densidad óptica a 600 nm de 0.6 ($\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0.6$). En este punto, se indujo la expresión de las diferentes construcciones con la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. La expresión del cultivo se dejó en las mismas condiciones durante 4 h más. Finalmente, las células se separaron mediante centrifugación.

En cuanto a la expresión de la enzima de *P. ostreatus* y sus mutantes, se crecieron las células transformadas en un medio autoinducible ZYM–5052 (Studier 2005) durante 60 h a 16°C, suplementado con 100 μM de hemina, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, posteriormente los cultivos se centrifugaron.

1.3. PURIFICACIÓN:

Las DyPs de *A. auricula-judae*, tras su expresión en *E. coli*, se acumularon en cuerpos de inclusión, se extrajeron mediante lisis celular por ultrasonidos (sonicación) en presencia de lisozima y a continuación se realizó el protocolo de solubilización y replegado descrito anteriormente por Linde y *col.* (Linde et al. 2014). Para ello, los cuerpos de inclusión se solubilizaron en una solución 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M urea, 1 mM EDTA y 1 mM DTT, y se incubaron durante 1 h a 4°C, centrifugándose para eliminar los restos celulares insolubles. Posteriormente, se hizo un plegamiento “*in vitro*” mediante diálisis frente a una solución 50 mM Tris-HCl (pH 6.0), 10 mM hemina y 0.2 M urea durante 6 días a 4°C para obtener la holoenzima activa. Tras la diálisis se centrifugaron las muestras, para eliminar proteína no plegada y finalmente se concentraron.

La purificación de DyP1 nativa de *A. auricula-judae* y de sus mutantes, se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico con una columna Resource Q (GE Healthcare). Las muestras se eluyeron en una solución 10 mM Tris-HCl (pH 7), con un gradiente de NaCl (0 – 0.3 M) y se recogieron aquellas fracciones que contenían DyP, identificadas por su absorbancia a 410 y 280 nm, para concentrarlas posteriormente. El correcto plegamiento de la enzima y sus mutantes se confirmó mediante el análisis de su espectro de absorbancia en 10 mM tartrato sódico (pH 5) y la concentración final se determinó utilizando el coeficiente de absorción molar ϵ_{405} 117000 M⁻¹ cm⁻¹.

Para las DyPs de *P. ostreatus*, las células decantadas tras la centrifugación, se resuspendieron en 100 mL de la solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM imidazol y 300 mM NaCl), suplementada con 2 mg mL⁻¹ de lisozima (Sigma-Aldrich) y DNasa I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Se sonicaron las muestras y posteriormente, se centrifugaron para separar los restos insolubles. Se concentró el sobrenadante por ultrafiltración (Amicon 10-kDa-cutoff; Millipore Pellicon).

La purificación se realizó en un equipo AKTA HPLC (GE Healthcare) con una columna HisTag (GE Healthcare) acoplada, a un flujo de 5 mL min⁻¹. Las proteínas, que gracias a su expresión en el vector pET15b presentan una cola de histidinas en el extremo N-terminal, quedan retenidas por afinidad por el Ni²⁺ inmovilizado en la resina. Se realizó un lavado con 3 volúmenes de columna (CV) (15 mL) del tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM imidazol, 300 mM NaCl), para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a la matriz y finalmente la elución de las DyP se realizó con un gradiente de 1 M imidazol (0 – 50%) en 5 CV. Las fracciones en las que eluyó la proteína se dializaron frente a 10 mM tartrato sódico (pH 5) y se concentraron (Fernández-Fueyo et al. 2018). Para comprobar la incorporación del grupo hemo se realizaron espectros UV-visible en los que se obtuvieron las bandas características de Soret a 406~407 nm y mediante el método piridin ferrihemicromo (Mendes et al. 2015). En ambos casos, se comprobó la pureza de las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

2. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS-X:

La estructura tridimensional de una proteína es fundamental para definir su organización intramolecular, su especificidad por distintos sustratos y para poder establecer relaciones filogenéticas entre distintas familias. Esta información resulta valiosa en ámbitos muy diversos, en los que puede aportar alternativas enzimáticas que

mejoren la eficiencia de las reacciones catalíticas o amplíen el rango de sustratos. Uno de los campos más destacados es el farmacéutico, más concretamente la síntesis de compuestos con potencial como medicamentos, donde son cruciales en la mejora del rendimiento en la síntesis de fármacos y en la búsqueda de compuestos potencialmente aptos para un determinado tratamiento.

Para la determinación de un modelo estructural mediante cristalografía de rayos-X, es necesario en primer lugar, disponer de la proteína con un alto grado de pureza y una concentración suficiente para llevar a cabo los ensayos de cristalización. El objetivo de estos ensayos es obtener cristales de proteína de un tamaño adecuado para realizar medidas por difracción de rayos-X. Para evitar el deterioro del cristal, generado al exponerlo a los rayos-X, se lleva a cabo una protección criogénica mediante soluciones crioprotectoras y posteriormente un enfriamiento rápido hasta 100 – 110°K, (Alcorn and Juers 2010).

2.1. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS:

El objetivo de estos experimentos es conseguir que la proteína de interés precipite lentamente creando una red tridimensional ordenada en todo el cristal (Rhode 1993). El método de cristalización utilizado, durante esta tesis, es la difusión de vapor. Consiste en mezclar pequeños volúmenes de una solución de proteína (0.1 – 0.5 μ L) con volúmenes idénticos o variables del agente precipitante. Como se observa en la **Figura 7** las placas de cristalización presentan un micropocillo, donde se dispensan estas gotas, expuesto a una cavidad mayor llamada reservorio que contiene únicamente la condición de cristalización. Todo el sistema queda herméticamente cerrado con el fin de alcanzar el equilibrio entre el reservorio y la mezcla por difusión de vapor.

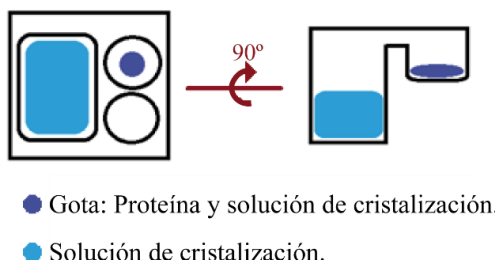


Figura 7. Esquema de un pocillo en una placa de cristalización. Las placas de cristalización utilizadas presentan 96 pocillos, cada uno de ellos formado por una cavidad de mayor volumen (**Reservorio**) y dos micropocillos menores para dispensar la mezcla de la solución de proteína y la de cristalización (**Gota**).

Las condiciones de cristalización suelen estar compuestas por un precipitante, una solución tampón y pueden presentar otros componentes o aditivos (sales, detergentes...). Así, se realizan múltiples ensayos variando el precipitante, el pH, la temperatura y la concentración tanto del precipitante como de la proteína.

El principio de la difusión de vapor se caracteriza por el transporte de materia, generado por la diferencia de concentración del precipitante, entre el reservorio y la gota. Debido a esto, se produce una diferencia de presión de vapor que actúa como fuerza motriz de este equilibrio dinámico. El reservorio tiene una concentración mayor de precipitante que la gota, lo cual favorece un transporte de agua gradual de la gota al

reservorio, hasta alcanzar el equilibrio. De esta forma, el volumen de la gota se reduce generando una sobresaturación, que disminuye la solubilidad de la proteína favoreciendo la formación de núcleos cristalinos y el crecimiento ordenado de los cristales (McPherson 2017).

Para los ensayos iniciales se utilizaron distintas condiciones comerciales, que se dispensaron en placas de gota sentada de 96 pocillos MRC (Swissci), utilizando un robot Honeybee X8 (Genomic Solutions). Los ensayos se realizaron con las soluciones de cristalización: Wizard I, II y III (Jena Bioscience), JBScreen Classic (Jena Bioscience), ProPlex (Molecular Dimensions) y Crystallization PEG Grid screening kit (Sigma Aldrich). Con el robot se dispensaron gotas de 0.4 μ L (0.2 μ L de solución de proteína y 0.2 μ L de precipitante) frente a los 50 μ L de solución de cristalización del reservorio.

Las placas se depositaron en cámaras termostatazadas con temperaturas de 22°C o 4°C y fueron revisándose periódicamente para comprobar la aparición de cristales.

2.2. OPTIMIZACIÓN Y VITRIFICACIÓN:

Una vez obtuvimos las condiciones iniciales de cristalización, se realizaron ensayos de optimización, con el objetivo de reproducir los cristales con mayor calidad y tamaño. En nuestro caso, modificamos ligeramente el pH y la concentración de precipitante por filas y columnas (6x8 y 6x4). Se prepararon las nuevas soluciones con un robot TECAN Freedom EVO (Tabla 2).

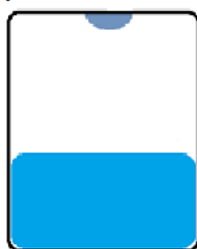
Tabla 2. Placas de optimización.

Enzima	Tipo de placa	Condición
AauDyP1 Nativa L357G F359G	24 (6x4)	24 – 40% PEG 2000MME pH 7.5
	24	20 – 38% PEG 4000 pH 2.5
	48(6x8)	24 – 40% PEG 2000MME / 20 – 38% PEG 4000 + 1 Mm MPS / MTS
PleosDyP4 Nativa F194Y F194W	24	20 – 35% PEG 2000 MME pH 7.5
	24	25 – 35% PEG 4000 pH 2.5
	24	0.2 M MES (pH 5.5 – 6.7) y 22 – 31% PEG 2000 MME
	24	3 mM MnCl ₂ , 0.2 M MES (pH 5.5 – 6.7) y 22 – 31% PEG 2000 MME
PleosDyP4 E190A F194Y F194W D196A	24	0.1 M MES (pH 5.5 – 6.7) y 20 – 25% PEG 2000 / 20 – 25% PEG 3350
	24	3 mM MnCl ₂ , 0.1 M MES (pH 5.5 – 6.7) y 20 – 25% PEG 2000 / 20 – 25% PEG 3350
	48	0.2 M MES (pH 5.5 – 6.7) / 0.2 M cacodilato (pH 6.4 – 7.4) y 20 – 25 % PEG 3350 / 20 – 25% PEG 2000 MME

Enzima	Tipo de placa	Condición
<i>PleosDyP4</i> E345A E345A/D352A/D354A	48	20 – 30% PEG 2000MME / 20 – 30% PEG3350 / 20 – 30% PEG 4000 / 20 – 30% PEG 6000 3 mM MnCl ₂
<i>PleosDyP4</i> D352A D354A	48	20 – 30% PEG 2000MME / 20 – 30% PEG3350 / 20 – 30% PEG 4000 / 20 – 30% PEG 6000 3 mM MnCl ₂

Se utilizaron placas de 48 pocillos (Swissci) con gota sentada y se dispensaron de forma manual, 0.5 μ L de la condición de cristalización frente a 0.5 μ L de la solución de proteína, equilibrándose con 150 μ L de la condición de cristalización del reservorio; y placas Linbro de 24 pocillos (Hampton research) (**Figura 8**) con gota colgante, en las que se mezclaron 1 μ L de proteína y 1 μ L de la condición de cristalización. También se realizaron ensayos de cristalización en los que se suplementaron las condiciones con 3 mM cloruro de manganeso (MnCl₂), 1 mM fenil metil sulfuro (MPS) y 1 mM metil *p*-tolil sulfuro (MTS).

Proteína y solución de cristalización.



Solución de cristalización.

Figura 8. Optimización mediante el método de difusión de vapor. En las placas de optimización de gota colgante (24 pocillos) la gota queda pendiente sobre la solución de cristalización.

Una vez obtenidos cristales con el tamaño adecuado para llevar a cabo las medidas de difracción, se deben proteger con una solución crioprotectora que evite su deterioro durante la recogida de datos. Los rayos-X tienen una alta intensidad y al exponer el cristal se producen radicales libres que lo dañan considerablemente. Para evitar el daño por radiación las medidas se realizan bajo un flujo de nitrógeno constante, a baja temperatura (100 – 110°K) sobre el cristal, lo cual disminuye la reactividad de los radicales libres y el daño por radiación. Estas soluciones crioprotectoras evitan la formación de hielo en el cristal y favorecen la conservación adecuada del mismo durante el transporte. En esta tesis para su crioprotección, teniendo en cuenta la condición de la que partimos, algunos de los cristales se sumergieron directamente en paratone. En aquellas condiciones con un precipitante que a determinada concentración tuviera propiedades crioprotectoras, se aumentó la concentración del mismo (20 – 30% PEG 3350/4000 o 25% glicerol) y equilibramos el cristal en la condición crio.

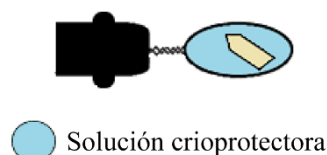


Figura 9. Detalle de un cristal en un lazo de nylon (“loop”) equilibrado en la solución crioprotectora.

Tras equilibrar los cristales en el crioprotector, se colocan en lazos de nylon con una base magnética (“Cryo-cap”) que se acoplará a un goniómetro de alta precisión para facilitar el alineamiento del cristal con la fuente de radiación (**Figura 9**). Una vez montados en soportes magnéticos, los cristales son almacenados en viales para garantizar su transporte a las instalaciones de sincrotrón. Para facilitar el envío, estos viales se disponen en contenedores “ad hoc” compatibles con los robots intercambiadores de muestras. En nuestro caso se utilizaron los “cryo-caps” estándar SPINE, compatibles en ALBA (XALOC) y en todas las líneas del ESRF. Para conservar las temperaturas criogénicas se utilizaron “Dewar” de la serie CP100 especialmente diseñados para el almacenamiento y transporte de nitrógeno líquido (**Figura 10**).

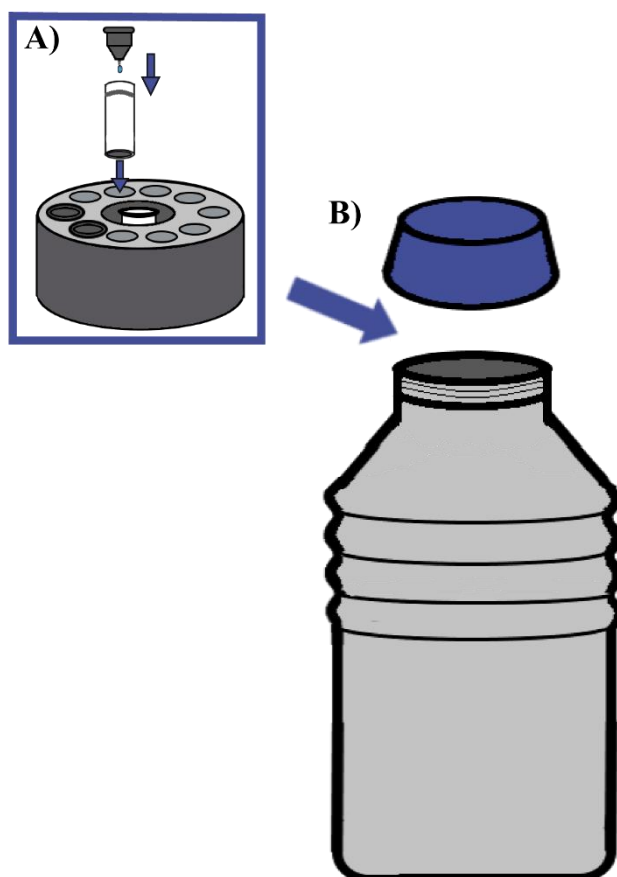


Figura 10. Preparación de los cristales para su transporte. **A)** Los “baskets” presentan 10 orificios para introducir crioviales magnéticos que protegen el lazo de nylon. Inicialmente estos recipientes, también denominados revólveres, se enfrían en nitrógeno líquido con los crioviales en su interior y posteriormente se introducen las muestras. **B)** Los revólveres se apilan verticalmente en un “Dewar”.

2.3. RECOGIDA DE DATOS:

Las proteínas realizan una gran variedad de funciones biológicas determinadas esencialmente por dos factores íntimamente relacionados: su plegamiento tridimensional y las condiciones fisiológicas en las que se encuentran. Actualmente pueden utilizarse diversas técnicas para llevar a cabo su estudio tridimensional como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la Microscopía Electrónica (ME), aunque en esta tesis hemos utilizado la cristalografía de rayos-X para la resolución estructural de las proteínas de interés.

La difracción de rayos-X puede proporcionar información muy detallada de la estructura tridimensional de muestras cristalinas, en nuestro caso macromoléculas biológicas. En esta técnica se produce una interacción física de los rayos-X con los cristales.

Los cristales son estructuras periódicas con la misma orientación espacial. Cuando el haz de rayos-X incide sobre ellos hay una interacción con los electrones de los átomos, generándose una vibración periódica que emite radiación X en todas direcciones. Como se muestra en la **Figura 11**, si estos rayos dispersados están en fase, interfieren entre sí generando haces difractados, y es en este caso cuando se cumple la ley de Bragg (Cullity 1956).

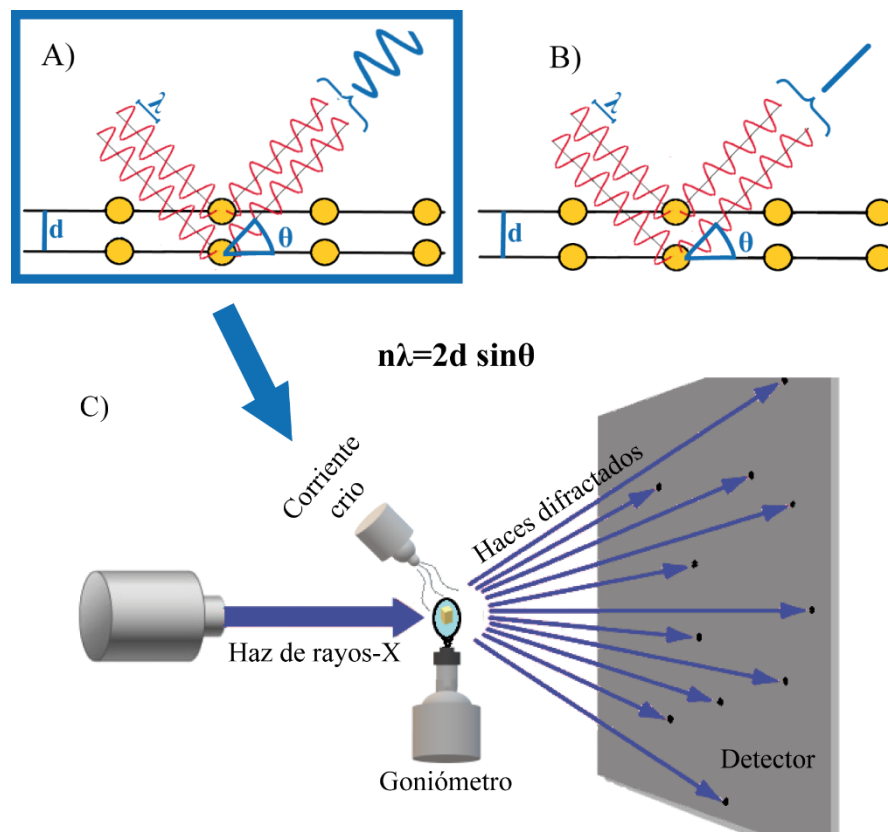


Figura 11. Ley de Bragg. En los paneles **A** y **B** se muestran en amarillo los átomos pertenecientes a dos planos de la red cristalina (líneas horizontales) y en rojo los haces incidentes y dispersados. En **A** se produce una dispersión cooperativa, los haces dispersados están en fase (en la ecuación n es cero o un número entero) produciendo un haz difractado de mayor amplitud (azul). En el panel **B** los átomos de la red cristalina producen una interferencia destructiva por lo que los haces dispersados se anulan entre sí. **C)** Esquema de la recogida de datos de un cristal.

Los haces difractados dan información acerca de la posición y tipo de moléculas encontradas a su paso generando un patrón de difracción característico (**Figura 12**). La intensidad de los haces difractados depende del tipo de átomos contenidos en el cristal y de su posicionamiento en la celdilla unidad.

Para la recogida de datos de difracción se hace incidir un haz monocromático de rayos-X sobre un cristal centrado y alineado previamente a la fuente de radiación (**Figura 11C**). Estos patrones de difracción se van registrando mientras se rota el cristal de forma perpendicular al haz, mediante un goniómetro de alta precisión, para recoger el mayor número de reflexiones únicas posible obteniendo un conjunto de datos completo.

Las medidas de este proyecto se realizaron en fuentes de radiación sincrotrón y los detectores utilizados fueron fabricados por DECTRIS (Switzerland) de la serie PILATUS 6M. Se recogieron juegos de datos en las líneas ID23-1 e ID30B del “*European Synchrotron Radiation Facility*” (ESRF, Grenoble, Francia), en la línea PROXIMA1 de SOLEIL (Gyf-sur-Yvette, Francia) y en la línea XALOC de ALBA (Barcelona, España), con longitudes de onda comprendidas en el rango de 2.4 a 0.58 Å. Para evitar el daño por radiación se utilizó el programa EDNA, integrado en el paquete de datos mxCUBE (Gabadinho et al. 2010). Inicialmente se comprobó la calidad de la difracción de los cristales tomando 4 imágenes (0°, 90°, 180° y 270°) para determinar los parámetros de celdilla y la simetría del cristal. Con estos parámetros el programa sugiere una estrategia para la recogida de datos minimizando los daños por radiación. Los parámetros más importantes durante la recogida son la transmitancia, el tiempo de exposición y el ángulo de oscilación entre imágenes. Dada la rapidez de los detectores utilizados, a menudo se recogen los 360°, para asegurar una completitud significativa de los datos.

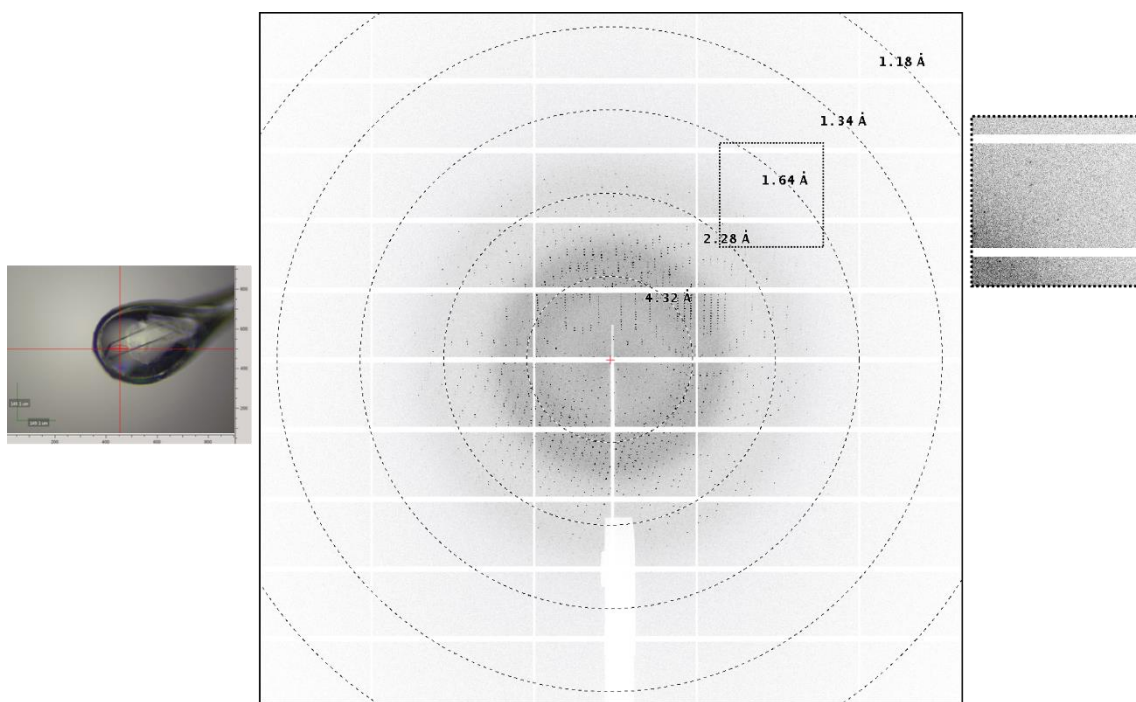


Figura 12. Espectro de difracción de rayos-X de *PleosDyP4 F194Y*. En el margen izquierdo se muestra un cristal de *PleosDyP4 F194Y* en un lazo de nylon. La imagen central muestra uno de los patrones de difracción con sus círculos de resolución. En la parte derecha de la imagen se ha ampliado la zona comprendida entre 2.28 Å y 1.4 Å, donde se aprecia difracción hasta 1.6 Å aproximadamente.

2.4. PROCESAMIENTO DE DATOS:

Una vez recogidos los patrones de difracción debemos procesar toda la información obtenida, reduciéndola a un conjunto de datos para reflexiones únicas. En el proceso de recogida habrá reflexiones múltiples, que se hayan medido a diferentes valores angulares de Φ y otras que sean equivalentes por la simetría inherente del cristal. Por tanto, debemos reducir todos estos datos múltiples a reflexiones únicas con un valor promedio de intensidad y su correspondiente error experimental. El procesamiento engloba distintos pasos:

- **Indexado:** Cada reflexión está formada por la difracción de un conjunto de planos que se definen con tres números (h, k, l) denominados índices de Miller. En este proceso se determinan los parámetros de la celdilla unitaria (dimensiones de los ejes y ángulos) que es la unidad elemental o elemento de simetría mínimo del cristal y el grupo espacial que describe la más alta simetría del cristal.
- **Integración de las intensidades:** Se agrupan las intensidades de las reflexiones que se repiten en los patrones de difracción (reflexiones múltiples) y se descartan las reflexiones con una intensidad débil (aquellas que no superan un valor umbral $[I/\sigma I]$) y las que no pueden estimarse de manera fiable.
- **Escalado:** como se ha expuesto, el cristal sufre un deterioro progresivo por radiación durante la recogida de datos, que afecta a la intensidad de las reflexiones recogidas. Por tanto, es necesario escalar estas intensidades para promediarlas y combinarlas con aquellas que son equivalentes por simetría y poder asignar correctamente el grupo espacial.

Para realizar el indexado y la integración de los datos, se utilizó el programa XDS (Kabsch 2010) y el escalado se realizó con el programa AIMLESS (Evans and Murshudov 2013), generando un archivo con una lista de reflexiones únicas, su intensidad (I) y su error experimental asociado (σI).

Para determinar la calidad de los datos adquiridos hay varios parámetros que nos indican la correlación entre todas las reflexiones tomadas. Estos valores se obtienen tras el escalado con AIMLESS (Evans and Murshudov 2013). Los indicadores más utilizados son: $I/\sigma(I)$ (Diederichs 2010), R_{merge} (Weiss 1997) y R_{meas} (Diederichs 1997) que miden la concordancia de los datos antes de ser promediados, R_{pim} (Weiss 2001) determina la precisión de los datos ya promediados y $CC_{1/2}$ (Karplus and Diederichs 2012) que determina a que resolución podemos procesar los datos. Las fórmulas de estos parámetros se detallan a continuación:

- $I/\sigma(I)$ relaciona las intensidades de las medidas con su error experimental asociado. Valores superiores a 0.5 para la zona de alta resolución indican que la resolución que se ha determinado es adecuada (Wlodawer et al. 2008).

- R_{merge} determina el grado de concordancia de las reflexiones relacionadas por simetría.

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i^n |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i^n I_i(hkl)}$$

** $I_i(hkl)$ es la medida i de la intensidad de una reflexión (hkl) y $[\overline{I(hkl)}]$ es la intensidad promedio de todas las reflexiones (hkl) (Weiss 1997). Un conjunto de

datos de difracción debe presentar un valor R_{merge} en la capa de mayor resolución, menor del 100% (Diederichs 1997).

• R_{meas} es una corrección del parámetro R_{merge} para eliminar los efectos de la multiplicidad (Diederichs 1997). Indica la precisión de las mediciones individuales, independientemente de la frecuencia con la que se ha medido una reflexión dada. La influencia de la multiplicidad sobre el factor R_{merge} hace que los datos menos redundantes tengan mejores valores independientemente de su calidad, para evitar esta desviación se aplica el factor de corrección matemática: $\sqrt{N/(N-1)}$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum_i^N |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i^N I_i(hkl)}$$

** N es la multiplicidad (número de veces que se ha medido una reflexión).

• R_{pim} es un indicador de la precisión de las intensidades promediadas. En este caso se aplica al parámetro R_{merge} la corrección matemática: $\sqrt{1/(N-1)}$ (Weiss 2001).

$$R_{\text{pim}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{1}{N-1}} \sum_i^N |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i^N I_i(hkl)}$$

• El Coeficiente de Correlación de Pearson (CC) es un parámetro para evaluar la precisión de los datos experimentales. Inicialmente se dividen los datos no promediados de forma aleatoria en dos mitades del juego de datos (conjuntos). Se calcula el CC para cada conjunto obteniendo el parámetro $CC_{1/2}$. Se utiliza un límite máximo entre 0.3 – 0.5 en este parámetro para determinar la resolución de los datos (Karpus and Diederichs 2012).

$$CC_{1/2} = \frac{\sigma_\tau^2}{\sigma_\tau^2 \sigma_\epsilon^2}$$

Para la construcción y refinamiento de la estructura se puede trabajar indistintamente con valores de intensidad (I) o factores de estructura (F). En nuestro caso utilizamos el programa AIMLESS (Evans and Murshudov 2013) con la subrutina CTRUNCATE (Padilla and Yeates 2003) para realizar la conversión de intensidades a factores de estructura, y con ellos calcular la densidad electrónica experimental. En términos generales, el módulo del factor de estructura está relacionado directamente con la intensidad experimental:

$$\mathbf{I} \sim |\mathbf{F}|^2$$

2.5. DETERMINACIÓN DE LAS FASES EXPERIMENTALES:

Para resolver la estructura tridimensional de una molécula es necesario obtener una imagen de la densidad electrónica, sobre la que se construirá el modelo a escala atómica. Para ello, debemos determinar la función de la distribución electrónica $\rho(x,y,z)$ para cada punto de la celdilla unidad, utilizando la transformada de Fourier:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl}^{+\infty} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

** $\rho(x,y,z)$ es la densidad electrónica en cada punto de la celdilla unidad, $|F(\mathbf{hkl})|$ es el módulo del factor de estructura definido para cada punto del espacio recíproco (\mathbf{hkl}) como resultante de la dispersión cooperativa emitida por los electrones de los átomos contenidos en la celdilla unidad, V el volumen de la celdilla y $\phi(\mathbf{hkl})$ es el ángulo de fase para cada reflexión.

Los factores de estructura $|F(\mathbf{hkl})|$ se determinan experimentalmente a partir de las intensidades recogidas ya que son proporcionales entre sí. Sin embargo, las fases de las ondas difractadas $\phi(\mathbf{hkl})$ no pueden medirse experimentalmente pero son necesarias para la determinación de los mapas de densidad electrónica. Esta dificultad se conoce como el “problema de las fases” siendo necesario recurrir a distintos métodos para solventar este problema.

Los métodos experimentales que se usan para su resolución son tres fundamentalmente:

2.5.1. Métodos directos: se asignan fases probables a un determinado número de factores de estructura (generalmente se seleccionan las reflexiones más importantes) buscando relaciones entre sus fases. Son cálculos computacionalmente muy complejos porque se necesita probar muchos conjuntos de fases y relaciones entre ellas, que nos permitan calcular una función de densidad electrónica aproximada. Se aplican a proteínas de pequeño a un tamaño medio. Estos algoritmos se han mejorado actualmente con programas como ARCHIMBOLDO (Rodríguez et al. 2009), en el que a partir de pequeños fragmentos reconocibles (α -hélices, β -láminas) es posible ensamblar la estructura.

2.5.2. Determinación experimental de las fases: consiste en obtener cristales a los que se les incorporan átomos pesados altamente dispersores, pudiéndose utilizar además la dispersión anómala característica de cada átomo. La introducción de estos átomos, con un elevado número de electrones, proporciona variaciones en las intensidades de los haces difractados, permitiendo localizar la disposición espacial de estos átomos. Con estas posiciones, se pueden calcular unas fases iniciales y computar mapas de densidad electrónica a partir de los cuales podemos empezar a construir el modelo inicial. Los diferentes métodos que se utilizan siguiendo esta técnica son:

2.5.2.1.1. El reemplazo isomorfo simple con las siglas SIR (“*Single Isomorphous Replacement*”) o múltiple MIR (“*Multiple Isomorphous Replacement*”).

2.5.2.1.2. La dispersión anómala simple SAD (“*Single-wavelength Anomalous Dispersion*”) o múltiple MAD (“*Multi-wavelength Anomalous Dispersion*”).

2.5.3. Reemplazo molecular: es necesario disponer de un modelo estructural en el banco de datos de proteínas (PDB – “*Protein Data Bank*”) con un plegamiento similar al de la estructura a determinar para aplicar este método matemático. Aunque hay cierta controversia en cuanto al grado de homología de secuencia con el modelo a resolver (aproximadamente un 30% en secuencia primaria) porque en determinados

casos la homología estructural es más alta que la predicha en secuencia. En esencia, se trata de determinar la orientación, en primer lugar (función de rotación) y la posición del modelo previamente orientado (función de traslación) dentro de la celdilla unidad. Matemáticamente es comparar la función de Patterson de las intensidades experimentales (\mathbf{P}_{exp}) con la función de Patterson calculada (\mathbf{P}_{cal}) a partir del modelo de búsqueda.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi (hu + kv + lw)$$

Para las diferentes estructuras resueltas en este proyecto se utilizó el método de reemplazo molecular, haciendo uso de distintos paquetes informáticos. Por un lado, utilizamos del paquete de programas PHENIX (Adams et al. 2010) la herramienta denominada AutoMR (“*Automated Molecular Replacement*”) que conecta con el programa PHASER (McCoy et al. 2007) utilizando la herramienta AutoBuild, para el modelado automático. Este programa se utilizó durante el tratamiento de datos de la estructura nativa de DyP1 de *A. auricula-judae*. Por otro lado, el paquete de programas Collaborative Computational Project number 4 (CCP4) presenta varias herramientas de reemplazo molecular como MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010), PHASER (McCoy et al. 2007) y MrBUMP (Keegan and Winn 2007). Utilizamos MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010) para la resolución estructural del resto de mutantes. Tanto en *A. auricula-judae* como en *P. ostreatus* se usó como modelo de búsqueda la estructura de DyP descrita en *B. adusta* (código PDB: 3AFV) (Yoshida et al. 2011) con una identidad de secuencia del 53.4% con *AauDyP1* y del 43.9% con *PleosDyP4* (BLAST (UniProt 2019)).

2.6. CONSTRUCCIÓN Y REFINAMIENTO DEL MODELO:

Una vez que disponemos del primer modelo estructural y los mapas de densidad electrónica, sobre los que se traza la cadena polipeptídica, es necesario reconstruir y ajustar el modelo. La construcción de la cadena se reduce considerablemente ya que este modelo se obtiene a partir de una estructura conocida similar. En este revisamos con mayor atención las regiones que difieren en su plegamiento y reemplazamos los residuos no conservados en secuencia. Es importante tener en cuenta el sesgo (“*model bias*”) del modelo que, en determinadas ocasiones, nos puede llevar a desactivar ciertas zonas de la estructura. El programa gráfico que se utilizó para la construcción de los modelos fue COOT (“*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*”) (Emsley and Cowtan 2004).

Tras cada sesión de modelado, le sucede otra de refinamiento. Este proceso, consiste en ajustar las coordenadas de cada átomo (x,y,z), el factor B y el grado de ocupación, para optimizar el coeficiente de acuerdo entre los factores de estructura observados y calculados (R_{factor}). Durante estos ciclos de refinado, es necesario introducir ciertas restricciones de distancias y ángulos de enlace y de torsión, de estructura secundaria, de simetría local no cristalográfica (NCS) y restricciones frente a estructuras homólogas conocidas, dado el elevado número de parámetros a refinar frente al número de reflexiones observadas.

Como se ha mencionado, uno de los parámetros que se refinan para mejorar el ajuste del modelo, es el factor de vibración térmica de cada átomo. Parra ello se utiliza un refinado de los parámetros de desplazamiento atómico ADP (“*Atomic Displacement*”).

Parameter”) o factor B. La magnitud de este parámetro determina el grado de movilidad o desorden de cada átomo en el cristal. Valores muy elevados ($\geq 100 \text{ \AA}^2$) definen un alto grado de movilidad lo que se traduce en que la posición/es del átomo/s está/n poco definida/s en la densidad electrónica.

El método de refinamiento a utilizar dependerá de la resolución y del estado del modelo inicial. En los primeros estadios del proceso se aplica un refinamiento de cuerpo rígido (“*rigid body*”) y/o de simulado (“*simulated annealing*”), cuando existe un gran sesgo del modelo. Este cálculo matemático puede hacerse por un ajuste por mínimos cuadrados (“*least-squares target*”) o por el método de máxima verosimilitud (“*maximum-likelihood target*”) que usa métodos probabilísticos para un mejor ajuste del modelo (Tronrud 2004).

El progreso en el proceso de refinamiento, irá acompañado de la mejora del modelo con un mayor ajuste a los mapas de densidad electrónica. Esto se aprecia visualmente en las diferentes sesiones gráficas después de cada refinado. Además de verse reflejado en los indicadores numéricos resultantes de cada ciclo de refinamiento. Estos son los factores de acuerdo R y R_{free} . El factor R nos indica el porcentaje de desacuerdo entre los factores de estructura observados (F_{obs}) y los calculados (F_{cal}):

$$R = \sum_{hkl} \frac{||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{cal}}||}{|F_{\text{obs}}|}$$

A medida que el refinamiento progresa el valor del parámetro R disminuye. Para evitar un sobreajuste de los datos experimentales que pueda conducir a un modelo incorrecto con valores aceptables de R, Axel T. Brünger (Brünger 1992), introdujo un nuevo indicador de calidad (R_{free}) que es independiente del sesgo producido por el modelo en el proceso de refinamiento. Para el cálculo de R_{free} se retrae un porcentaje determinado de reflexiones (entre un 5 – 10%) que no se tiene en cuenta en el ajuste del modelo. De esta forma, este parámetro es independiente del modelo refinado, lo que nos proporciona una estimación más realista de la validez del mismo. Cualquier modificación introducida que disminuya el valor de R_{free} será correcta.

Aunque el factor R está relacionado con la resolución de los datos experimentales, para el caso de proteínas se consideran aceptables los valores de R comprendidos entre el 15 y el 25%. Para R_{free} valores por debajo del 30%.

Los programas que se utilizaron para el refinamiento de las diferentes estructuras fueron PHENIX (Afonine et al. 2012) y REFMAC (Murshudov et al. 1997) utilizando el *Maximum-Likelihood Method*.

2.7. VALIDACIÓN DEL MODELO:

Una vez finalizados los ciclos de construcción y refinamiento del modelo, es necesario revisar las estructuras para evaluar su calidad. Los programas de refinamiento y gráficos moleculares disponen de una gran variedad de diagnósticos para identificar las zonas con un ajuste más grosero de las proteínas y optimizarlas, antes de proceder a su depósito en el PDB. Algunos de los indicadores más importantes son, por ejemplo, las desviaciones estándar de distancias y ángulos de enlace, los factores de temperatura promedios de la cadena principal, así como los valores de R y R_{free} y la diferencia numérica entre ellos. Otro de los indicativos más utilizados es el diagrama de Ramachandran (“*Ramachandran*”).

plot”) (Wlodawer 2017) en el que se visualizan todas las combinaciones posibles de los ángulos entre enlaces peptídicos contiguos, los denominados Ψ (*psi*) y Φ (*phi*) (**Figura 13**).

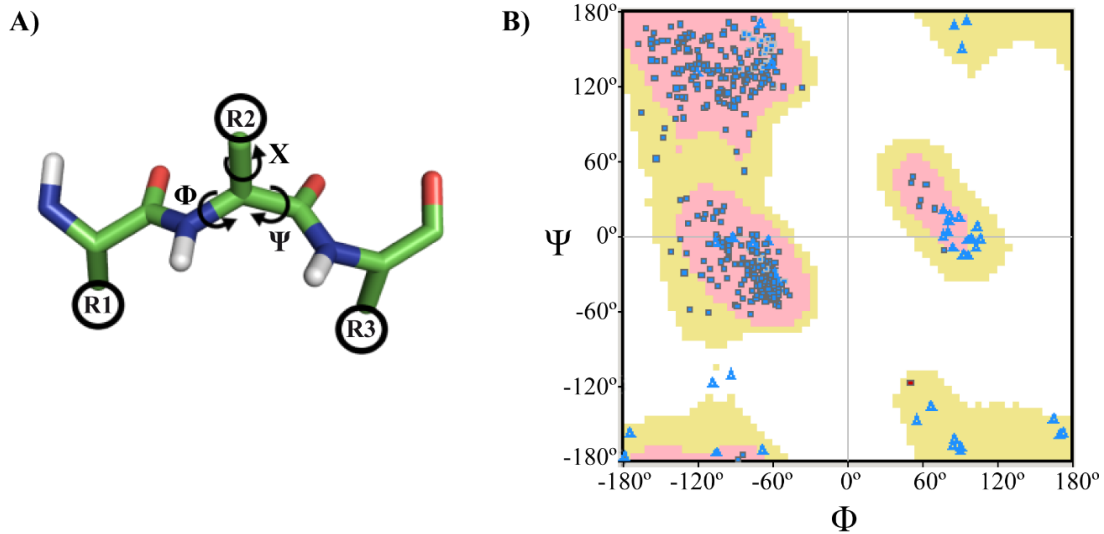


Figura 13. Ángulos de torsión del enlace peptídico y diagrama de Ramachandran. A) Representación de los ángulos de torsión formados por el $C\alpha$ con la cadena lateral (ángulo X) y los enlaces peptídicos: el formado por $N-C\alpha$ (ángulo Φ) y el formado por $C\alpha-CO$ (ángulo Ψ). **B)** Diagrama de Ramachandran de *AauDyP1 L357G*, en el que se representan los valores de Ψ y Φ de cada aminoácido. En el diagrama podemos distinguir tres regiones estéricamente permitidas (rosa).

Este gráfico muestra aquellas regiones permitidas y/o aceptables para los valores de los ángulos de torsión entre enlaces peptídicos, de los distintos residuos que componen la macromolécula. Otra herramienta para validar el modelo es el análisis de los rotámeros, en el que se comprueban los ángulos X (*chi*) que definen las posibles disposiciones de las cadenas laterales. Gracias a estos análisis, podemos identificar los aminoácidos con las posiciones más sensibles y reajustarlos mejor a sus restricciones. Estos dos últimos indicadores están disponibles dentro de las herramientas del programa COOT (Emsley and Cowtan 2004).

La mayor parte de estos indicadores de calidad están incluidos en programas accesibles y de uso público como MOLPROBITY (Williams et al. 2018) y POLYGON (Urzhumtseva et al. 2009), siendo muy útiles para analizar los valores de la estructura que presenten un ajuste más deficiente y permiten mejorar la geometría del modelo final. Una figura representativa de estos programas de validación, se presenta a continuación.

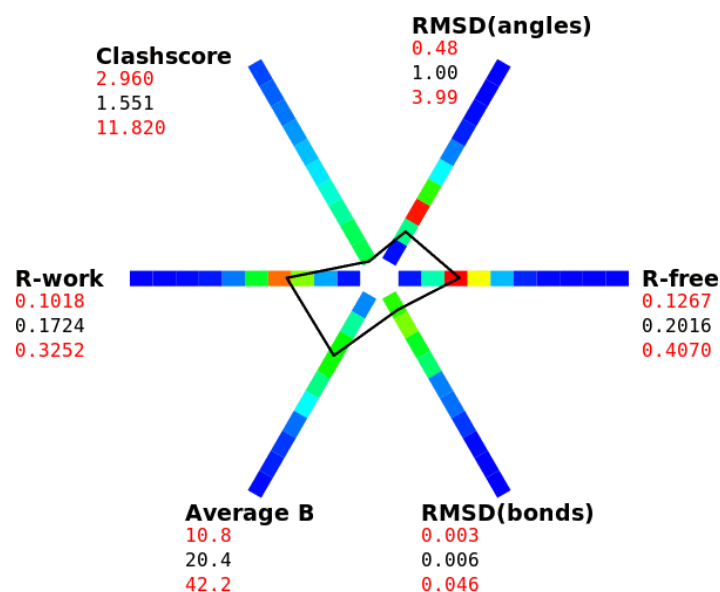


Figura 14. Gráfico de validación del programa Polygon (Urzhumtseva et al. 2009) del mutante de *PleosDyP4 F194Y*.

3. ENSAYOS CINÉTICOS Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES:

3.1. *DYP1 DE A. AURICULA-JUDAE*:

3.1.1. ANÁLISIS QUIRAL Y ENSAYOS CINÉTICOS:

Los ensayos de la actividad peroxidasa sobre diferentes sustratos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 a temperatura ambiente. La actividad enzimática se cuantificó midiendo las velocidades iniciales a varias concentraciones de sustrato.

Para las reacciones de sulfoxidación asimétrica se utilizaron dos tioéteres aromáticos (Figura 15), el tioanisol o metil-fenil sulfuro (MPS) y el metil *p*-tolil sulfuro (MTS). Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado a 25°C en 100 mM acetato (pH 5).

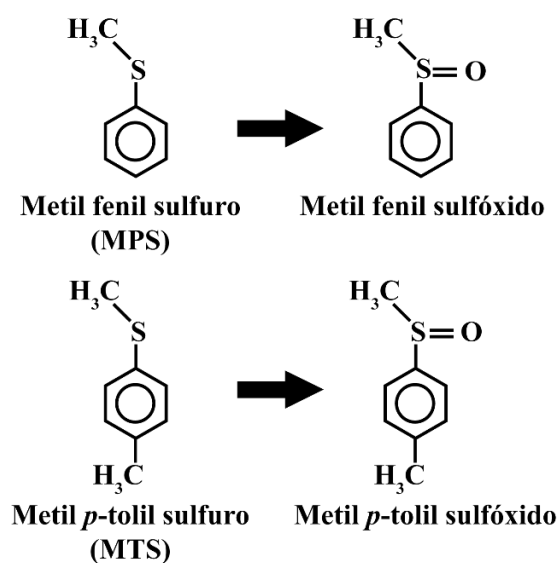


Figura 15. Oxidación de sulfuros.

Se prepararon diluciones en serie de un stock inicial de 500 mM, de cada uno de los compuestos en etanol, para obtener concentraciones de sustrato en el rango de 250 mM a 2 mM. Las medidas de actividad se llevaron a cabo en cubetas con una longitud de paso de 1 cm para volúmenes de reacción de 1 mL o en cubetas de 0.1 cm en volúmenes de 0.33 mL, cuando la absorbancia inicial era mayor que 1. Se inyectaron soluciones de proteína a diferentes concentraciones (100 nM – 200 nM) y las reacciones se iniciaron mediante la adición de H₂O₂ (2 mM). Las velocidades iniciales (disminución de la absorbancia por desaparición de sustrato) se calcularon teniendo en cuenta los coeficientes de extinción molar ($\Delta\epsilon$) del MPS ($\Delta\epsilon_{254}$ 7870 M⁻¹ cm⁻¹) y del MTS ($\Delta\epsilon_{253}$ 8040 M⁻¹ cm⁻¹).

Los productos de la reacción se analizaron mediante cromatografía enantioselectiva, utilizando un equipo HPLC (Agilent) con una columna Chiralpack IB (4.6 mm – 250 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m) mediante elución isocrática, con un flujo de 1 mL min⁻¹. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de hexano/alcohol isopropílico en proporciones 95/5 para analizar las reacciones con MPS y 98/2 para el MTS. La elución fue monitorizada a 207, 216, 237, 248 y 263 nm. Para la identificación de los diferentes compuestos se obtuvieron las curvas de calibración tanto de los sustratos como de los productos de sulfoxidación.

Por otro lado, para comprobar si estas mutaciones afectan a la oxidación natural mediada por *AauDyP1*, se realizaron ensayos de actividad enzimática con ABTS, sustrato por el que la enzima nativa presenta una gran eficiencia catalítica (Liers et al. 2009). La oxidación de ABTS se determinó siguiendo la formación de su radical catiónico a 436 nm ($\Delta\epsilon_{436}$ 29300 M⁻¹ cm⁻¹) tras la adición de H₂O₂. Se realizaron dos tipos de medidas, con una concentración de 10 nM de enzima:

- En condiciones de saturación de ABTS y distintas concentraciones de H₂O₂ (20 μ M – 25 μ M).
- Con distintas concentraciones de ABTS y 2.5 mM de H₂O₂.

Los datos se trataron mediante Sigma-Plot 11.0 por mínimos cuadrados no lineales, ajustándose la eficiencia catalítica estimada a un modelo de Michaelis-Menten (Linde et al. 2016).

3.1.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES:

En colaboración con el Dr. Guallar del Centro Nacional de Supercomputación de Barcelona e ICREA, se realizaron simulaciones moleculares computacionales de la difusión de los sustratos (MPS y MTS) dentro del centro activo de *AauDyP1*, con la herramienta informática *Protein Energy Landscape Exploration* (PELE (Madadkar-Sobhani and Guallar 2013) un algoritmo basado en el método de MonteCarlo capaz de muestrear el espacio conformacional proteína-ligando. Una vez resueltas las estructuras, los sustratos se colocaron manualmente en idénticas posiciones a la entrada del canal del grupo hemo y se realizaron simulaciones de las posibles trayectorias de acceso de cada sustrato (MTS y MPS) al bolsillo hemo, obteniéndose unos valores para las energías de interacción. Se consideraron distancias iguales o inferiores a 5 Å como óptimas para la interacción.

Posteriormente, se analizó la estereoselectividad de la reacción de sulfoxidación, seleccionando las estructuras con una distancia entre 3 y 5 Å medida desde el oxígeno

reactivo del grupo hemo (compuesto I) al azufre del sustrato y seleccionando las menores energías de reacción. En cada simulación, se clasificaron los ángulos diedros formados entre el oxígeno catalítico y el azufre de los sustratos (C1–S–C2) como se muestra en la **Figura 16**. El enantiómero pro-R presenta ángulos (ϕ) de 40° – 140° , el pro-S presenta valores entre -40° y -140° y se atribuyó al pro-R/S ángulos ϕ en los intervalos de 40° a -40° y de 140° a -140° .

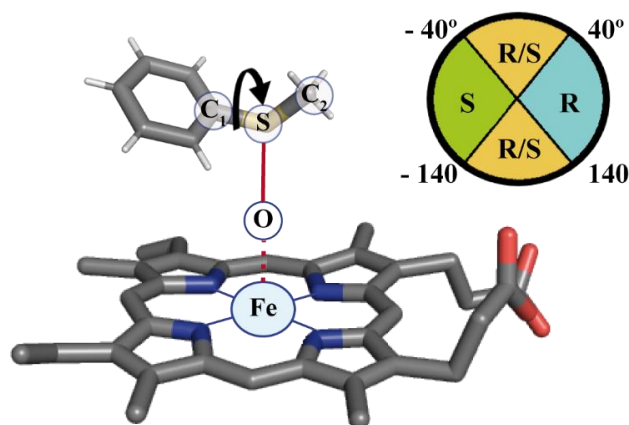


Figura 16. Modelo de interacción entre el compuesto I de *AauDyP1* y MPS. Se muestra el centro oxoferrilo del compuesto I interaccionando con el azufre de MPS.

Para comprobar los efectos de las mutaciones en la sulfoxidación del sustrato, se realizaron simulaciones de mecánica molecular y mecánica cuántica (“*molecular mechanics*” [MM] y “*quantum mechanics*” [QM]). En cada uno de los casos se seleccionaron dos estructuras, una estructura con el ligando en la orientación óptima con el oxoferrilo para producir el enantiómero R (-) y una segunda estructura con el ligando orientado para producir el enantiómero S (+). Para estas simulaciones se incluyeron el grupo Hemo con el ligando axial (compuesto I) y el sustrato. Se realizó un modelado utilizando el método QM: DFT M-06L y el método MM: OPLS-AA, para obtener cálculos de la densidad de spin.

3.2. DYP4 DE *P. OSTREATUS*:

3.2.1. ENSAYOS CINÉTICOS:

Las constantes cinéticas de *PleosDyP4* y sus mutantes se determinaron por las variaciones en la absorbancia tras la oxidación del sustrato en 0.1 M tartrato, a los valores de pH óptimos, a 25°C en un espectrofotómetro Biomate5 (Thermo Scientific). Las reacciones se iniciaron añadiendo H_2O_2 a una concentración de 0.25 mM.

La oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} se determinó a pH 4.5 tras la adición de H_2O_2 (0.25 mM) y se monitorizó la formación del complejo Mn^{3+} -tartrato ($\Delta\epsilon_{238}$ $6.5\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La reacción de oxidación de ABTS se determinó en 0.1 M tartrato, pH 3.5, siguiendo la formación de su radical catiónico a 436 nm ($\Delta\epsilon_{436}$ $29.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) tras la adición de H_2O_2 .

El cálculo de la constante de afinidad aparente o de Michaelis (K_m) y de la constante catalítica (k_{cat}), así como de las desviaciones estándar, se obtuvieron por regresión no

lineal por mínimos cuadrados aplicada a la cinética de Michaelis–Menten. El valor obtenido para estas constantes nos permite calcular la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) aplicando la ecuación normalizada: $v = (k_{\text{cat}}/K_m)[S]/(1 + [S]/K_m)$. Se observaron cinéticas bifásicas para algunos mutantes de *PleosDyP4*.

3.2.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA:

Con las coordenadas de la estructura cristalina de *PleosDyP4* (6FSK, cadena A), se realizaron simulaciones moleculares computacionales, en colaboración con el Dr. Guallar del Centro de Supercomputación de Barcelona e ICREA, para estudiar la difusión y unión del Mn^{2+} . Antes de proceder con las simulaciones realizadas con la herramienta informática PELE (Madadkar-Sobhani and Guallar 2013), es necesario regularizar el sistema a través de una utilidad del programa Schrödinger en el que aplicamos un pH de 4.5 (actividad óptima) a todo el sistema. A este pH los aspárticos D32 y D241 están protonados, las histidinas H49, H138, H148, H168, H191 y H220 están protonadas en el N ϵ y las histidinas H380 y H299 están doblemente protonadas. Las moléculas de agua se mantienen en sus posiciones cristalográficas dada su importancia potencial en la coordinación al Mn^{2+} .

Para comprobar la tendencia a oxidar que presentan los posibles sitios de unión al Mn^{2+} obtenidos con PELE, se realizaron simulaciones de mecánica molecular y mecánica cuántica (MM y QM). La región “QM” comprendía el grupo Hemo, Trp405, Mn^{2+} , Asp215, los aminoácidos comprendidos entre la His334 y el Glu345 y entre el Asp352 y la Arg357, así como dos moléculas de H_2O coordinadas con el ion metálico (en total la región QM comprendía 502 átomos). Se realizó un modelado utilizando el método QM: DFT M–06L y el método MM: OPLS–AA. Para obtener un cálculo de la ruta electrónica se monitorizó la transferencia electrónica desde el grupo hemo hasta el ion Mn^{2+} , eliminando de la simulación los residuos que estaban directamente coordinados al Mn^{2+} .

Para completar el estudio se realizó un espectro de resonancia paramagnética electrónica (“*electron paramagnetic resonance*” [EPR]), en el rango de banda X (9.38/9.39GHz). Las medidas se realizaron con un Bruker E500 Elexis Series utilizando la cavidad Bruker ER 4122SHQE equipada con un criostato de flujo continuo de Helio (Oxford Instruments ESR900). La activación de la enzima se produjo con la adición de H_2O_2 en una proporción *PleosDyP4*/ H_2O_2 de 1:8, directamente en el tubo de 3.5mm de EPR. Los tiempos de reacción tras el enfriamiento fueron de 10 s. Los espectros se realizaron con una concentración de enzima de 0.25 mM en una solución de tartrato a pH 3. Los valores g presentan un error estimado de ± 0.0002 .

RESULTADOS

RESULTADOS

1. RESOLUCIÓN DE MODELOS ESTRUCTURALES POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS-X:

1.1. CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS:

Para los experimentos de cristalización se utilizó el método de difusión de vapor en gota sentada, mezclando volúmenes iguales de la solución de proteína con las diferentes soluciones de cristalización ensayadas, tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las concentraciones de las muestras se ajustaron en un rango de 7.5 a 19.5 mg/mL. En la **Tabla 3** se muestran de las aproximadamente 530 condiciones experimentales ensayadas, aquellas en las que se observó la formación de cristales.

Tabla 3. Condiciones de cristalización.

Enzima	Placas y condición
<i>AauDyP1</i> L357G 10 mg/mL	Proplex C12 (0.2 M KI, 0.1M MES pH 6.5 y 25% PEG 4000) D9 (0.1 M MES pH 6.5, 5% MPD y 15% PEG 6000)
	JBS 1-4 B9 (25% PEG 2000 MME pH 7.4) D3 (0.2 M MgCl ₂ , 0.1M MES pH 6.5 y 25% PEG 4000) D12 (35% PEG 4000 pH 2.5) G4 (0.01 M MgCl ₂ y 10% PEG 6000) G7 (0.05 M KCl, 0.01M MgCl ₂ y 15% PEG 6000)
	Wizard III E3 (2 M formiato de magnesio y 20% PEG 3350)
	JBS 1-4 C2 (8% PEG 4000 pH 2.5) G7 (0.05 M KCl, 0.01M MgCl ₂ y 15% PEG 6000)
	JBS 1-4 C9 (0.2 M KF y 20% PEG 3350)
<i>PleosDyP4</i> Nativa 19.5 mg/mL	Proplex A9 (0.2 M NaCl, 0.1M MES pH 6.0 y 20% PEG 2000MME)
<i>PleosDyP4</i> E190A 16 mg/mL	25% PEG 3350 y 0.1 M MES (pH 6.25)
<i>PleosDyP4</i> F194Y 15 mg/mL	22% PEG 2000 MME y 0.2 M MES (pH 5.75)
<i>PleosDyP4</i> F194W 17 mg/mL	25% PEG 2000 MME y 0.2 M MES (pH 6.0)
<i>PleosDyP4</i> D196A 17 mg/mL	20% PEG 3350 y 0.1M MES (pH 5.75)
<i>PleosDyP4</i> E345A 16 mg/mL	JBS 1-4 D3 (25% PEG 2.000 MME) Wizard 1-2 A10 (20 % PEG 2.000 MME y 0.1 M TRIS pH 7.0) Proplex A11 (25 % w/v PEG 2000 MME y 0.1 M Na HEPES 7.5)
<i>Pleos DyP4</i> D352A 15 mg/mL	JBS 1-4 B1 (15% PEG 6.000, 50 mM KCl y 10 mM MgCl ₂)

Enzima	Placas y condición
Pleos DyP4 D354A 15 mg/mL	JBS 1-4 B1 (15% PEG 6.000, 50 mM KCl y 10 mM MgCl ₂) Proplex D8 (15 % w/v PEG 6.000, 0.1 M acetato de magnesio y 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5)

Como puede observarse en la **Tabla 3**, las condiciones en las que se obtuvieron los cristales contienen polietilenglicoles (PEGs) de diferente peso molecular (2000, 3350, 4000 y 6000) complementado en algunos casos con polietilenglicol monometil éter (PEG MME). El rango de pHs está en torno a 6.0 (5.75 – 6.5) y es notable la presencia de sales de magnesio [Mg(HCOO)₂ y MgCl₂] en el caso de *AauDyP1*. La morfología de los cristales era muy variada presentando formas desde agujas o barras macladas, a prismas muy pequeños.

1.2. OPTIMIZACIÓN Y VITRIFICACIÓN:

Con el objetivo de mejorar el tamaño y la calidad de los cristales, se optimizaron las condiciones iniciales de cristalización (**Tabla 3**). Con estas nuevas soluciones se obtuvieron gran cantidad de cristales con un tamaño adecuado para la recogida de datos, eliminándose el problema de macla que presentaban algunos de ellos. A continuación, se muestran algunos de los más representativos (**Figura 17**).

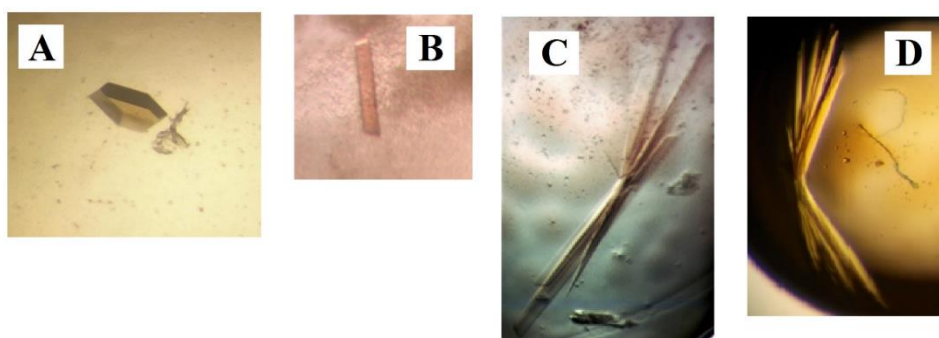


Figura 17. Cristales obtenidos en placas de optimización. **A)** Cristal del mutante *AauDyP1* F359G obtenido en la condición: 30% PEG 2000 MME y 1 mM de MPS. **B)** Cristal de *PleosDyP4* F194W de la condición: 31% PEG2000MME. **C)** Cristales del mutante *PleosDyP4* F194Y en 25% PEG 2000 MME. **D)** Cristales de *PleosDyP4* F194Y optimizados en 25% PEG2000 MME, 0.2M MES (pH 5.75).

Para evitar daños por radiación durante la recogida de datos, los cristales se sumergieron en una solución crioprotectora durante unos segundos. Estas soluciones se prepararon con la misma condición de cristalización pero añadiendo un agente crioprotector (20 – 30% PEG 400 o 25% de Glicerol). En aquellas en las que se utilizó paratone, se sumergió el cristal directamente en una alícuota del compuesto, y posteriormente los cristales se congelaron en nitrógeno líquido.

1.3. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE DATOS:

La recolección de los datos de difracción se realizó en fuentes de radiación sincrotrón del “*European Synchrotron Radiation Facility*” (ESRF, Grenoble, Francia) en las líneas ID23–1 e ID30B, en SOLEIL (Gyf–sur–Yvette, Francia) en la línea PROXIMA1 y en el sincrotrón español ALBA (Cerdanyola, España) en la línea de Cristalografía Macromolecular BL13–XALOC.

Los diferentes datos de difracción se procesaron con XDS (Kabsch 2010) y se escalaron utilizando el programa AIMLESS (Evans and Murshudov 2013) del software cristalográfico CCP4 (“*Collaborative Computational Project number 4*”, 1994), tal como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Las estadísticas del procesado de los datos se detallan en las **Tabla 4** y **Tabla 5**. Como puede observarse, los diversos hábitos cristalinos se corresponden con dos sistemas cristalinos diferentes. En el caso de DyP1 de *A. auricula–judae*, los cristales son monoclinicos con parámetros de celdilla distintos entre sí. Así, la proteína nativa ($a = 154.2$, $b = 100.5$, $c = 128.6$ Å; $\beta = 123.7^\circ$) presenta un volumen de celdilla de aproximadamente 4 veces, al de los dos mutantes L357G ($a = 100.9$, $b = 61.0$, $c = 81.0$ Å; $\beta = 97.0^\circ$) y F359G ($a = 104.9$, $b = 56.1$, $c = 82.7$ Å; $\beta = 97.0^\circ$) (**Tabla 4**). La máxima resolución fue de 1.8 Å para la proteína nativa y de 2.0 Å para el mutante L357G, hasta alcanzar los 1.1 Å en F359G.

Tabla 4. Estadísticas obtenidas durante el procesamiento de datos de *AauDyP1* y sus mutantes.

RECOGIDA DE DATOS	Nativa	L357G	F359G
Longitud de onda (Å)	0.9801	0.9792	0.9795
Resolución (Å)	39.4 – 1.8	44.7 – 2.0	41.3 – 1.1
Grupo espacial	C 2	C 2	C 2
Parámetros de la celda unitaria (Å)	a=154.2	a=100.9	a=104.9
	b=100.5	b=61.0	b=56.1
	c=128.6	c=81.0	c=82.7
	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta = 123.7^\circ$	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta = 97.0^\circ$	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta = 97.0^\circ$
Redundancia	4.1	6.7	5.4
Completitud (%)	97.1 (90.3)	99.2 (99.9)	98.4 (96.4)
I/ σ (I)	6.6 (1.0)	12.6 (2.3)	9.5 (2.4)
R _{merge}	0.14 (0.10)	0.15 (0.95)	0.09 (1.17)
R _{meas}	0.15 (1.04)	0.20 (1.36)	0.11 (1.41)
CC _{1/2} (%)	99.7 (70.5)	99.2 (40.7)	99.8 (60.2)
Wilson B–factor (Å ²)	21.52	33.88	9.14
Código PDB	4W7J	5IKG	5IKD

En cuanto a los cristales de DyP4 de *P. ostreatus*, tanto la proteína nativa como tres de sus mutantes (F194Y, F194W y D196A) son ortorrómbicos, grupo espacial P2₁2₁2₁. Sin embargo, el mutante E190A cristaliza en el sistema tetragonal P4₁2₁2₁. La máxima resolución alcanzada fue de 1.6 Å para la enzima nativa y el mutante F194Y, mientras el

resto de mutantes presentan una resolución máxima de 2.3 Å en D196A, 2.4 Å en E190A y 2.5 Å en F194W. Las estadísticas con los diversos indicadores de calidad en el procesado de datos se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Estadísticas del procesado de *PleosDyP4* y sus mutantes.

RECOGIDA DE DATOS	Nativa	Nativa–Mn	E190A	F194W	F194Y	D196A
Longitud de onda (Å)	0.9793	0.9793	0.9795	0.9762	0.9762	0.9795
Resolución (Å)	88.3–1.6	69.7–1.2	69.7–2.4	88.4–2.5	70.2–1.6	60.3–2.3
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 4 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de la celda unitaria (Å)	a=62.2 b=117.5 c=133.7 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=46.5 b=88.3 c=113.4 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=b=62.1 c=278.64 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=61.9 b=118.1 c=133.0 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=62.7 b=117.6 c=140.4 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=62.4 b=117.0 c=140.4 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Redundancia	6.6 (6.0)	13.1 (12.8)	24.8 (26.6)	6.5 (6.4)	4.5 (4.6)	5.8 (5.9)
Completitud (%)	99.7 (95.5)	99.0 (97.4)	99.9 (99.9)	99.6 (98.0)	97.3 (97.4)	98.0 (100)
I/ σ (I)	12.6 (1.0)	17.5 (2.4)	22.6 (2.3)	7.7 (2.7)	12.7 (2.3)	8.5 (2.3)
R _{merge}	0.06 (1.66)	0.08 (1.04)	0.09 (1.28)	0.27 (0.92)	0.07 (0.51)	0.17 (0.75)
R _{meas}	0.07 (1.81)	0.08 (1.12)	0.09 (1.28)	0.31 (1.06)	0.08 (0.65)	0.21 (0.91)
CC _{1/2} (%)	99.9 (37.8)	99.9 (82.7)	100 (98.3)	98.2 (75.7)	99.7 (74.5)	99.1 (74.0)
Wilson B–factor (Å ²)	25.8	11.1	59.8	31.4	17.7	33.63
Código PDB	–	–	–	6FSL	6FSK	–

1.4. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y REFINAMIENTO DE LOS MODELOS:

1.4.1. DYP1 DE *A. AURICULA–JUDAE*:

Las estructuras tridimensionales de las DyP de *A. auricula–judae* se determinaron mediante el método de reemplazo molecular. La primera estructura que se resolvió fue la de la proteína nativa. Para ello se utilizó un asistente instalado en el paquete de programas PHENIX (Adams et al. 2010) denominado AutoMR (“Automated Molecular Replacement”) que contiene una interfaz que conecta el programa PHASER (McCoy et al. 2007) con una utilidad para el modelado automático (AutoBuild). Como modelo inicial se utilizó la estructura de DyP de *Bjerkandera adusta* (código PDB: 3AFV) (Yoshida et

al. 2011) con la que presenta un 54.1% de homología de secuencia. El alineamiento se muestra en la **Figura 18**.



Figura 18. Alineamiento de secuencias de DyP de *B. adusta* y *A. auricula-judae*. Los aminoácidos estrictamente conservados se muestran sobre fondo rojo. Los residuos con características similares aparecen sobre fondo amarillo y en negrita. La estructura secundaria de la enzima de *B. adusta* (Yoshida et al. 2011) se muestra sobre el alineamiento de secuencias.

La búsqueda de la solución por reemplazo molecular para el mutante F359G se realizó con el modelo estructural obtenido y refinado de la proteína nativa, utilizando el programa PHASER (McCoy et al. 2007) en un rango de resolución comprendido entre 50 y 3.5 Å. Las soluciones de la función de rotación y de su correspondiente función de traslación que presentaron mejores estadísticas (TFZ [“final translation function Z score”] y LLG [“log-likelihood gain”]) se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Parámetros obtenidos mediante reemplazo molecular para *AauDyP1*.

	Función de rotación			Función de translación			LLG	TFZ
Nativa	40.84	-50.57	65.42	0.81	0.00	0.34	576	10.57
F359G	35.1	82.2	359.6	-0.51	-0.52	-0.03	17516	59.3

Para el mutante L357G con el mismo grupo espacial y parámetros de celdilla similares a los de F359G, se utilizó el modelo estructural de este último para calcular los primeros mapas de densidad electrónica, después de un primer refinamiento de cuerpo rígido con el programa REFMAC (Vagin et al. 2004).

Con los modelos iniciales se procedió a un refinamiento de cuerpo rígido seguido de un refinamiento restringido (“*restrained refinement*”) que nos permitieron calcular los mapas de densidad electrónica $2F_o - F_c$ y $F_o - F_c$, sobre los que se ajustaron aquellas zonas diferentes al modelo inicial en un proceso iterativo de sesiones gráficas de construcción y afinamiento. Una vez que el ajuste de las estructuras alcanza la convergencia, se procede a incorporar las moléculas de agua visibles en la densidad electrónica. Este paso implica que la red de puentes de hidrógeno, que se establece con los átomos de la cadena polipeptídica, cumpla unos requerimientos geométricos mínimos entre los grupos aceptores y donadores. Según avanzamos en el ajuste y refinado de la estructura comienza a aplicarse el método de máxima verosimilitud o “*Maximum-Likelihood Method*” (Tronrud 2004). Los valores estadísticos más representativos para cada uno de estos modelos en el refinamiento final se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Estadísticas obtenidas en la construcción y refinamiento de los modelos de *AauDyP1*.

REFINAMIENTO	Nativa	L357G	F359G
Resolución (Å)	39.4–1.8	44.7–2.0	41.3–1.1
Completitud (%)	97.0	99	98.2
R_{work}	0.19	0.20	0.15
R_{free}	0.24	0.23	0.16
ÁTOMOS NO HIDRÓGENOS			
Proteína	13217	6543	6543
Grupo Hemo	172	43	43
Iones	–	–	–
H₂O	1564	127	576
DESVIACIÓN CUADRÁTICA MEDIA (RMS)			
Longitud de enlace (Å)	0.01	0.01	0.01
Ángulos de enlace (°)	1.2	0.88	0.99
RAMACHANDRAN			
Favorable (%)	97.9	96.8	97.3
Permitido (%)	2.0	3.0	2.7
Valor atípico (%)	0.1	0.2	0
Código PDB	4W7J	5IKG	5IKD

Durante los ciclos de refinado y ajuste manual del modelo, se van revisando los valores de los parámetros R_{work} y R_{free} resultantes de cada sesión de refinado. Como se mencionó en Materiales y Métodos, estos parámetros indican el grado de acuerdo entre la densidad electrónica experimental y la calculada a partir del modelo. En la **Tabla 7** observamos que todos los valores de R_{work} son inferiores al 25%, obteniéndose un 19% y un 20% para la enzima nativa y el mutante L357G, respectivamente, mientras que el mutante F359G presenta un valor del 15%. Por otro lado, si comparamos estos valores con los obtenidos con el parámetro R_{free} se alcanza una diferencia máxima del 5% en la estructura nativa, reduciéndose a un 4% para el mutante L357G y un 1% en F359G. El valor de estos indicadores y su poca variabilidad durante los últimos ciclos de refinado, nos llevaron a iniciar la validación de los modelos.

Inicialmente, se utilizaron las herramientas de validación del programa COOT (Emsley and Cowtan 2004) para obtener los diagramas de Ramachandran (Wlodawer 2017) y el análisis de rotámeros.

Como se mencionó en Materiales y Métodos, el diagrama de Ramachandran muestra el estado de los ángulos de enlace de la cadena peptídica. En la **Figura 19** se recogen los gráficos de la enzima nativa y los mutantes de *A. auricula-judae*.

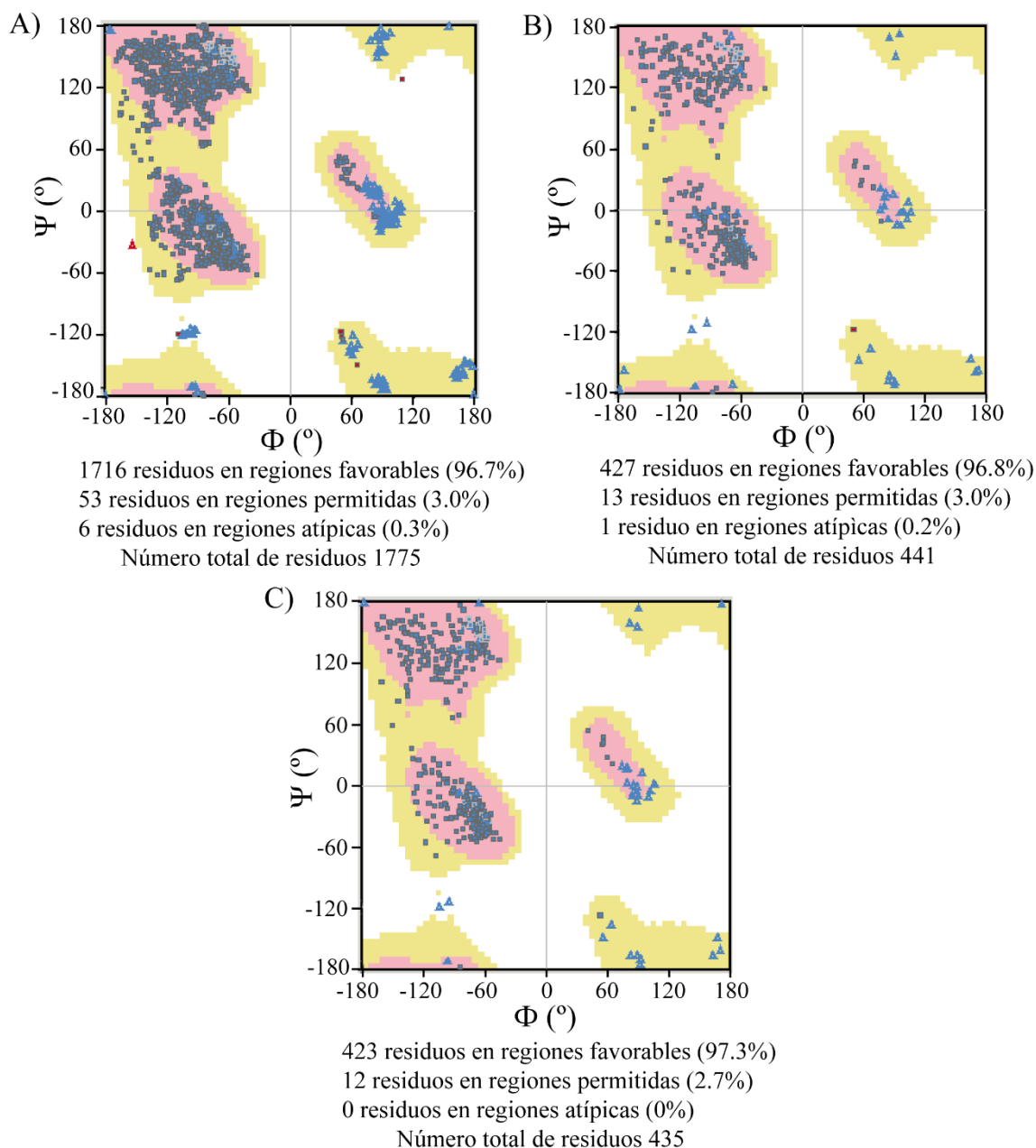


Figura 19. Diagramas de Ramachandran de los modelos estructurales de *AauDyP1*. A) *AauDyP1* nativa, B) L357G, C) F359G. Se muestran en rosa las regiones más favorables, en amarillo–naranja las regiones permitidas y en blanco las zonas no favorables.

En el diagrama de Ramachandran se considera que cada átomo presenta una dimensión similar a su radio de van der Waals. Así se delimitan las zonas donde los ángulos del enlace peptídico producen impedimentos estéricos (en blanco), las regiones naranjas abarcan disposiciones permitidas siendo más permisivos con la cercanía de los átomos y las zonas rosas corresponden a conformaciones sin impedimentos estéricos. Las glicinas se representan con triángulos ya que presentan menos restricciones en la disposición de los enlaces peptídicos, debido a la ausencia de cadena lateral.

Como se muestra en la **Figura 19**, en la estructura nativa hay un porcentaje de residuos en las zonas favorables y permitidas del 99.7% mientras el mutante L357G presenta un 99.8% y en F359G el 100%. El bajo porcentaje de residuos en las regiones menos favorecidas indican la excelente calidad de los modelos estructurales.

Posteriormente, mediante POLYGON (Urzhumtseva et al. 2009) comprobamos la geometría de los modelos. La bondad de los modelos finales queda reflejada, además, por el ajuste de la estructura en los mapas de densidad electrónica. Como muestras representativas, en la **Figura 20** se aprecia el ajuste de una sección de la cadena polipeptídica (Met331–Tyr337) de las estructuras de *AauDyP1* y sus mutantes, a sus densidades electrónicas.

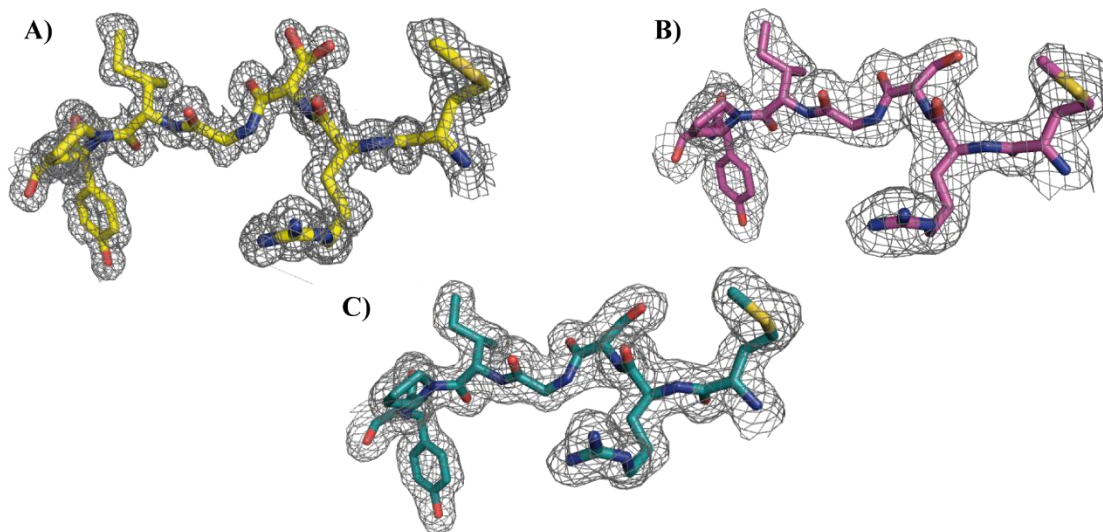


Figura 20. Mapas de densidad electrónica ($2F_o-F_c$) de la región comprendida entre Met331 y Tyr337 para los modelos estructurales de *A. auricula-judae*. A) *AauDyP1* nativa en amarillo, B) L357G en magenta, C) F359G en azul.

1.4.2. DYP4 DE *P. OSTREATUS*:

La obtención de las fases de las estructuras de *PleosDyP4* nativa y sus mutantes se realizó mediante reemplazo molecular. En la primera estructura resuelta, la del mutante F194Y se utilizó el modelo estructural de *B. adusta* (código PDB: 3AFV) (Yoshida et al. 2011) como modelo conocido y se empleó el programa MOLREP (Vagin et al. 2004) del paquete informático “*Collaborative Computational Project number 4*” (CCP4). Utilizamos como modelo de búsqueda la estructura de DyP de *B. adusta* ya que presenta mayor homología de secuencia (43.9%), que la de *A. auricula-judae* (40.2%), como se muestra en la **Figura 21**.

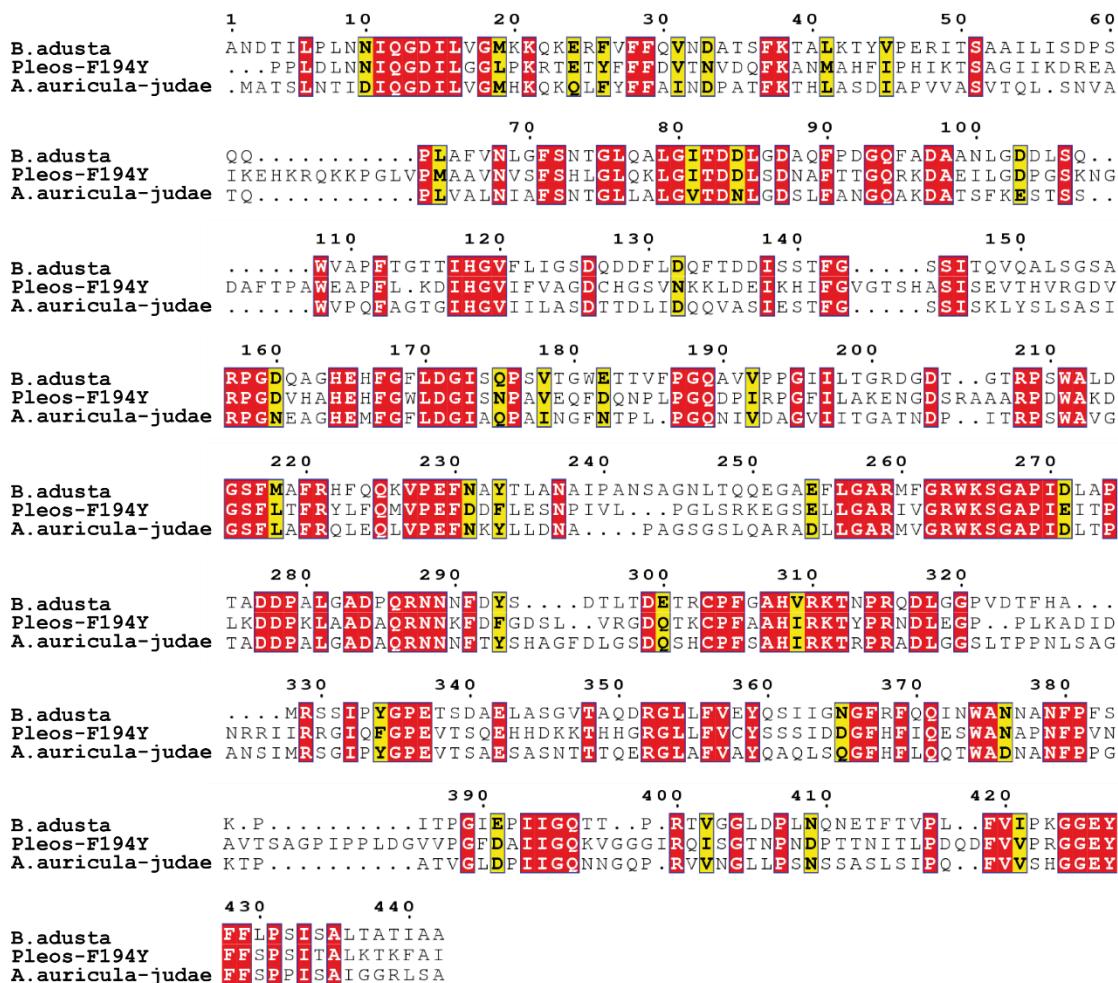


Figura 21. Alineamiento de secuencias de DyP de *P. ostreatus*, *B. adusta* (código PDB:3AFV) y *A. auricula-judae* (código PDB:4W7J). En letra blanca sobre fondo rojo destacan los residuos estrictamente conservados, mientras los residuos de características similares se muestran en negrita sobre fondo amarillo.

Tras construir y refinar la estructura del mutante F194Y, utilizamos las coordenadas finales para resolver mediante reemplazo molecular las estructuras de los demás mutantes y de la enzima nativa. Para ello, utilizamos de nuevo el programa MOLREP (Vagin et al. 2004) obteniéndose las funciones de rotación y translación que se detallan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Reemplazo molecular de *PleosDyP4* y sus mutantes

	Función de rotación			Función de translación			TFZ
F194Y	91.25	164.12	163.45	-0.23	0.25	-0.14	24.57
E190A	91.33	0.32	59.78	0.22	-0.13	-0.07	21.94

Una vez obtenidos los modelos iniciales se realizaron las primeras etapas de refinado y ajuste manual del modelo. Durante estas, hemos utilizado un ajuste de cuerpo rígido (“*Rigid body*”) y un refinamiento parcialmente restringido mediante el programa REFMAC (Vagin et al. 2004). Con los modelos sucesivos refinados, se calculan los mapas de densidad electrónica ($2F_o - F_c$ y $F_o - F_c$) sobre los que ajustamos el modelo, modificando y construyendo las zonas que no se ajustan a la densidad electrónica. Para ello utilizamos el programa COOT (Emsley and Cowtan 2004). Este proceso es iterativo, con varios ciclos de refinado y ajuste, antes de alcanzar la concordancia adecuada entre densidad electrónica y modelo. En los últimos pasos se incorporan las moléculas de agua, que se disponen dentro de la densidad electrónica teniendo en cuenta las características de los aminoácidos de su entorno. En la **Tabla 9** se muestran los parámetros finales obtenidos después del refinado de las estructuras de *PleosDyP4* y sus mutantes.

Tabla 9. Estadísticas del refinado de *PleosDyP4* y sus mutantes.

REFINADO	Nativa	Nativa– Mn	E190A	F194W	F194Y	D196A
Resolución (Å)	88.3–1.6	88.3–1.2	69.7–2.4	88.4–2.5	70.2–1.6	60.3–2.3
Completitud (%)	99.7	98.9	99.9	99.5	97.1	97.9
R_{work}	0.16	0.15	0.20	0.18	0.16	0.18
R_{free}	0.20	0.17	0.26	0.24	0.20	0.22
ÁTOMOS NO HIDRÓGENOS						
Proteína	7506	3757	3768	7496	7484	7495
Grupo Hemo	84	43	43	86	86	86
Iones	–	1 Mn 1 Na	–	–	–	2 Na
H₂O	861	586	13	184	1119	563
DESVIACIÓN CUADRÁTICA MEDIA (RMS)						
Longitud de enlace (Å)	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01
Ángulos de enlace (°)	1.9	1.9	1.6	1.6	2.0	1.4
RAMACHANDRAN						
Favorable (%)	97.0	96.7	95.3	98.0	97.8	97.1
Permitido (%)	2.7	2.9	4.3	1.9	2	2.6
Valor atípico (%)	0.3	0.4	0.4	0.1	0.2	0.3
Código PDB	–	–	–	6FSL	6FSK	–

En los mutantes de *PleosDyP4* los valores de R_{work} son inferiores al 25%, siendo el mutante E190A el que presenta un R_{work} más elevado (20%), en F194W y D196A obtuvimos un 19% y finalmente la estructura nativa y el mutante F194Y presentaban el valor más bajo (16%). Comprobamos la diferencia entre R_{work} y R_{free}, siendo la más elevada la obtenida para los mutantes E190A y F194W con una diferencia del 6%,

mientras en el resto de estructuras es del 4%, excepto en el complejo de la enzima nativa con Mn^{2+} que es del 2%.

Las estructuras se validaron inicialmente mediante las herramientas del programa COOT (Emsley and Cowtan 2004). Realizamos análisis de rotámeros para comprobar la disposición de las cadenas laterales, ajustando las más alejadas de las restricciones estereoquímicas. Posteriormente, revisamos los diagramas de Ramachandran (Wlodawer 2017). En la **Figura 22** y **Figura 23** se muestran los diagramas obtenidos de las estructuras de *PleosDyP4* y sus mutantes.

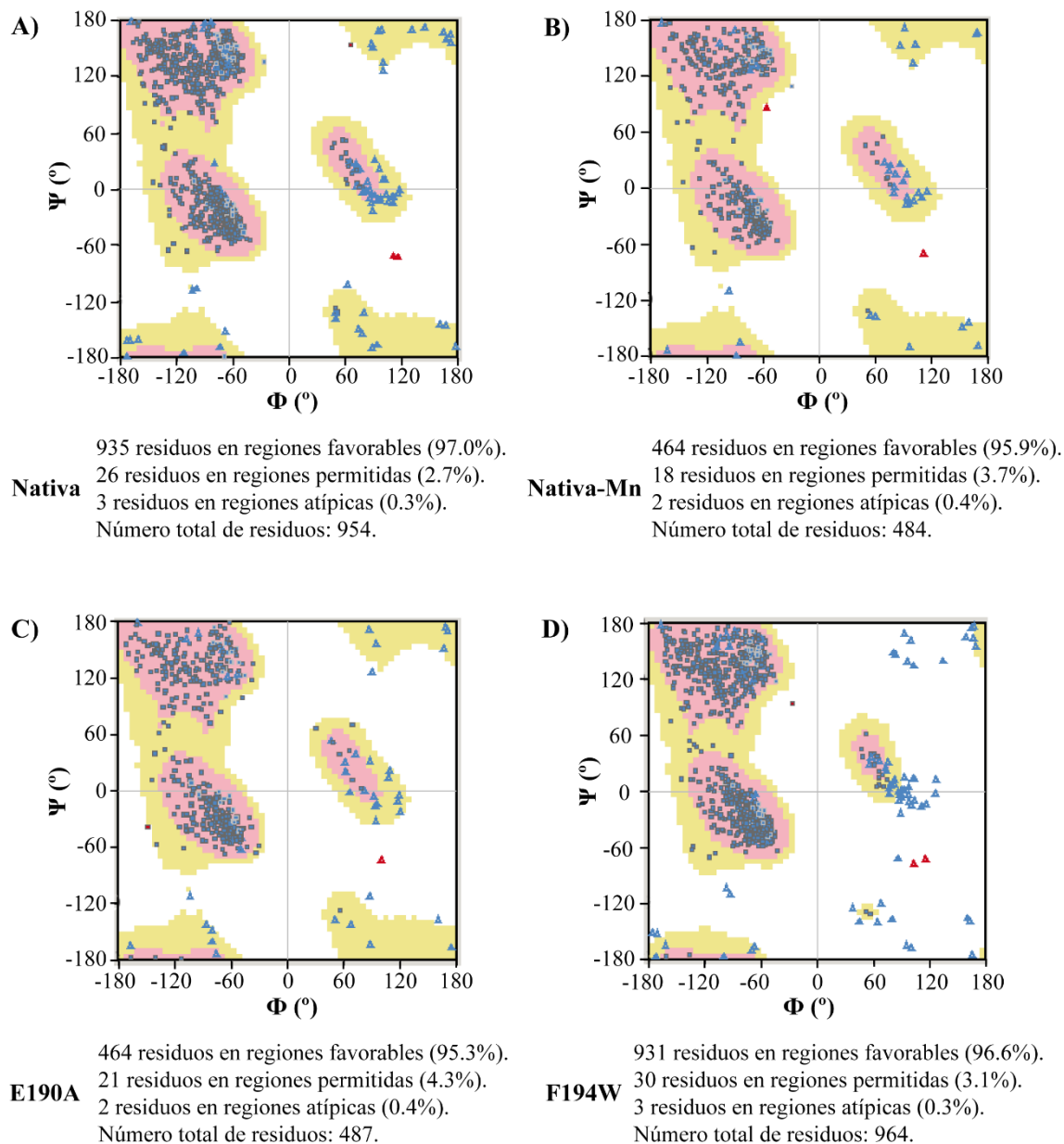


Figura 22. Ramachandran de las estructuras de *PleosDyP4*, el complejo con manganeso y los mutantes E190A y F194W. En rosa se muestran las regiones favorables, en naranja las regiones permitidas y en blanco las regiones inusuales. Los residuos se representan como triángulos (Glicinas) o cuadrados de color azul en regiones favorables o aceptables, o rojo en regiones atípicas

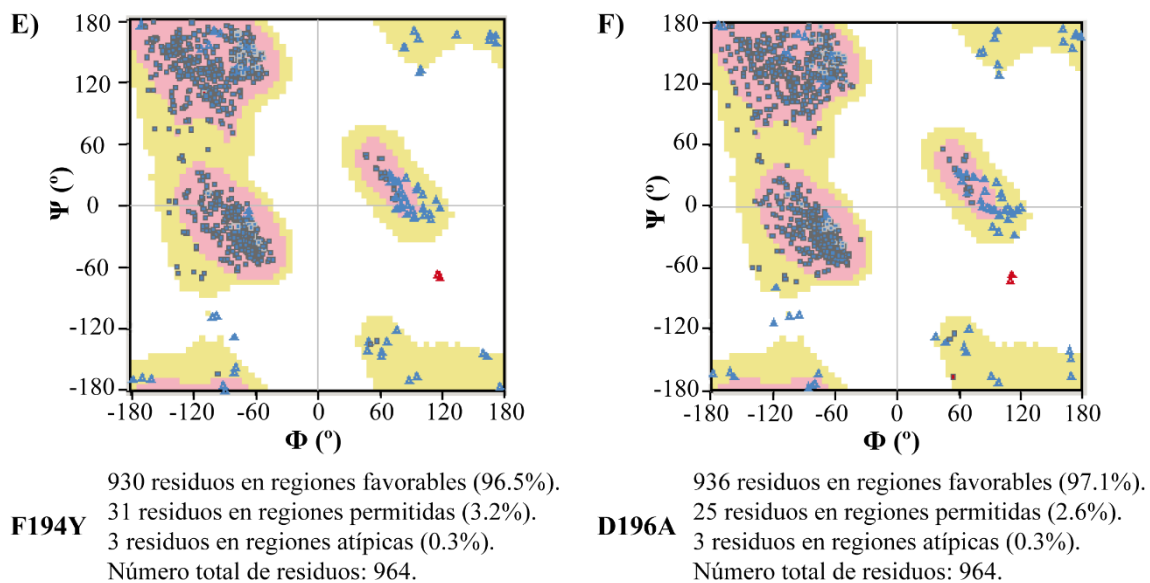


Figura 23. Ramachandran de las estructuras de *PleosDyP4* y los mutantes F194Y y D196A. En rosa se muestran las regiones favorables, en naranja las regiones permitidas y en blanco las regiones inusuales. Los residuos se representan como triángulos (Glicinas) o cuadrados de color azul en regiones favorables o aceptables, o rojo en regiones atípicas.

En los diagramas de Ramachandran comprobamos que todas las estructuras presentan un alto porcentaje de residuos situados en las zonas favorables y permitidas, del 99.6 o 99.7%.

Finalmente, utilizamos el programa POLYGON (Urzhumtseva et al. 2009) para comprobar la geometría de los modelos. La calidad de los modelos finales queda reflejada además por el ajuste de la estructura en los mapas de densidad electrónica. En la **Figura 24** se muestra el ajuste de una parte de la cadena aminoacídica (Ile358 – Phe365) de los modelos estructurales obtenidos, a su correspondiente densidad electrónica ($2F_o - F_c$).

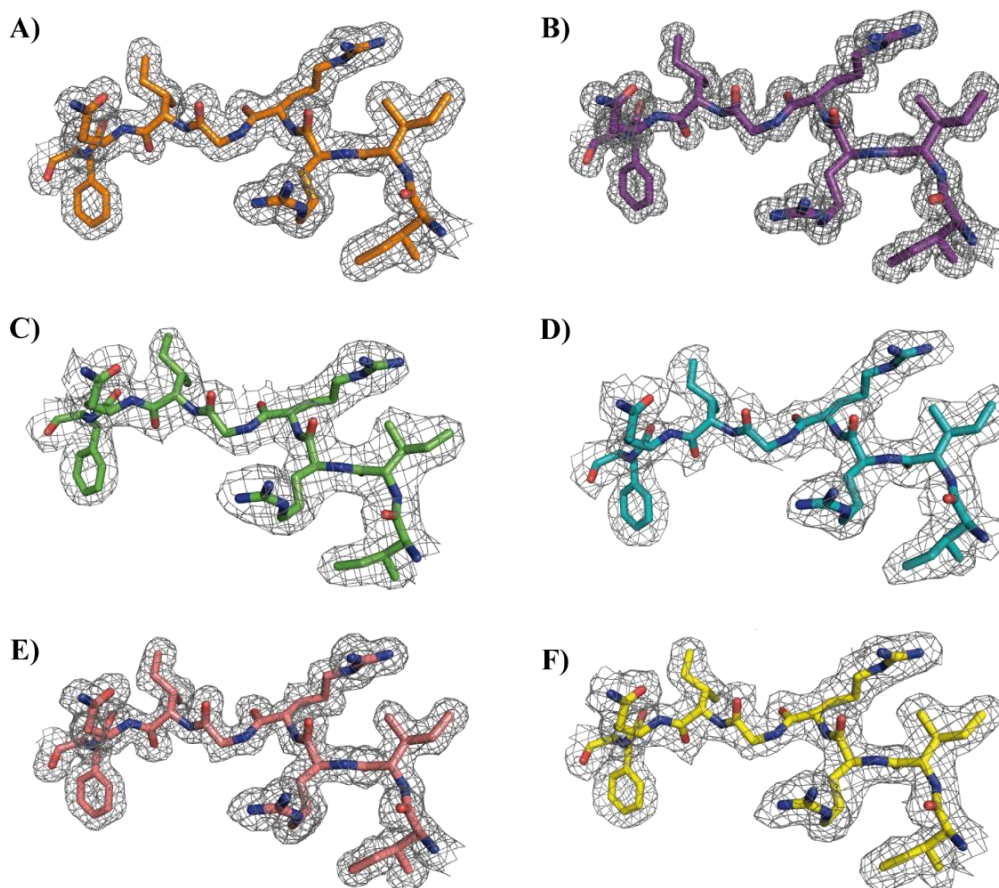


Figura 24. Fragmentos de los mapas de densidad electrónica de *PleosDyP4* y sus mutantes de una sección de la cadena polipeptídica (Ile358 – Phe365). La densidad electrónica ($2F_o - F_c$) se representa mediante una red de color gris. **A)** *PleosDyP4* nativa a una resolución de 1.6 Å. **B)** Complejo *PleosDyP4*-Mn a una resolución de 1.2 Å. **C)** E190A a 2.4 Å. **D)** F194W a 2.5 Å. **E)** F194Y a 1.6 Å. **F)** D196A a 2.3 Å de resolución.

2. MODELOS ESTRUCTURALES:

2.1. *AAUDYP1* Y SUS MUTANTES:

La estructura secundaria de *AauDyP1* está caracterizada por dos dominios mixtos, el dominio N-terminal y el C-terminal. Cada uno de ellos presenta una β -lámina central, compuesta por cuatro cadenas β antiparalelas y varias α -hélices. Como se muestra en la **Figura 25** en el dominio N-terminal hay seis α -hélices ($\alpha 1 - \alpha 6$) alrededor de la β -lámina central ($\beta 1 - \beta 4$). Las cadenas que componen esta β -lámina central presentan entre siete y diez aminoácidos. La unión o transición entre dominios contiene cuatro cadenas β de menor longitud que interaccionan dos a dos, así las cadenas $\beta 5$ y $\beta 6$ están formadas por tres y cuatro residuos y orientadas de forma antiparalela, mientras $\beta 7$ y $\beta 8$ presentan menor longitud (formadas por dos residuos cada una) y se orientan paralelamente. En cuanto al dominio C-terminal comprende siete α -hélices ($\alpha 7 - \alpha 13$) y dos cadenas β antiparalelas de cuatro aminoácidos ($\beta 12$ y $\beta 13$) rodeando la β -lámina central, que está formada por cadenas con una longitud entre siete y once residuos ($\beta 9$, $\beta 10$, $\beta 11$ y $\beta 14$).

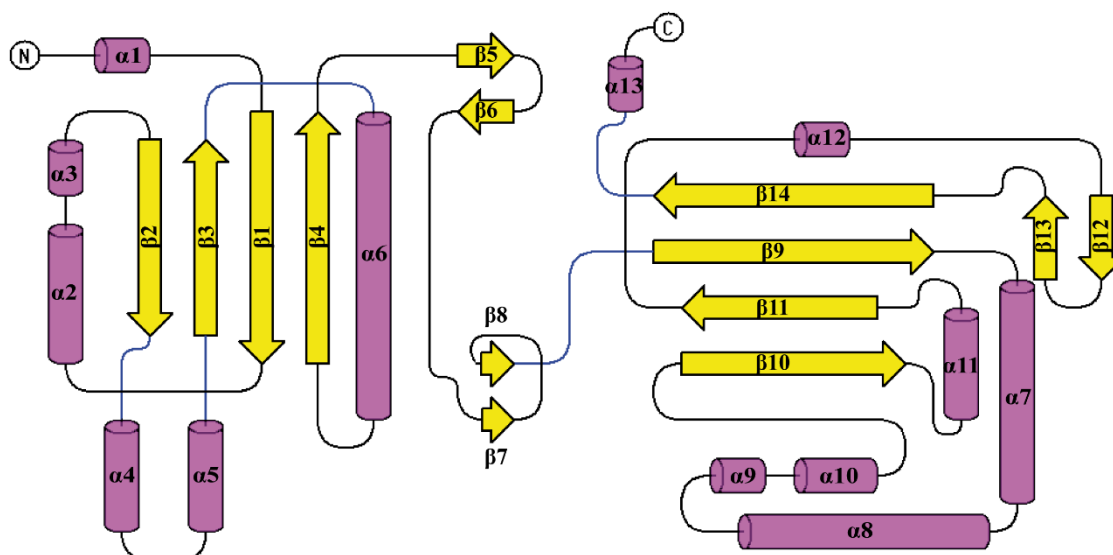


Figura 25. Estructura secundaria de AauDyP1. Se representan en amarillo las cadenas β y en magenta las α -hélices, numeradas secuencialmente desde el extremo N-terminal.

En las estructuras de AauDyP1 nativa y sus mutantes fue posible construir 445~446 aminoácidos, desde la Ser3 o Leu4 (en diferentes monómeros de la unidad asimétrica) hasta la Ala448. La enzima nativa y los mutantes tienen unas dimensiones aproximadas de 51 x 67 x 42 Å. La estructura secundaria, calculada con el programa DSSP (Kabsch and Sander 1983), está formada por un 30% de hélices y un 19% de cadenas β , el resto de la estructura (51%) está formada por "loops". Una revisión manual de estas estructuras, considerando una distancia inferior a 3.5 Å como óptima para los puentes de hidrógeno y α -hélices de no menos de una vuelta, nos da un resultado de un 20% de α -hélices (89 residuos) y el mismo porcentaje de cadenas β (88 aminoácidos) siendo el 60% de la estructura "loops" (328 residuos).

Al comparar la estructura de los mutantes L357G y F359G con la estructura nativa, observamos que todas ellas conservan la topología característica de la familia DyP (Linde, Ruiz-Dueñas, et al. 2015), con dos láminas β centrales que forman un barril β . Cada una de estas láminas β está compuesta por cuatro cadenas β antiparalelas enfrentadas entre sí y rodeadas por α -hélices con una arquitectura de α , β -sándwich (**Figura 26**).

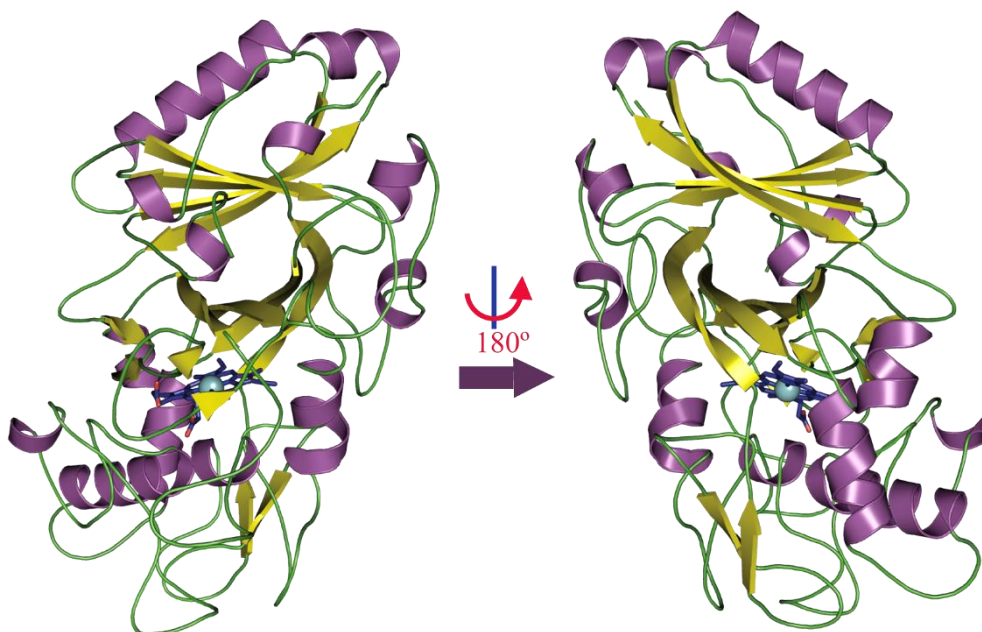


Figura 26. Estructura de AauDyP1 nativa. Se representan las cadenas β en amarillo, las α -hélices en magenta, los “loops” en verde y el grupo hemo en azul. La imagen de la derecha está rotada 180° sobre el eje y.

El barril β ocupa el núcleo de la estructura junto con el grupo hemo, mientras las α -hélices, las cadenas β de menor longitud y la mayoría de los “loops” quedan expuestas al solvente. Este barril β presenta las β -láminas centrales enfrentadas entre sí, con una rotación de 86° una con respecto a la otra, como se muestra en la **Figura 27**, y ocupa la zona distal del grupo hemo.

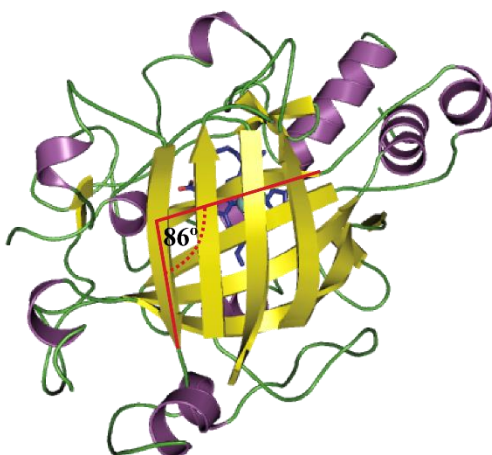


Figura 27. Detalle de las láminas β centrales de AauDyP1. Corte axial que muestra la disposición de las β -láminas de cada dominio.

En el dominio C-terminal se encuentra el grupo hemo que se aloja en una cavidad formada en su zona distal por la β -lámina central, en la región proximal por las hélices $\alpha 8$ y $\alpha 10$, y flanqueado lateralmente por las cadenas $\beta 7$, $\beta 8$ y la hélice $\alpha 7$, como se observa en la **Figura 28**.

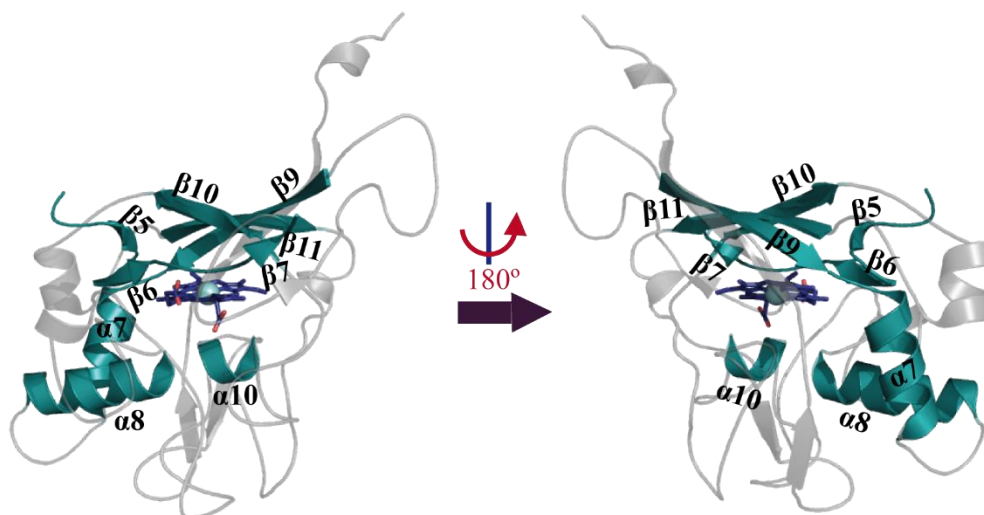


Figura 28. Dominio C-terminal de *AauDyP1*. Detalle de la posición central del grupo hemo en el dominio C-terminal.

En la **Figura 29** se muestran los residuos que interaccionan con el grupo hemo. La His304 forma parte de la hélice $\alpha 10$, que se encuentra en la zona proximal del grupo hemo y actúa como ligando del hierro central. En la cara distal están el motivo G165–F166–L167–D168–G169, que contiene el Asp168 (cadena $\beta 6$), y la Arg332 (cadena $\beta 10$) orientadas hacia el propionato del pirrol D del grupo hemo, haciendo que se incline hacia la zona distal. La Leu357 y la Phe359 (cadena $\beta 11$) están enfrentadas a la Arg332 y el Asp168 orientadas hacia los vinilos del grupo hemo.

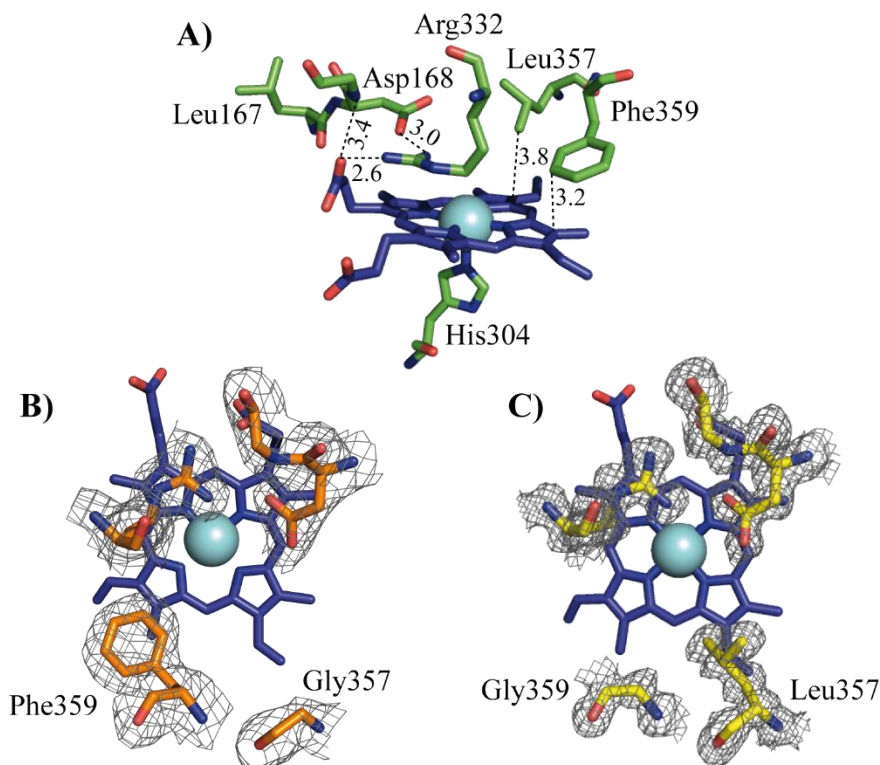


Figura 29. Entorno del grupo hemo de *AauDyP1*. A) Distancias (en Å) del grupo hemo a los residuos de su entorno. B y C) Zona distal del grupo hemo con las mutaciones L357G en naranja y F359G en amarillo. Con su respectiva densidad electrónica (gris).

La Leu357 y la Phe359 (objetos de este estudio) junto con la Arg332 y el Asp168 delimitan las dimensiones del canal de entrada al bolsillo hemo (**Figura 30**). Las mutaciones con las que hemos trabajado producen un aumento de las dimensiones de este canal. En la estructura nativa, en la entrada al bolsillo hemo, el canal tiene forma circular con un diámetro aproximado de 7 Å. En los mutantes esta entrada tiene una forma elíptica, el eje menor de la elipse mantiene los 7 Å correspondientes al diámetro del canal circular de la proteína nativa. El eje mayor en el mutante L357G es de unos 11 Å y en el mutante F359G este eje aumenta a unos 13 Å aproximadamente. En ambos mutantes la ampliación del canal se sitúa en la zona distal de los grupos vinilo.

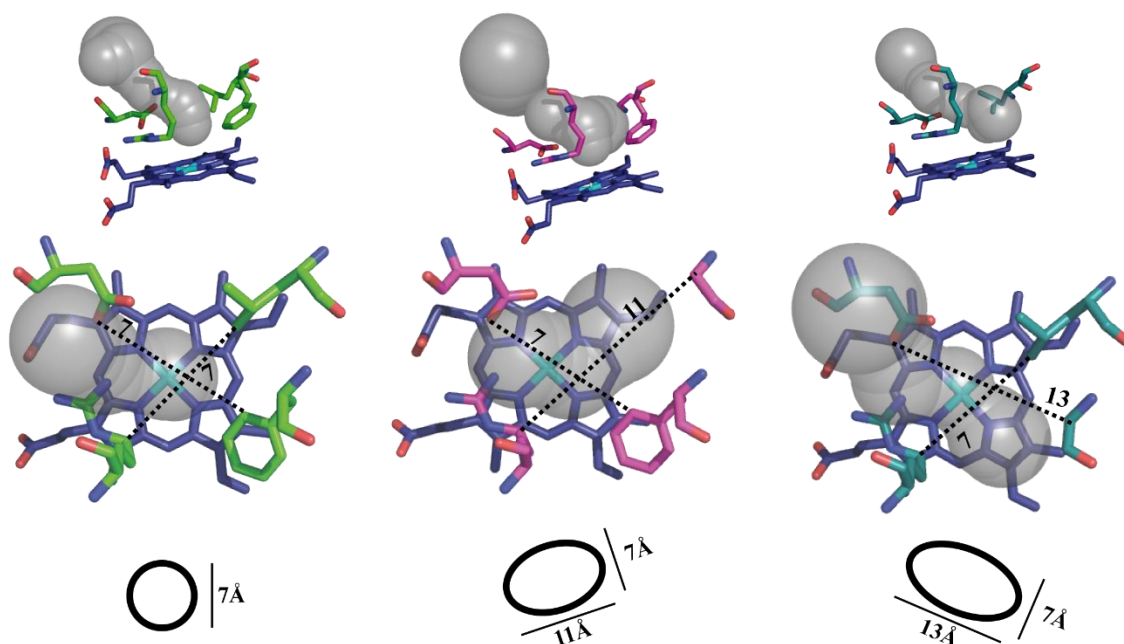


Figura 30. Dimensiones del canal de acceso al grupo hemo en las estructuras de *AauDyP1* nativa y sus mutantes. El canal de acceso se representa como una superficie gris. En la parte distal del cofactor hemo se encuentra la apertura del canal formada por los residuos: Asp168, Arg332, Leu357 y Phe359. **Izquierda)** Entorno distal del grupo hemo en *AauDyP1* nativa. **Centro)** En el mutante L357G. **Derecha)** En F359G. Las distancias entre los residuos que forman la entrada del canal se representan con líneas discontinuas (en Å). En la parte inferior de cada imagen, se muestra un esquema de la variación de su apertura.

2.2. PLEOSDYP4 Y SUS MUTANTES:

La estructura de *PleosDyP4* puede dividirse en dos dominios, N y C-terminal, similares a los anteriormente descritos en *AauDyP1*. Ambos presentan una β -lámina central en el dominio N-terminal formada por cuatro cadenas β antiparalelas de entre siete y doce aminoácidos ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ y $\beta 6$). En el dominio C-terminal, la β -lámina central está formada por cinco cadenas β ($\beta 11$, $\beta 12$, $\beta 13$, $\beta 14$ y $\beta 17$) tres de ellas de mayor longitud, entre diez y trece aminoácidos, mientras las cadenas $\beta 12$ y $\beta 13$ están formadas por cuatro y tres aminoácidos respectivamente, en lo que parece una escisión de una cadena de mayor longitud como la que presenta el modelo de *AauDyP1*. En ambos casos, estas β -láminas centrales están rodeadas de α -hélices ($\alpha 1 \sim \alpha 5$ en el N-terminal, y $\alpha 6 \sim \alpha 16$ en el C-terminal) y de dos cadenas β antiparalelas (N-terminal: $\beta 3$ y $\beta 4$ y C-terminal: $\beta 15$ y $\beta 16$). La transición de un dominio a otro está formada por una zona que comprende

cuatro cadenas β que interaccionan dos a dos, las más cercanas al dominio N-terminal ($\beta 7$ y $\beta 8$) dispuestas de forma antiparalela y las más alejadas de este dominio ($\beta 9$ y $\beta 10$) dispuestas de forma paralela (**Figura 31**).

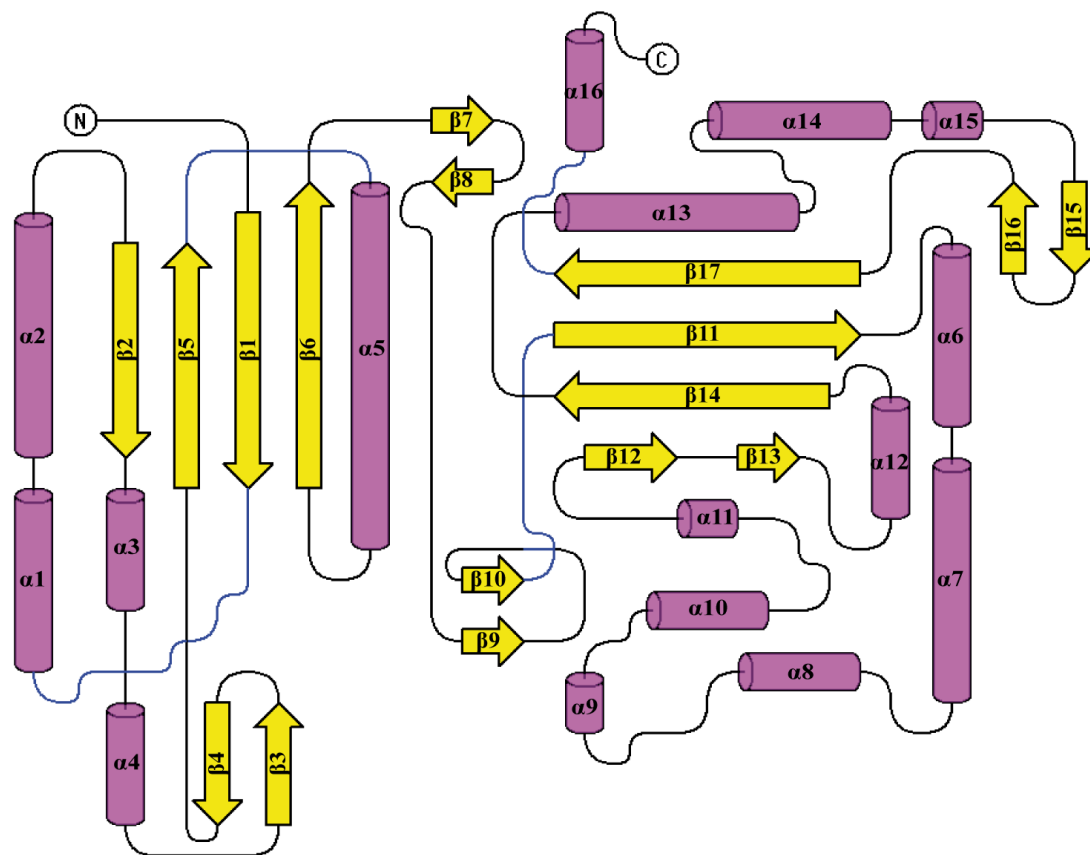


Figura 31. Estructura secundaria de *PleosDyP4*. Se representan en amarillo las cadenas β y en magenta las α -hélices, numeradas secuencialmente desde el extremo N-terminal.

En las estructuras de *PleosDyP4* nativa y sus mutantes fue posible construir de 484 a 486 aminoácidos, desde el residuo 6 (en todos los casos) hasta el 489 o 491, dependiendo de la proteína. Las dimensiones aproximadas de estas estructuras son de 62 x 72 x 67 Å, y presenta un 31% de hélices, un 19% de cadenas β y un 50% de “loops”, según los datos obtenidos en el programa DSSP (Kabsch and Sander 1983). Una revisión de las estructuras con los mismos criterios que los usados para *AauDyP1*, dio el siguiente porcentaje: un 31% de α -hélices (152 aminoácidos), un 23% de cadenas β (112 residuos), y un 46% de “loops” (225 aminoácidos).

PleosDyP4 conserva los motivos estructurales característicos de la familia DyP (Linde, Ruiz-Dueñas, et al. 2015) (**Figura 32**). La estructura presenta dos láminas β centrales enfrentadas formando un barril β rodeado de α -hélices y de las cadenas β laterales, de menor longitud, que envuelven tanto el barril β como al grupo hemo, con un plegamiento de α , β -sándwich.

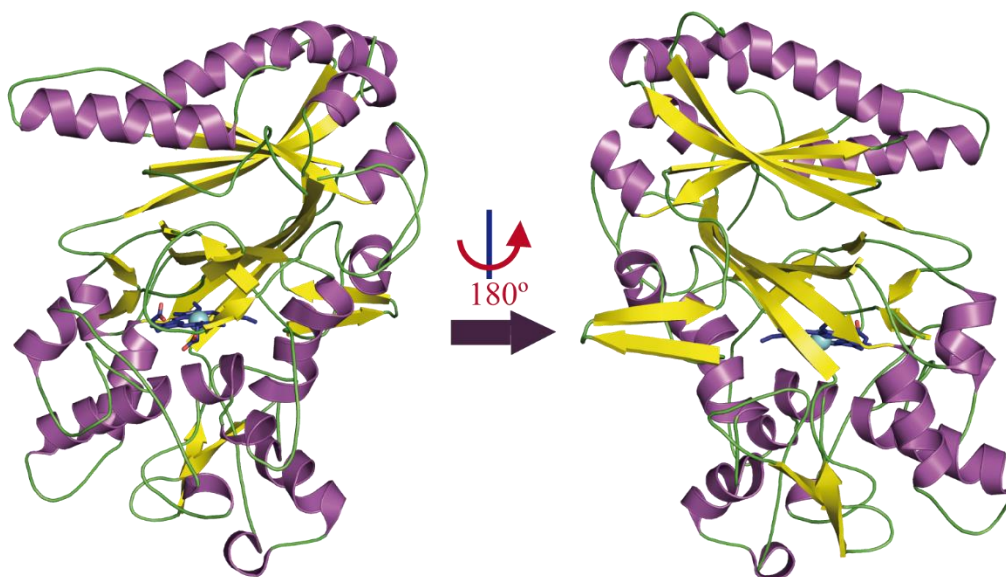


Figura 32. Estructura de *PleosDyP4* nativa. Se representan las α -hélices en magenta, las cadenas β en amarillo, los “*loops*” en verde y el grupo hemo en azul. La imagen de la derecha está rotada 180° sobre el eje y.

El barril β se sitúa en el núcleo proteico formando la zona distal del bolsillo hemo. Las β -láminas se disponen enfrentadas entre sí, con una rotación de 88° en el plano (**Figura 33**).

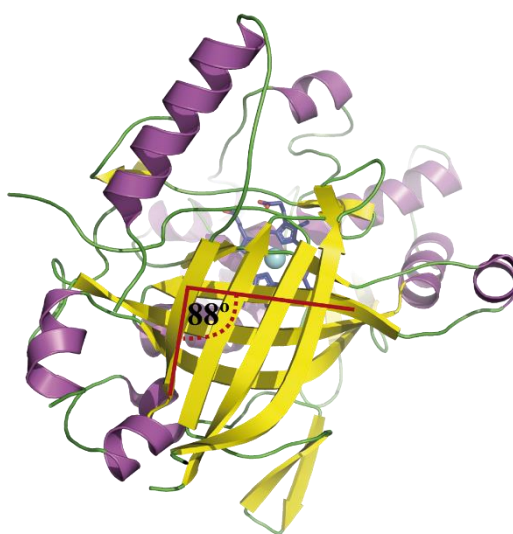


Figura 33. Detalle de las β -láminas centrales de *PleosDyP4*. Corte axial que muestra la disposición de las β -láminas de cada dominio.

El grupo hemo está alojado en el dominio C-terminal, en un bolsillo formado por la β -lámina central que cierra la zona distal y las hélices $\alpha 7$ y $\alpha 10$ que delimitan la zona proximal. Las hélices $\alpha 13$ y $\alpha 6$, y las cadenas $\beta 7$ y $\beta 8$ se sitúan en los laterales, como puede observarse en la **Figura 34**.

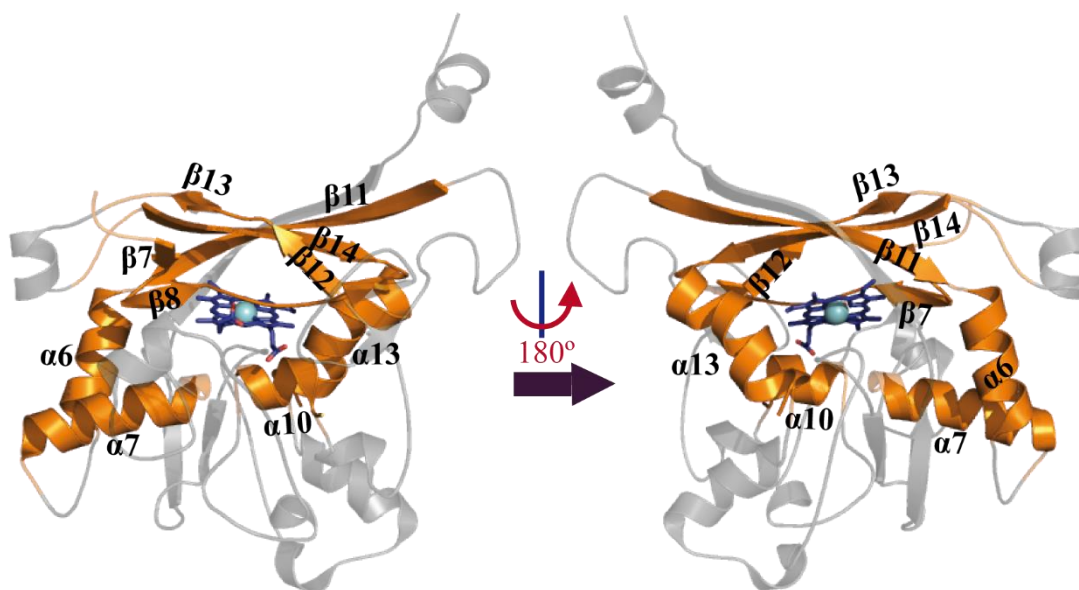


Figura 34. Dominio C-terminal de *PleosDyP4*. Detalle de la posición del grupo hemo en el dominio C-terminal.

En la **Figura 35** se muestran los residuos del entorno del grupo hemo y las distancias entre los átomos que interactúan entre sí. En la zona distal del grupo hemo se sitúa el Arg360 ($\beta 12$) y el motivo G193–F194–L195–D196–G197, en el que se encuentra el Asp196 ($\beta 8$). Estos dos residuos participan en la ruptura heterolítica del H_2O_2 durante la activación de la enzima y estabilizan el bolsillo hemo interaccionando con el propionato del pirrol D, que se inclina hacia la zona distal. La His334 forma parte de la hélice $\alpha 10$, que se sitúa en la cara proximal e interactúa con el hierro de la porfirina.

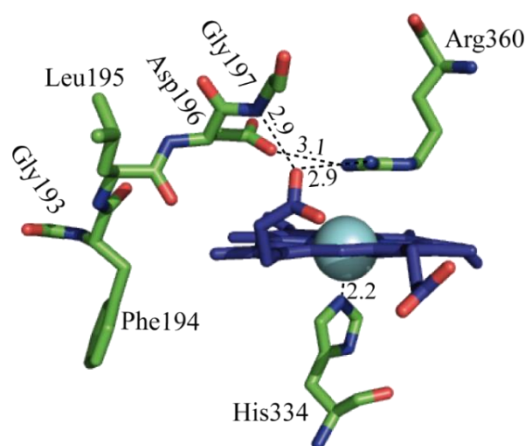


Figura 35. Entorno del grupo hemo de *PleosDyP4*. Elementos conservados: la arginina y el ácido aspártico catalíticos, junto con el motivo GFLDG situados en la zona distal y la histidina en la zona proximal. Las líneas discontinuas representan las distancias entre átomos en Å.

En la **Figura 36** se muestra la densidad electrónica de los diferentes mutantes de *PleosDyP4*. Se puede observar claramente la presencia de los residuos mutados.

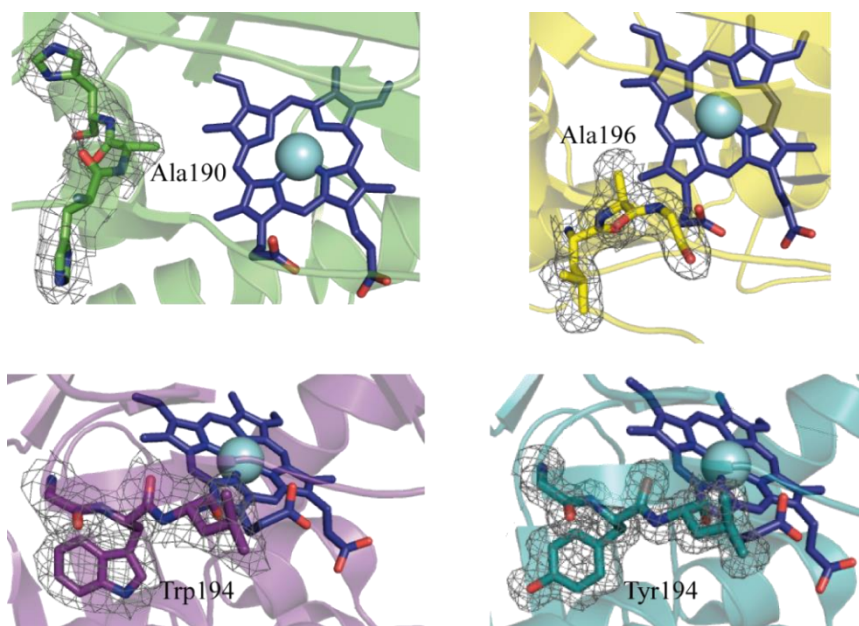


Figura 36. Residuos mutados en *PleoDyP4* dentro de su densidad electrónica. Detalle del mutante E190A en verde, D196A en amarillo, F194W en magenta y F194Y en cian.

Entre las estructuras obtenidas, destaca la estructura de la proteína nativa cocrystalizada en presencia de cloruro de manganeso ($MnCl_2$). En este modelo se aprecia un ion manganeso interactuando con una cavidad ácida formada por Asp215, Tyr339, Glu345, Asp352 y Asp354, situados en el entorno de la hélice α_{10} (**Figura 37**).

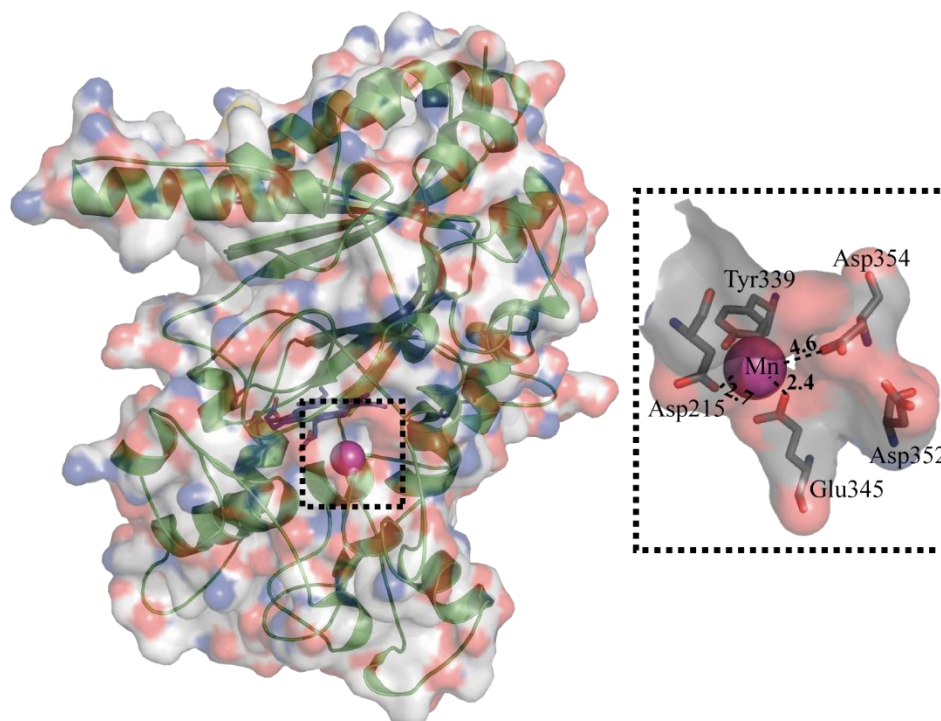


Figura 37. Localización del ion manganeso en la estructura de *PleoDyP4*. Superficie electrostática de la proteína con las cargas negativas en rojo y las positivas en azul. En el cuadro de la derecha se muestra una ampliación del sitio de unión del manganeso, mostrando con mayor detalle los residuos implicados en la unión y las distancias en Å.

3. ENSAYOS CINÉTICOS Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES:

3.1. AAUDYP1 Y SUS MUTANTES:

3.1.1. ANÁLISIS QUIRAL Y ENSAYOS CINÉTICOS:

Los productos de la oxidación de MPS y MTS por *AauDyP1* nativa y los mutantes L357G y F359G, se analizaron mediante cromatografía quiral. En los ensayos realizados con la proteína nativa no se observó actividad oxidativa sobre el MTS (**Tabla 10**) mientras que con el sustrato MPS se registró una actividad residual tras 6h de incubación. Curiosamente, la composición enantiomérica de los productos de reacción con las enzimas modificadas no es la misma. L357G produce mezclas racémicas de los sulfóxidos de metilfenilo y metil-p-tolil, mientras que F359G produce estereoselectivamente el enantiómero S. Tras la cromatografía se calcularon los excesos enantioméricos (ee) para cada uno de los mutantes. Para F359G, la oxidación de MPS y MTS fue del 92% y 99% respectivamente, para el enantiómero S, mientras que para el mutante L357G la sulfoxidación no fue estereoselectiva (**Tabla 10**).

Tabla 10. Análisis mediante cromatografía quiral de los productos de las reacciones de MPS y MTS resultantes de la catálisis con *AauDyP1* y sus mutantes.

		MPS	MTS
DyP nativa	Conversión	0	0
	Exceso enantiomérico	–	–
L357G	Conversión	92 %	65 %
	Exceso enantiomérico	2 % (S)	8 % (R)
F359G	Conversión	95 %	99 %
	Exceso enantiomérico	92 % (S)	99 % (S)

Los experimentos se completaron calculando, en cada caso, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) y el resto de constantes cinéticas del estado estacionario (k_{cat} y K_m) detalladas en la **Tabla 11**. Con el sustrato MPS, F359G mostró una eficiencia catalítica tres veces superior a la obtenida en la reacción catalizada por L357G, debido a un número de recambio (k_{cat}) dos veces mayor y una K_m más baja. Con el sustrato MTS no fue posible calcular las constantes cinéticas para el mutante L357G. Sin embargo, el mutante F359G presenta una mayor afinidad por MTS, con un valor de la constante de disociación de afinidad aparente (constante de Michaelis K_m) aproximadamente tres veces menor a la obtenida con MPS. Además, es el que presenta mayor velocidad en la formación de producto reflejada en la constante catalítica (k_{cat}), con un valor cinco veces superior para el sustrato MPS, que el obtenido con MTS.

Tabla 11. Constantes cinéticas de *AauDyP1* y sus mutantes para la oxidación de MPS y MTS.

		MPS	MTS
DyP1 nativa	k_{cat} (s^{-1})	0	0
	K_m (mM)	–	–
	k_{cat}/K_m ($s\ mM^{-1}$)	–	–
L357G	k_{cat} (s^{-1})	8.0 ± 0.5	0
	K_m (mM)	0.60 ± 0.08	–
	k_{cat}/K_m ($s\ mM^{-1}$)	13.3 ± 1.0	–
F359G	k_{cat} (s^{-1})	17.2 ± 0.9	3.6 ± 0.4
	K_m (mM)	0.37 ± 0.01	0.13 ± 0.03
	k_{cat}/K_m ($s\ mM^{-1}$)	45.9 ± 7.4	26.5 ± 3.8

3.1.2. ESTUDIOS COMPUTACIONALES:

Las simulaciones realizadas con PELE (Madadkar-Sobhani and Guallar 2013) en el Centro Nacional de Supercomputación de Barcelona, se hicieron para comprobar la accesibilidad de los sustratos MPS y MTS al bolsillo hemo y poder explicar la enantioselectividad de la reacción de sulfoxidación de uno de los mutantes. Para ello, se utilizaron las estructuras de cada uno de los mutantes y se calcularon las posibles trayectorias de acceso y las energías de interacción para cada uno de los sustratos. Se consideraron distancias inferiores a 5 Å como óptimas para que se produzca la reacción con el correspondiente sustrato. Estas se midieron desde el átomo del azufre del sustrato hasta el átomo de oxígeno del compuesto I (**Figura 16**).

Una vez los sustratos (MPS y MTS) acceden al bolsillo, deben posicionarse en la zona distal del grupo hemo e interactuar con el oxoferrilo, para seguidamente proceder a su oxidación. En las simulaciones realizadas se obtuvo una población significativa con los diferentes sustratos a una distancia cercana a los 3 Å y energías de interacción por debajo de -30 kcal/mol en los mutantes, a diferencia de la escasa población obtenida para la enzima nativa (**Figura 38**). En las energías de interacción destacan las obtenidas para el mutante L357G y MPS, con valores cercanos a -40 kcal/mol, y una distancia aproximada de 3.5 Å. En las poblaciones obtenidas por simulación en un rango de distancias (3 a 4 Å) y con energías de interacción menores de -30 kcal/mol, se obtuvo una gran diferencia entre ambos sustratos, con MPS se observó una densidad significativamente menor a las obtenidas con MTS como se muestra en la **Figura 38**.

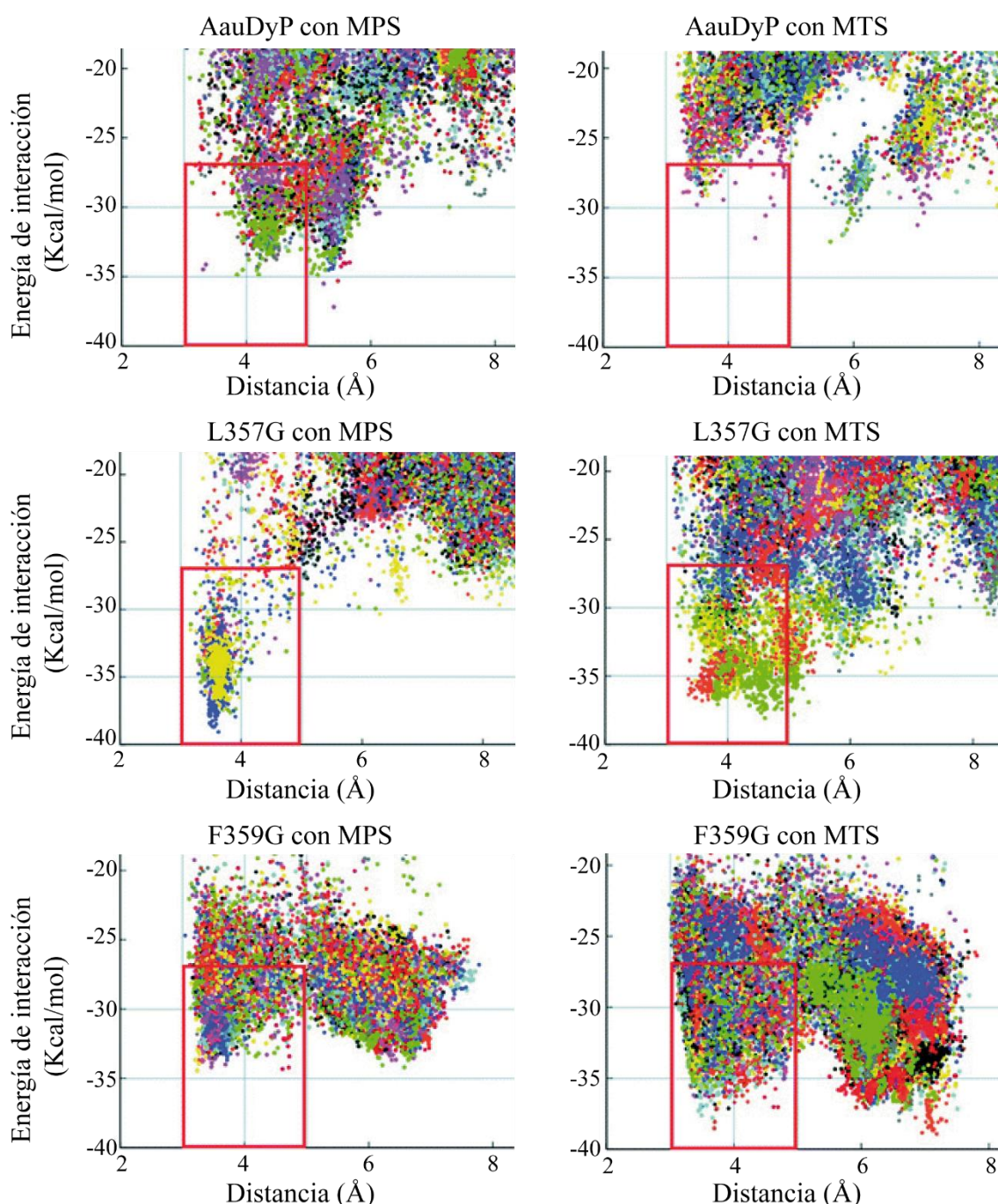


Figura 38. Simulaciones obtenidas por PELE de AauDyP1 y sus mutantes frente a MPS y MTS. Cada trayectoria se representa con un color, las distancias se midieron desde el oxígeno reactivo del compuesto I al azufre de los sustratos (MPS y MTS). Para el estudio de estereoselectividad se utilizaron las estructuras enmarcadas en el cuadro rojo. Figura Adaptada del trabajo publicado por Dolores Linde y *col.* (Linde et al. 2016).

En estas simulaciones PELE se compararon también las energías y distancias de interacción de cada enantiómero. Inicialmente se clasificaron los sustratos según el valor de los ángulos diedros (Φ) formados por el átomo de oxígeno del compuesto I, el azufre y los carbonos C1 y C2 del sustrato (**Figura 16**). Si Φ presenta valores comprendidos entre $40 - 140^\circ$ se consideró como potencial enantiómero R (pro-R), los sustratos con

valores entre -40 – -140° se clasificaron como potenciales S (pro-S) y el resto de valores de Φ se consideraron mixtos.

Las simulaciones PELE indican en ambos mutantes un mejor acceso al bolsillo hemo de los sustratos pro-R. Estos resultados difieren con los datos experimentales obtenidos en la cromatografía enantioselectiva del mutante F359G, que mostraba mayor conversión a enantiómeros S. Debido a esta contradicción, se realizaron simulaciones de mecánica cuántica y mecánica molecular, para caracterizar el entorno electrostático y la disposición de estos sustratos con respecto a las zonas más reactivas. Como se muestra en la **Tabla 12** los enantiómeros S, en las reacciones catalizadas por el mutante F359G, presentan un porcentaje de reacción muy superior a los obtenidos con el enantiómero R. Finalmente pese a la mayor accesibilidad de los enantiómeros R, hay una mayor reactividad y conversión del enantiómero S en las reacciones mediadas por el mutante F359G.

Tabla 12. Densidad de spin mediante simulaciones QM/MM de *AauDyP1* y el mutante F359G.

		Nativa	F359G
MPS	Enantiómero R	2.1%	0.8%
	Enantiómero S	3.2%	21.8%
MTS	Enantiómero R	3.1%	12.5%
	Enantiómero S	12.5%	25.8%

3.2. PLEOSDYP4 Y SUS MUTANTES:

3.2.1. ENSAYOS CINÉTICOS:

Para el estudio del sitio de oxidación del Mn^{2+} se prepararon diferentes mutantes y se compararon las constantes cinéticas del estado estacionario para la oxidación de Mn^{2+} y de ABTS con *PleosDyP4* nativa. Como se muestra en la **Tabla 13**, todas ellas presentan una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) ligeramente superior a la enzima nativa frente a ABTS, excepto los mutantes Y339A y D215A con valores levemente inferiores. Destaca el mutante D196A que no cataliza la oxidación de ninguno de los dos sustratos debido a que el Asp196, junto con la Arg360, participa en la desprotonación y posterior ruptura heterolítica del H_2O_2 necesaria para la activación enzimática.

Si observamos las cinéticas de oxidación de Mn^{2+} , el mutante Y339A presenta una pérdida de la actividad, lo que indica el papel determinante de este residuo. Destacan, además, los mutantes D215A, E345A y E345A/D352A/D354A que presentan una disminución en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de más de un orden de magnitud. El mutante D215A presenta un descenso notable en la afinidad por Mn^{2+} , con una K_m quince veces mayor que *PleosDyP4* nativa. El mutante E345A también tiene menor afinidad por el sustrato, con un valor de K_m que dobla al de la enzima nativa, pero el efecto de esta mutación es más significativo en la velocidad de conversión del sustrato que se reduce más de cincuenta veces.

Los mutantes F194W y F194Y pese a afectar al mismo residuo, presentan cinéticas distintas. Mientras el mutante F194Y muestra una eficiencia catalítica similar a la de la enzima nativa, la eficiencia del mutante F194W presenta una disminución cercana a un orden de magnitud. Esta disminución se produce por una disminución de la afinidad de F194W por el sustrato, con un valor de K_m tres veces superior al de la enzima nativa.

Tabla 13. Constantes cinéticas de estado estacionario de *PleosDyP4* y sus mutantes.

		Mn ²⁺ alta afinidad	Mn ²⁺ baja afinidad	ABTS
<i>PleosDyP4</i> nativa	k _{cat} (S ⁻¹)	56±2	–	277±24
	K _m (mM)	0.29±0.03	–	7.87±0.16
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	200±20	–	352±46
E190A	k _{cat} (S ⁻¹)	32.3±0.4	–	94.5±5.5
	K _m (mM)	0.16±0.01	–	0.14±0.03
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	208±11	–	666±88
F194W	k _{cat} (S ⁻¹)	61 ± 1.1	–	186.3±10.9
	K _m (mM)	1.06±0.07	–	0.40± 0.07
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	57± 3	–	426 ± 58
F194Y	k _{cat} (S ⁻¹)	37.6±0.4	–	232.4 ± 21.2
	K _m (mM)	0.32±0.02	–	0.78±0.14
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	119±5	–	297 ± 27
D196A	k _{cat} (S ⁻¹)	0	–	0
	K _m (mM)	–	–	–
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	–	–	–
D215A	k _{cat} (S ⁻¹)	28±2	–	71±2
	K _m (mM)	4.4±1.0	–	0.32±0.03
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	6±0	–	223±14
Y339A	k _{cat} (S ⁻¹)	0	–	234±6
	K _m (mM)	–	–	0.57±0.05
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	0	–	241±26
E345A	k _{cat} (S ⁻¹)	1±0	–	172±6
	K _m (mM)	0.63±0.09	–	0.42±0.06
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	2±0	–	414±50
D352A	k _{cat} (S ⁻¹)	13±2	40±3	157±8
	K _m (mM)	0.35±0.12	3.5±0.9	0.41±0.07
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	36±0	11±1	388±5
D354A	k _{cat} (S ⁻¹)	10±0	39±2	169±7
	K _m (mM)	0.26±0.2	4.3±0.7	0.42±0.07
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	39±1	9±1	407±5
D352A/D354A	k _{cat} (S ⁻¹)	25±1	73±5	223±11
	K _m (mM)	0.3±0.04	2.3±0.7	0.5±0.08
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	85±5	32±4	450±27
E345A/D352A/D354A	k _{cat} (S ⁻¹)	11±0	0	202±5
	K _m (mM)	0.4±0.16	–	0.38±0.04
	k _{cat} /K _m (S ⁻¹ mM ⁻¹)	8±0	–	533±44

El resto de mutantes D352A, D354A y D352A/D354A presentan una eficiencia catalítica un orden de magnitud menor que la de la enzima nativa, debido a una disminución menos acusada de la velocidad de formación del producto (k_{cat}). Estos mutantes (D352A, D354A y D352A/D354A) presentan cinéticas de actividad bifásicas (**Figura 39**), que nos han permitido calcular las constantes cinéticas dependiendo de si el sitio de unión es de alta o baja afinidad.

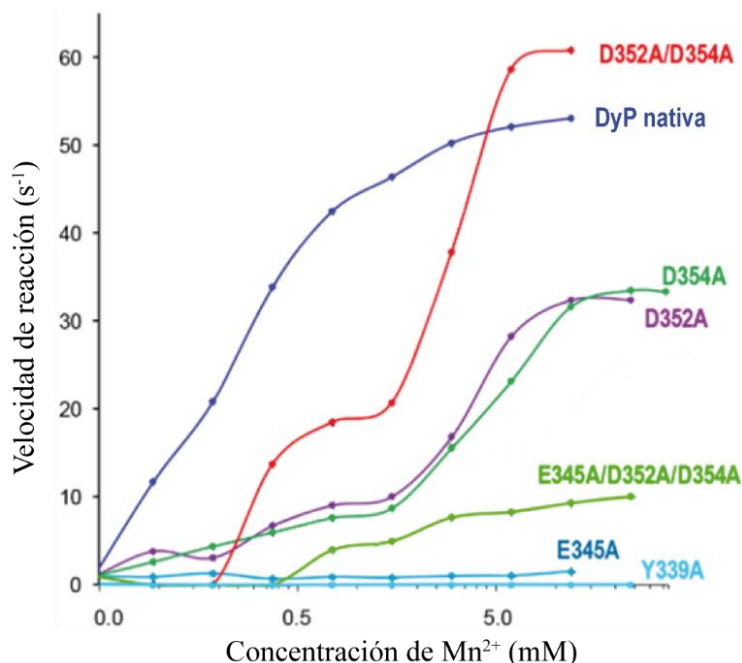


Figura 39. Cinéticas de oxidación de Mn^{2+} de *PleosDyP4* y sus mutantes con valores más representativos. Adaptada de “*Description of a Non-Canonical Mn (II) –Oxidation Site in Peroxidases*” (Fernández-Fueyo et al. 2018).

3.2.2. SIMULACIONES COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA:

Una vez resueltas las estructuras de *PleosDyP4* y de varios de sus mutantes, y contando con los datos obtenidos en las cinéticas de oxidación de Mn^{2+} , se realizó una simulación PELE para la difusión del Mn^{2+} . Los resultados (**Figura 40**) indican que el Asp354 es el que presenta una mayor densidad de población con mínimos de energía y distancias de interacción con el Mn^{2+} .

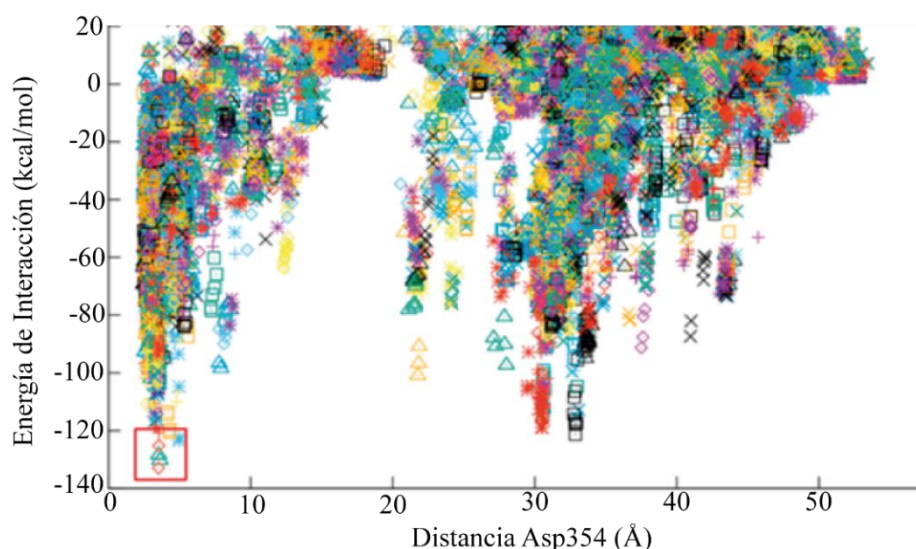


Figura 40. Simulación PELE de la difusión de Mn^{2+} en *PleodDyP4*. La distancia está medida desde el CG del carboxilo del Asp354. Adaptada del trabajo publicado por Elena Fernández-Fueyo y *col.* (Fernández-Fueyo et al. 2018).

El Asp354 está a una distancia de 20 Å del hierro del grupo hemo, por lo que debe establecerse una ruta de transferencia electrónica desde el Mn^{2+} , a través de la cadena polipeptídica hasta llegar al hierro. Para comprobar los residuos que podrían formar parte de esa cadena de transferencia electrónica, se realizaron simulaciones de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM). En estas simulaciones se calculan las densidades de spin para determinar los residuos más reactivos. Se obtuvo una mayor densidad de spin para la Thr338, la Tyr339 y el Trp405, como se muestra en la **Figura 41**. En este caso, la Tyr339 está a una distancia adecuada para realizar la transferencia electrónica desde el Glu345 a la Thr338.

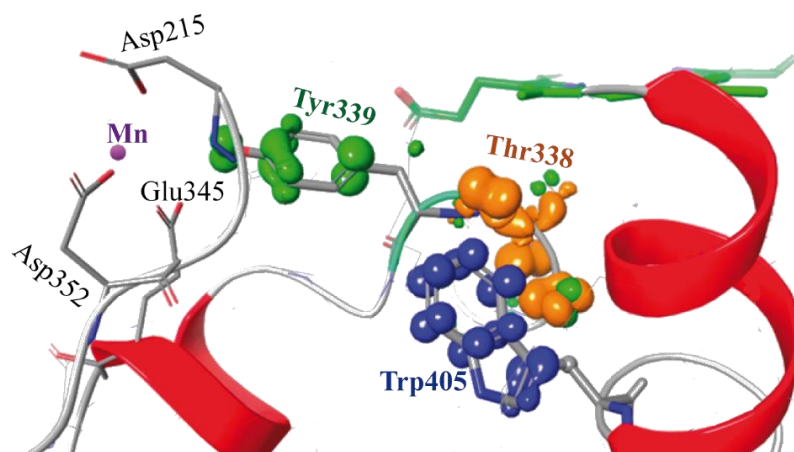


Figura 41. Simulación QM/MM de la cadena de transferencia electrónica para la oxidación del Mn^{2+} . Se representa la densidad de spin de la Tyr339 (verde), la Thr338 (naranja) y el Trp405 (azul). (Fernández-Fueyo et al. 2018)

El Trp405 pese a su alta reactividad está alejado del Asp354, lo que podría significar su no implicación en esta ruta de transferencia electrónica para la oxidación de Mn^{2+} .

Sin embargo, una segunda vía de transferencia electrónica que conseguiría operar en *PleosDyP4*, para la oxidación de sustratos aromáticos y tintes antraquinónicos, podría implicar a un triptófano de la superficie. Este radical conectaría finalmente con la ruta de oxidación del Mn^{2+} . Para comprobar la formación de radicales triptofanilo y tirosilo se realizó un espectro de resonancia paramagnética. Como se observa en la **Figura 42** se obtiene, entre otros el radical triptofanilo. La presencia de este radical junto con la alta reactividad del Trp405 obtenida en las simulaciones QM/MM indican que este aminoácido puede actuar como otra ramificación de la cadena electrónica, interaccionando con la Thr338 para transferir electrones desde el centro oxoferrilo a grupos aromáticos.

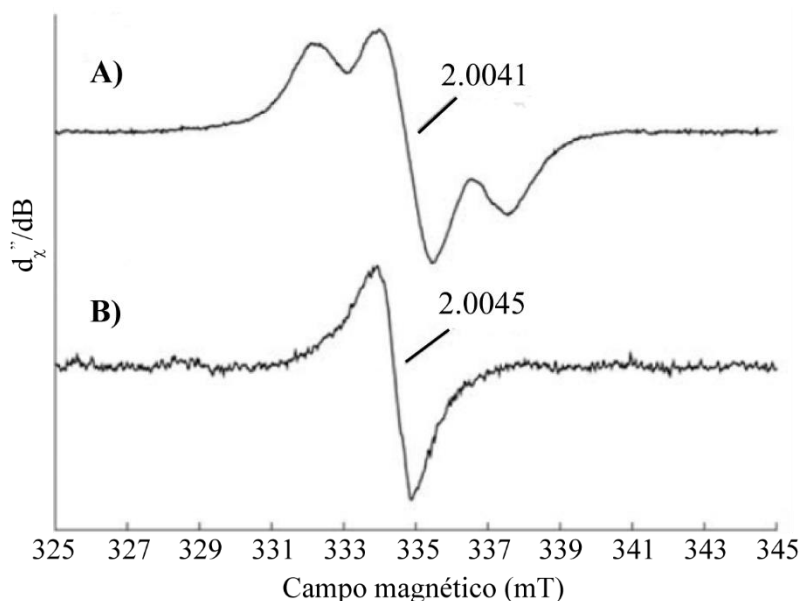


Figura 42. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR). A) *PleosDyP4* nativa. B) *PleosDyP4* W405S. En ambos casos la concentración de proteína es 0.25 mM, en una solución de tartrato sódico pH 3.0 tras la activación con H_2O_2 . (Fernández-Fueyo et al. 2018).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La familia de peroxidasas de tipo DyP está formada por hemo proteínas de hongos, mixomicetos, bacterias y arqueas, que pese a su gran diversidad de secuencia aminoacídica comparten propiedades catalíticas y estructurales (Yoshida and Sugano 2015).

Las DyPs de clase D se encuentran mayoritariamente en basidiomicetos y se caracterizan porque son secretadas al exterior celular (Fawal et al. 2013). Presentan actividad catalítica frente a una gran diversidad de sustratos, de gran importancia en múltiples industrias, como los compuestos modelo de lignina o los colorantes antraquinónicos y azoicos (Sugano et al. 2000; Liers et al. 2009; Yoshida and Sugano 2015).

Como se mencionó en la introducción, las peroxidasas tipo DyP presentan un plegamiento característico con dos dominios similares a α , β -ferredoxina con una lámina β antiparalela sobre el área distal del grupo hemo (Rahmanpour and Bugg 2015), con residuos y motivos conservados. Atendiendo a sus características estructurales Yasushi Sugano y Toru Yoshida propusieron una nueva clasificación que cataloga las peroxidasas de clase D y de clase C en un mismo grupo denominado clase avanzada (V) (Sugano 2009; Yoshida and Sugano 2015).

En esta tesis se han resuelto las estructuras de DyP1 de *Auricularia auricula-judae* y de los mutantes diseñados, estableciendo las bases moleculares de una nueva actividad catalítica frente a sustratos de gran importancia industrial.

También se han analizado las estructuras de DyP4 de *Pleurotus ostreatus* y algunos de los mutantes diseñados, que nos han permitido identificar los elementos sobre los que se fundamenta su actividad catalítica, en este caso la oxidación de manganeso.

1. ESTUDIOS ESTRUCTURALES:

1.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA:

Comparando la estructura secundaria de ambas proteínas (**Figura 43**) observamos ciertas diferencias en su organización. *AauDyP1* presenta 14 cadenas β y 13 α -hélices mientras que *PleosDyP4* presenta 17 cadenas β y 16 α -hélices. La mayor diferencia, a parte del número de motivos secundarios, es que en *PleosDyP4* la longitud de estos elementos es mayor que la presentada en *AauDyP1*.

En el dominio N-terminal hay dos motivos exclusivos para cada modelo:

- La hélice $\alpha 1$ de *AauDyP1* ausente en *PleosDyP4*.
- Las láminas $\beta 3$ y $\beta 4$ de *PleosDyP4*. *AauDyP1* en su lugar presenta la hélice $\alpha 5$.

El nexo entre ambos dominios lo conforman cuatro cadenas β que interaccionan dos a dos, de forma antiparalela en el primer nudo ($\beta 5$ - $\beta 6$ en *AauDyP1*; $\beta 7$ - $\beta 8$ en *PleosDyP4*) y paralela en el segundo ($\beta 7$ - $\beta 8$ en *AauDyP1*; $\beta 9$ - $\beta 10$ en *PleosDyP4*), formadas por un número similar de aminoácidos (entre dos y cuatro). Esta zona, como se muestra en la **Figura 43**, presenta un extenso lazo conectando ambos dominios.

En el dominio C-terminal, la zona inicial compuesta principalmente por α -hélices, presenta algunas diferencias entre ambas proteínas. En *PleosDyP4* contiene seis α -hélices

($\alpha 6 - \alpha 11$), mientras que *AauDyP1* solo presenta cuatro ($\alpha 7 - \alpha 10$) que enlazan con la lámina $\beta 10$. En *PleosDyP4*, observamos que la cadena correspondiente a esta $\beta 10$ de *AauDyP1*, está dividida en dos cadenas de menor longitud denominadas $\beta 12$ y $\beta 13$. Por último, *AauDyP1* tiene una única α -hélice ($\alpha 12$) entre las cadenas $\beta 11$ y $\beta 12$, mientras *PleosDyP4* cuenta con tres hélices ($\alpha 13 - \alpha 15$) en esta zona.

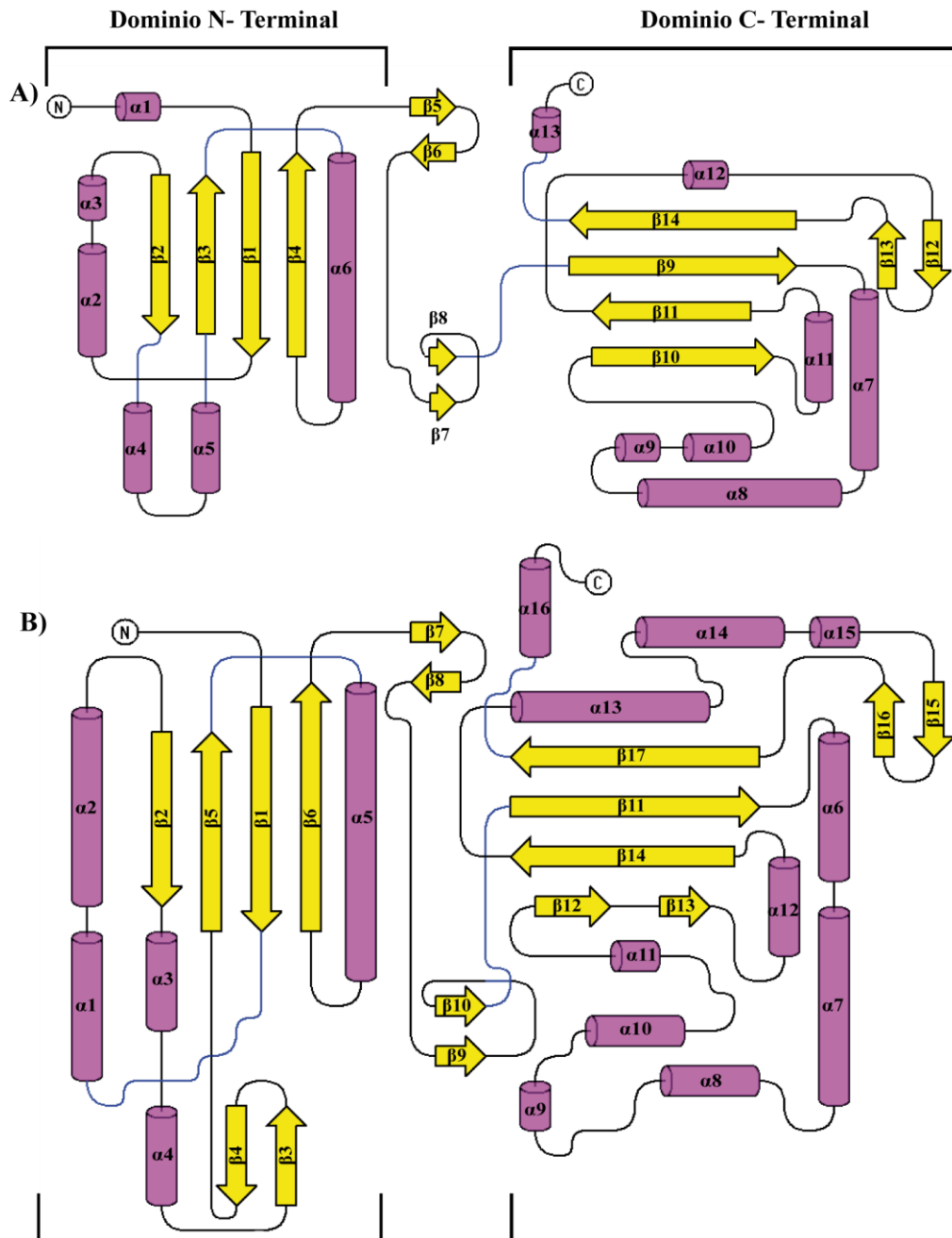


Figura 43. Esquema de la estructura secundaria de *AauDyP1* (A) y de *PleosDyP4* (B).

En general, la estructura secundaria de *AauDyP1* presenta un mayor porcentaje de “loops”, en torno al 60% (328 residuos), que *PleosDyP4* con un 46% (225 aminoácidos). En el análisis de la estructura secundaria se puede observar que la estructura de

PleosDyP4 presenta más motivos de α -hélices y láminas β , así como una mayor longitud de estos motivos, que los presentes en la estructura de *AauDyP1*.

1.2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL:

Las peroxidasas de tipo DyP presentan una estructura terciaria formada por dos dominios: el dominio N-terminal y el dominio C-terminal. Cada dominio está compuesto por una lámina β con cuatro cadenas antiparalelas rodeadas de α -hélices. Ambos dominios combinados presentan una estructura de α , β -sándwich, caracterizada por dos láminas β enfrentadas entre sí formando un barril β “*up-and-down*” (Zubieta et al. 2007) con las α -hélices posicionadas en la superficie proteica. Como se muestra en resultados, esta arquitectura característica se conserva en todas las estructuras resueltas de las DyPs de *A. auricula-judae* y de *P. ostreatus*.

El número de residuos construidos en las estructuras cristalográficas de *AauDyP1* y sus mutantes fue de 445 a 446 y presentan unas dimensiones aproximadas de 51 x 67 x 42 Å. En las estructuras de *PleosDyP4* nativa y sus mutantes, el número de residuos construidos varía desde 484 a 486 con unas dimensiones de 62 x 72 x 67 Å.

En la **Figura 44** se superponen las estructuras de las enzimas nativas y los distintos mutantes de *AauDyP1* (**panel A**) y de *PleosDyP4* (**panel B**). En ningún caso las mutaciones introducidas en las variantes estudiadas producen modificaciones significativas sobre la arquitectura general de las proteínas. Todas ellas conservan los elementos estructurales sin variar su disposición ni su longitud.

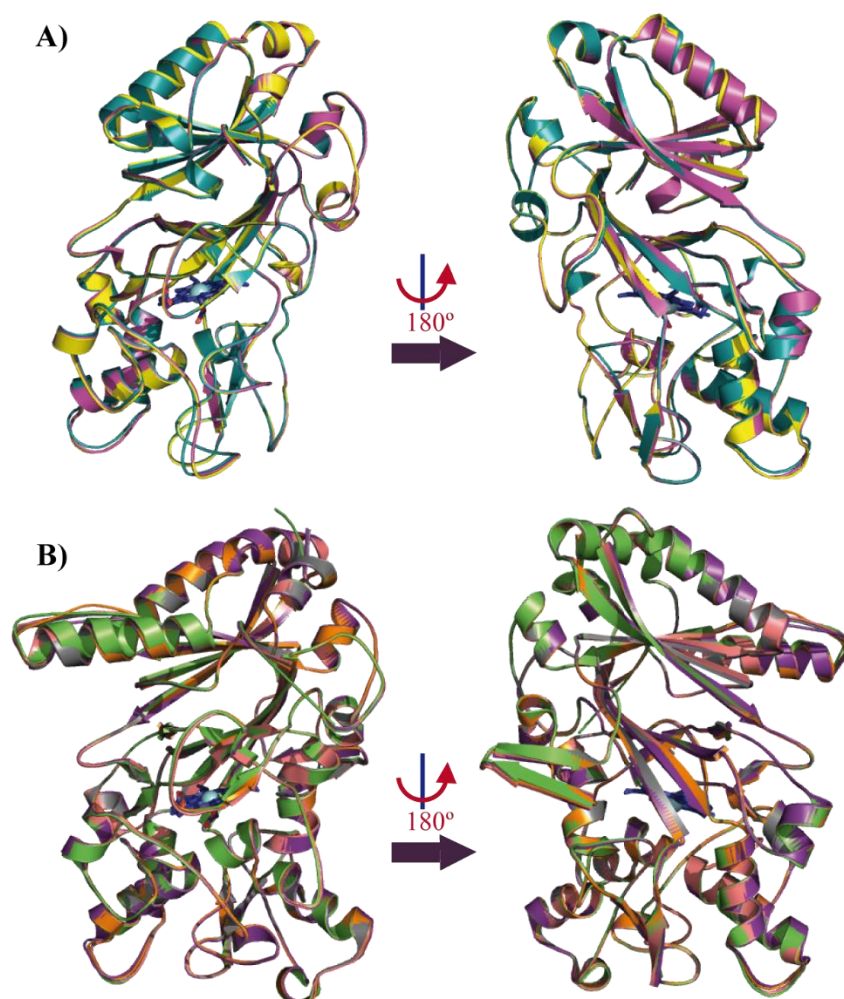


Figura 44. Comparación entre las estructuras de *AauDyP1* y de *PleosDyP4*. A) En cian la estructura de *AauDyP1* nativa (código PDB: 4W7J) superpuesta con la de los mutantes L357G (código PDB: 5IKG, en magenta) y F359G (código PDB: 5IKD, en amarillo). B) *PleosDyP4* nativa en naranja, con los mutantes E190A en verde, F194W (código PDB: 6FSL) en morado, F194Y (código PDB: 6FSK) en rosa y D196A en gris.

Por otro lado, la superposición de las estructuras de *PleosDyP4* y *AauDyP1* (**Figura 45**) muestra que el dominio más variable es el N-terminal. Destaca la diferencia en longitud entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de *PleosDyP4*, formadas por doce (Val36–Ile47) y diecisiete aminoácidos (Thr52–Arg68) respectivamente, y las correspondientes hélices en *AauDyP1* ($\alpha 2$ y $\alpha 3$) que presentan una longitud menor, con siete (Pro32–His38) y cuatro residuos (Val50–Leu53).

Otra de las diferencias estructurales significativas afecta a la cadena β que forma parte de la zona distal del bolsillo hemo. En *AauDyP1* la arginina catalítica se encuentra situada en la lámina $\beta 10$, formada por siete residuos (Met331–Tyr337), mientras que en *PleosDyP4* se produce una protrusión (“*beta-bulge*”) en la lámina equivalente dando lugar a las láminas $\beta 12$ y $\beta 13$. Sin embargo, esto no altera la orientación de la arginina hacia el grupo hemo (**Figura 45**).

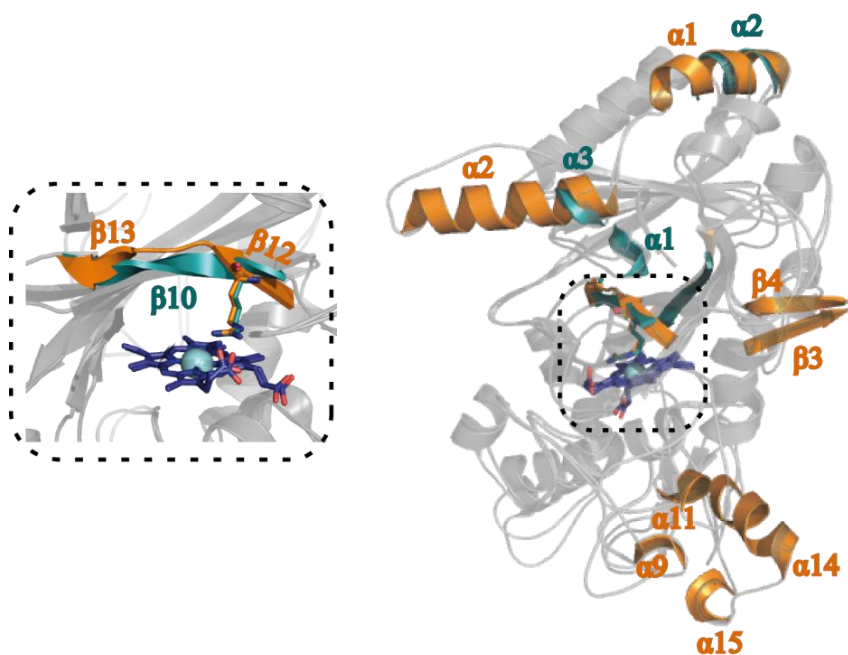


Figura 45. Diferencias estructurales entre *AauDyP1* y *PleosDyP4*. Superposición destacando las diferencias más significativas. En cian se muestran los componentes de *AauDyP1* y en naranja los de *PleosDyP4*. Las diferencias que afectan a la cara distal del bolsillo hemo, junto con la arginina catalítica, se muestran con mayor detalle en el cuadrado izquierdo.

En la **Figura 45** se destacan también los motivos estructurales característicos de cada una de estas DyPs, que se describen a continuación:

- La hélice $\alpha 1$ en el extremo N-terminal de *AauDyP1*, ausente en *PleosDyP4*.
- Las láminas $\beta 3$ y $\beta 4$ expuestas al solvente y situadas en el dominio N-terminal de *PleosDyP4*, ausentes en *AauDyP1*.
- En el dominio C-terminal de *PleosDyP4* hay dos hélices, $\alpha 9$ y $\alpha 11$, mientras *AauDyP1* presenta en su lugar, una zona de “loops”.

Las peroxidasas de tipo DyP presentan tres características inconfundibles: una histidina proximal unida al grupo hemo, una arginina y un motivo GXXDG, altamente conservado, situados en la zona distal del grupo hemo. Estos residuos forman enlaces de hidrógeno con el propionato del pirrol D en una orientación favorable (Sugano 2009; Yoshida et al. 2011). La arginina y el ácido aspártico distales al grupo hemo, participan en la formación del compuesto I (**Figura 16**), mediando la catálisis ácido-base del peróxido de hidrógeno y estabilizando la carga (Sugano et al. 2007).

Como se muestra en la **Figura 46**, las estructuras de *AauDyP1* y de *PleosDyP4* conservan estos residuos en el entorno del grupo hemo y presentan un plegamiento muy similar al de otras DyP fúngicas de clase V, como la de *B. adusta*.

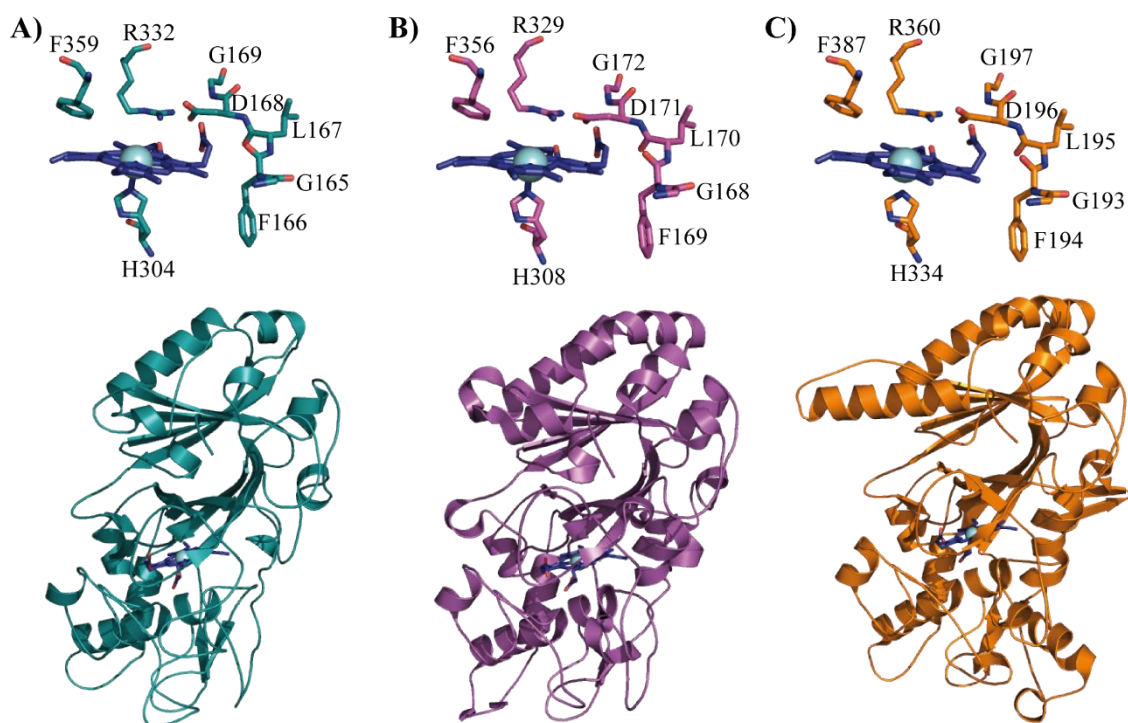


Figura 46. Entorno del grupo hemo de peroxidadas de tipo DyP de clase D o V. A) *AauDyP1* nativa (código PDB: 4W7J) **B)** DyP de *B. adusta* en magenta (código PDB: 2D3Q) (Yoshida et al. 2011) **C)** *PleosDyP4* nativa.

1.3. COMPARACIÓN CON DYPs BACTERIANAS Y FÚNGICAS:

AauDyP1, *PleosDyP4* y DyP de *B. adusta* (código PDB: 2D3Q) (Yoshida et al. 2011) forman parte de las peroxidadas de tipo DyP fúngicas de clase avanzada (V) (clase D según la PeroxiBase) (Fawal et al. 2013). En esta clase coexisten representantes de origen bacteriano pertenecientes a la clase C (según la PeroxiBase), lo que nos lleva a preguntarnos cuáles son las diferencias y similitudes entre este tipo de proteínas de diferentes orígenes.

Tanto las DyPs fúngicas como las bacterianas presentan los motivos estructurales comunes previamente descritos, las láminas β centrales en la zona distal del grupo hemo y las dos hélices en la zona proximal del mismo.

En la **Figura 47** se muestran las estructuras de las DyPs fúngicas: *AauDyP1*, *PleosDyP4* y DyP de *B. adusta* (código PDB: 2D3Q) (Yoshida et al. 2011), así como las estructuras de DyPs bacterianas: DyP2 de *Amiclatopsis sp.* (código PDB: 4G2C) (Brown et al. 2012) y DyP de *Anabaena sp.* (código PDB: 5C2I) (Yoshida et al. 2016). Los motivos estructurales similares entre las diferentes estructuras fúngicas y bacterianas están representados en diferentes colores.

Las hélices α_4 , α_5 , α_6 y α_{13} de *AauDyP1* correspondientes a α_3 , α_4 , α_5 y α_{16} en *PleosDyP4*, mayoritariamente del dominio N-terminal están también presentes en DyP de *Anabaena sp.* (Yoshida et al. 2016). El dominio N-terminal de *PleosDyP4* presenta una gran similitud con las DyPs de origen bacteriano. Destacan las hélices α_1 y α_2 , con una disposición y longitud muy similares a los representantes bacterianos. La hélice α_2 sobresale del resto del dominio N-terminal formando una gran prominencia, tanto en *PleosDyP4* como en DyP2 de *Amiclatopsis sp.* (Brown et al. 2012) y en DyP de

Anabaena sp. (Yoshida et al. 2016). Por otro lado, *AauDyP1* y DyP de *B. adusta* presentan en su extremo N-terminal una hélice $\alpha 1$ de poca longitud, ausente en *PleosDyP4* y en las DyPs de origen bacteriano.

El dominio C-terminal presenta menos variaciones. Una diferencia significativa de *PleosDyP4* se encuentra en la región situada bajo la hélice $\alpha 10$, en el entorno proximal del grupo hemo, que contiene un mayor número de hélices, ausentes en el resto de componentes de la clase avanzada. También destaca la presencia de una única cadena β ($\beta 10$) en la zona distal del grupo hemo, donde se sitúa la arginina catalítica en *AauDyP1*, mientras que en el resto de estructuras se observan dos cadenas β .

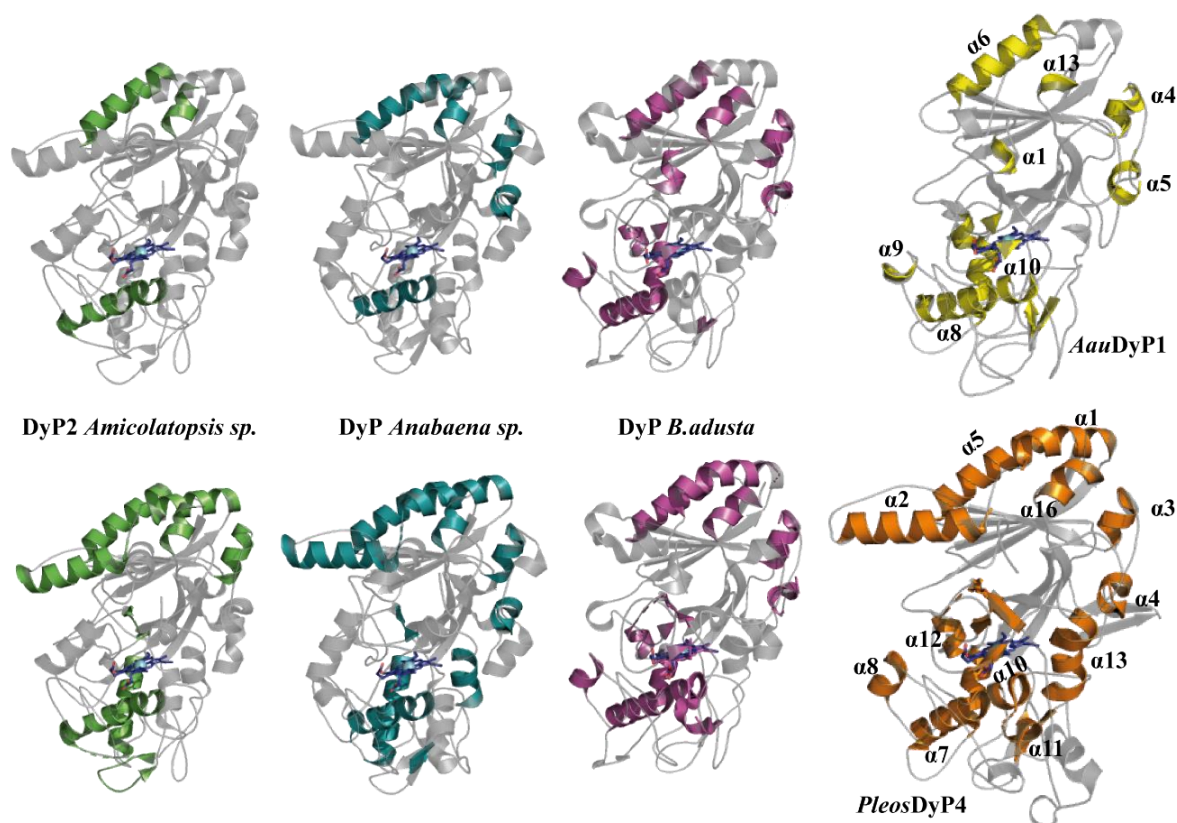


Figura 47. Estructuras de peroxidasas de tipo DyP de clase avanzada (V). DyPs bacterianas: DyP2 de *Amicolatopsis sp.* en verde (Brown et al. 2012) y DyP de *Anabaena sp.* en cian (Yoshida et al. 2016). DyP fúngicas: DyP de *B. adusta* en magenta (Yoshida et al. 2011), *AauDyP1* en amarillo y *PleosDyP4* en naranja. Los elementos comunes entre las DyPs representadas se destacan en colores diferentes del gris.

Las tres DyPs fúngicas presentan la hélice denominada $\alpha 9$ en *AauDyP1* ($\alpha 8$ en *PleosDyP4*) (**Figura 47**) situada en la parte externa del canal de acceso al centro activo. En las DyPs de clase V de origen bacteriano esta hélice desaparece siendo sustituida por un “loop”.

En la **Figura 48** se muestra una superposición de las estructuras de DyPs bacterianas de clase primitiva e intermedia (**panel A**), bacterianas de clase V (**panel B**) y fúngicas de clase V (**panel C**) donde se destaca la región interdominios. Esta región es la zona que más variación presenta entre los diferentes tipos de DyPs. Las clases primitiva e intermedia presentan un “loop” largo con dos y tres hélices, respectivamente (**Figura**

48A). Los representantes de la clase V bacterianos, disponen de tres cadenas β y dos α hélices (**Figura 48B**), destacando la longitud de la hélice central formada por doce residuos en DyP2 de *Amicolatopsis* sp. (Brown et al. 2012) y por quince en DyP de *Anabaena* sp. (Yoshida et al. 2016). En *PleosDyP4* y *AauDyP1* esta zona está formada por un gran “loop” y cuatro pequeñas cadenas β (**Figura 48C**). DyP de *B. adusta* presenta, sin embargo, dos cadenas β y 3 hélices de pequeña extensión (**Figura 48C**), de forma similar a las DyPs de clase primitiva e intermedia (**Figura 48A**).

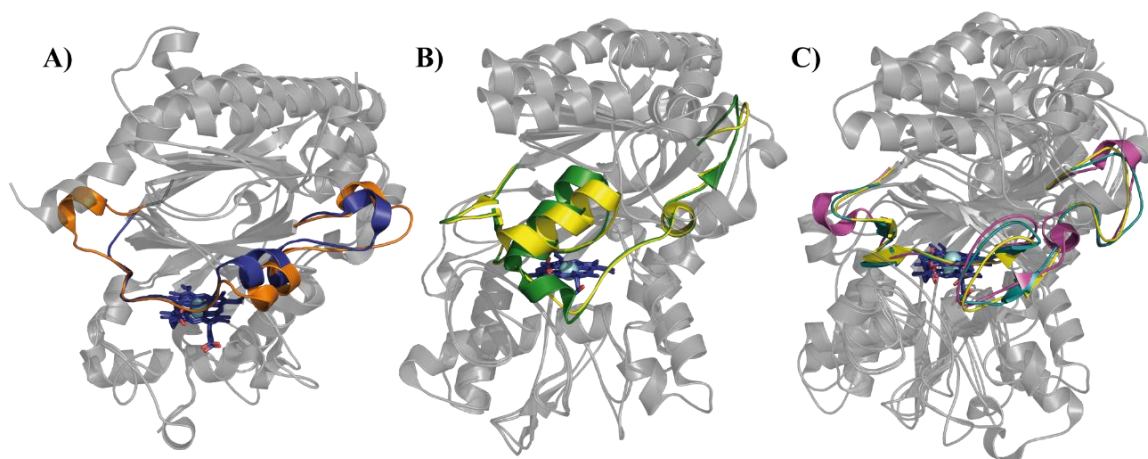


Figura 48. Comparación de la zona interdominios de peroxidasa de tipo DyP. A) Superposición de la peroxidasa de clase primitiva TyrA de *S. oneidensis* en azul marino (código PDB: 2IIZ) (Zubieta et al. 2007) con *TfuDyP* de *T. fusca*, de la clase intermedia en color naranja (código PDB 5FW4) (Rahmanpour et al. 2016). B) Superposición de las estructuras bacterianas de la clase V: en amarillo DyP2 de *Amicolatopsis* sp. (código PDB: 4G2C) (Brown et al. 2012) y en verde DyP de *Anabaena* sp. (código PDB: 5C2I) (Yoshida et al. 2016). C) Superposición de las estructuras de los representantes fúngicos: en magenta DyP de *B. adusta* (código PDB: 2D3Q) (Yoshida et al. 2011), en amarillo *AauDyP1* (código PDB: 4W7J) y en cian *PleosDyP4*.

A pesar de las diferencias estructurales entre los componentes de la clase avanzada, tanto bacterianos como fúngicos, las DyPs son fácilmente reconocibles por el plegamiento general de la proteína. Las DyPs bacterianas poseen una forma más globular con una zona interdominios caracterizada por la presencia de una α -hélice central. Las DyPs fúngicas son más elongadas y se caracterizan por la hélice que cierra el centro activo, en el entorno de los grupos propionatos y forma un saliente en el dominio C-terminal, junto con una región interdominios sin apenas hélices α o cadenas β . De las estructuras resueltas en este trabajo, *PleosDyP4* es la que presenta mayor similitud con las DyPs bacterianas, especialmente en el dominio N-terminal.

El canal de acceso al grupo hemo de las distintas clases de peroxidasa tipo DyP se muestra en la **Figura 49**. RHA1 de *R. jostii* (código PDB: 3QNR) (Roberts et al. 2011) forma parte de la clase primitiva y presenta dos accesos al bolsillo hemo, un canal de pequeño diámetro que va desde la superficie proteica al grupo vinilo B, y una segunda apertura en la región del propionato C con unas dimensiones aproximadas de unos 8 Å de alto y 10 Å de ancho. En *TfuDyP* de *T. fusca* (código PDB: 5FW4) (Rahmanpour et al. 2016), perteneciente a la clase intermedia, hay dos canales de pequeño diámetro que convergen y desembocan en la zona distal del átomo de hierro, un canal posterior que da

acceso a los grupos vinilo en su región proximal y una apertura en la zona del propionato del pirrol C, con unas dimensiones de unos 7Å de alto y 16Å de ancho, aproximadamente.

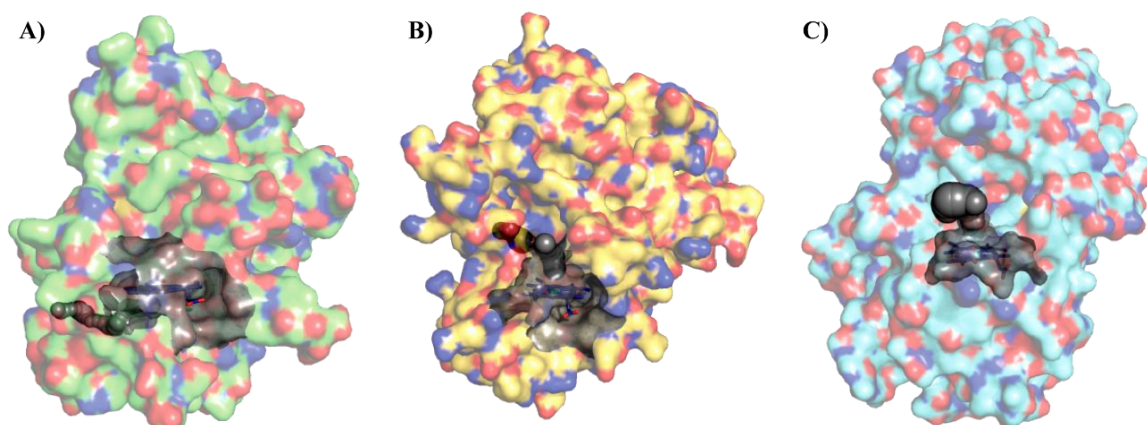


Figura 49. Acceso al bolsillo hemo de las distintas clases de peroxidasa de tipo DyP. A) Superficie molecular de RHA1 de *R. jostii* (código PDB: 3QNR) (Roberts et al. 2011). B) Superficie de *TfuDyP* de *T. fusca* (código PDB: 5FW4) (Rahmanpour et al. 2016). C) Superficie de *AauDyP1* nativa. El bolsillo hemo y sus accesos se representan en gris.

Tanto la clase I como la clase V presentan canales de pequeño diámetro en la zona distal del grupo hemo, por donde accede el H₂O₂ para activar la enzima formando el compuesto I. Los sustratos voluminosos en las DyPs de clase V se oxidan gracias a un residuo aromático superficial que puede formar radicales reactivos mediante una ruta de transferencia electrónica. En los representantes de clase P e I, los sustratos menos voluminosos podrían acceder al grupo hemo por la apertura de los propionatos, mientras que los más voluminosos podrían oxidarse a través de una cadena de transferencia electrónica (Linde, Pogni, et al. 2015).

2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y SIMULACIONES COMPUTACIONALES:

2.1. ANÁLISIS QUIRAL, CINÉTICO Y COMPUTACIONAL DE AAUDYP1:

Como se indicó en la introducción, las peroxidasa de tipo DyP se caracterizan por degradar diferentes sustratos entre los que destacan los colorantes antraquinónicos y azoicos con alto potencial redox (Kim and Shoda 1999; Fernández-Fueyo et al. 2015), carotenoides (Kim and Shoda 1999; Zelena et al. 2009) y compuestos relacionados con la lignina como el 2,6-dimetoxifenol, el alcohol veratrílico y el guayacol (Sugano et al. 2000; Roberts et al. 2011; Brown et al. 2012; Linde, Ruiz-Dueñas, et al. 2015).

La oxidación de sulfitos ha sido extensamente descrita en otros grupos de peroxidasa, como en la peroxidasa de rábano (HRP) que presenta reacciones de sulfoxidación e hidroxilación enantioselectivas (Ortiz de Montellano et al. 1995; Rantwijk and Sheldon 2000) o en la citocromo c peroxidasa (CcP) que pese a las dimensiones del canal de acceso al centro activo, gracias a pequeños desplazamientos de los residuos que lo componen, es capaz de catalizar la sulfoxidación de tioanisol (Miller et al. 1992). En peroxidasa de tipo DyP bacterianas como *TfuDyP* de *Thermobifida fusca* se ha descrito la sulfoxidación enantioselectiva de sulfuros: tioanisol y metil *p*-tolil

sulfuro (MTS) (Van Bloois et al. 2010). Esta enzima, una DyP de clase intermedia, se caracteriza por la presencia de un “loop” en la zona interdominios que puede modificar su conformación para facilitar el acceso y realizar la oxidación de diferentes sustratos (Liu et al. 2011).

En este contexto, decidimos generar mutantes de *AauDyP1* con modificaciones en el canal de acceso al bolsillo del grupo hemo, eliminando las cadenas laterales de dos residuos situados en la entrada al canal (L357G y F359G), y evaluar su efecto sobre la actividad catalítica. En las medidas de actividad enzimática se utilizaron sulfuros fenólicos poco voluminosos (MPS y MTS) susceptibles de acceder al centro activo (**Figura 15**). Los resultados obtenidos, detallados en la **Tabla 10**, muestran que la enzima nativa no es capaz de catalizar la oxidación de estos sulfuros, probablemente debido a las restricciones del canal de acceso al centro activo. En los mutantes diseñados si se observó la oxidación de estos sustratos, siendo el mutante F359G el que presenta la mejor eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) (**Tabla 11**), así como de conversión de sustratos, especialmente con MTS (99%) (**Tabla 10**). El mutante L357G presenta un porcentaje de conversión significativamente menor con MTS (65%) (**Tabla 10**).

En la **Figura 50** se muestra el canal de acceso al grupo hemo de *AauDyP1* y sus mutantes. En la estructura nativa la forma del canal es redondeada con un diámetro de 7 Å aproximadamente, mientras que en el mutante L357G el canal se abre hacia uno de los grupos vinilo adquiriendo una forma más ovalada, con un diámetro mayor de 11 Å aproximadamente. Sin embargo, en F359G el acceso al canal es más limitado que en L357G, pero se produce un incremento de volumen del bolsillo hemo.

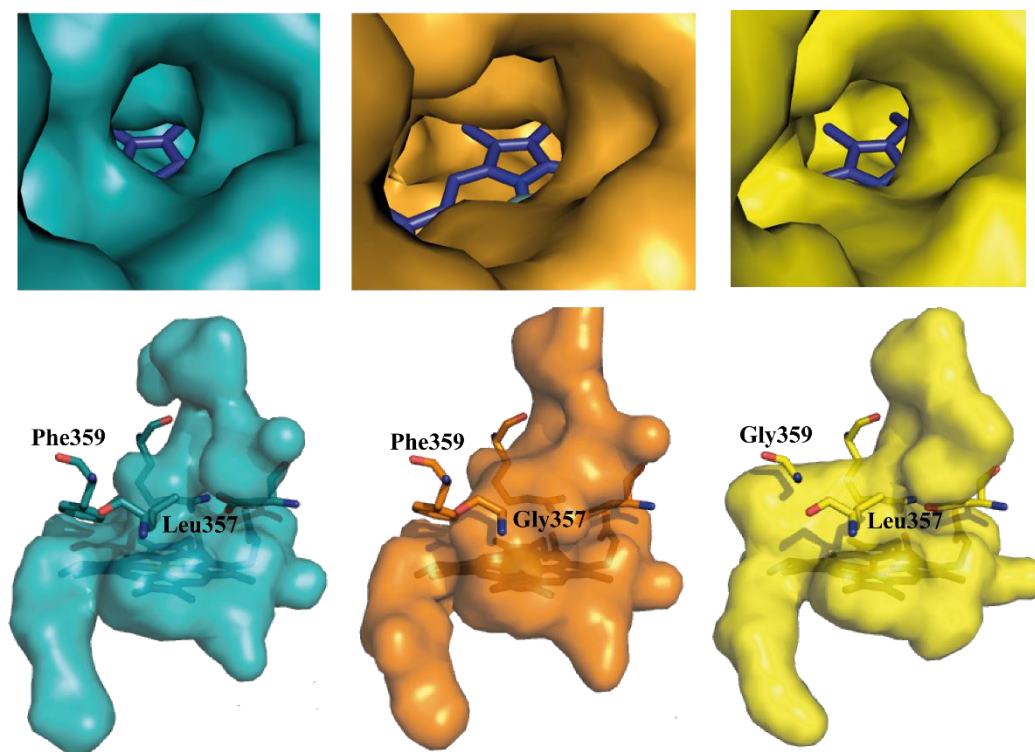


Figura 50. Canal de acceso y bolsillo del grupo hemo de *AauDyP1* nativa (cián), el mutante L357G (naranja) y F359G (amarillo).

En las simulaciones realizadas con PELE (**Figura 38**) obtuvimos, dentro del rango óptimo, una mayor densidad poblacional con el sustrato MTS en ambos mutantes, datos que contrastan con el bajo número de simulaciones obtenidas para la enzima nativa, indicando mayores restricciones de acceso al centro activo en la enzima nativa.

En la estructura nativa, los residuos Leu357 y Phe359 forman parte del canal de entrada al bolsillo que contiene el grupo hemo (**Figura 29**), en los mutantes L357G y F359G se eliminan las voluminosas cadenas laterales de estos aminoácidos al ser sustituidos por glicinas. Esto produce un ensanchamiento de la cavidad que facilitaría el acceso de sustratos aromáticos poco voluminosos como MTS y MPS. Esta apertura es más acusada en el mutante F359G, que amplía el bolsillo en la zona proximal del centro activo hasta la Phe370 (**Figura 50, panel derecho**). Estos datos están en concordancia con los resultados de la actividad enzimática, especialmente para el MTS. En el mutante L357G, aunque se produce un ensanchamiento en la entrada al centro activo facilitando así el acceso de sustratos, la extensión del bolsillo hacia la zona distal del cofactor hemo es menor, pudiendo dificultar un óptimo ajuste del sustrato. Esto es lo que ocurre en el posicionamiento del MTS en el bolsillo del mutante L357G, al disponer este sustrato de un grupo metilo en posición *para* del anillo aromático que alarga su estructura.

Por otro lado, se ha publicado que algunos miembros de la familia de peroxidasas pueden catalizar la conversión enantioselectiva de sulfatos en sulfóxidos, por lo que se analizaron los productos de reacción obtenidos para los dos mutantes mediante cromatografía quiral. Los estudios de conversión enantioselectiva (**Tabla 10**) muestran que el mutante F359G es capaz de catalizar la sulfoxidación de MPS y MTS con una producción mayoritaria del enantiómero-S.

Los ensayos de simulación PELE están en consonancia con la baja accesibilidad al centro activo en la estructura nativa, debido a que las cadenas laterales de la Leu357 y Phe359 impiden la entrada de los sustratos. Sin embargo, en las simulaciones realizadas con los mutantes destaca la mejor accesibilidad y posicionamiento del enantiómero R. Esta discrepancia con los resultados experimentales, fue resuelta con simulaciones utilizando mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM) (**Tabla 12**) cuyos resultados indican una mejor orientación de los enantiómeros S hacia las zonas más favorables o reactivas, produciendo esta conversión enantioselectiva, tan acusada, en la reacción de sulfoxidación mediada por el mutante F359G.

La selectividad hacia el enantiómero-S también ha sido publicada en estudios de sulfoxidación realizados con la peroxidasa de rábano (HRP) nativa y el mutante F41L (Ortiz de Montellano et al. 1995). En *TfuDyP* de *T. fusca* sin embargo, hay una preferencia en la selectividad de la oxidación del MPS hacia el enantiómero-R (61%) (Van Bloois et al. 2010). En la **Figura 51** se compara el acceso al bolsillo hemo de estas enzimas. HRP (Berglund et al. 2002) presenta dos canales de acceso en la zona de los propionatos. En *TfuDyP* de *T. fusca* (Rahmanpour et al. 2016) hay una cavidad en la zona del propionato del pirrol C con dos canales, uno que da acceso a la zona distal del grupo hemo y un segundo, en la parte posterior, que desemboca en el grupo vinilo B por su cara proximal. Finalmente, *AauDyP1* presenta un único canal de acceso en la zona distal del hierro del grupo hemo.

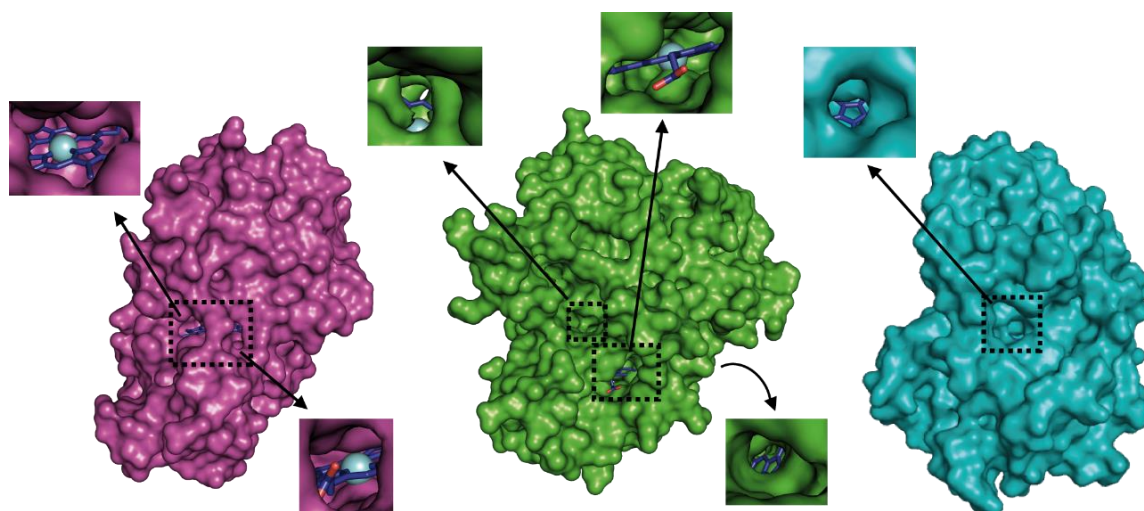


Figura 51. Accesos al bolsillo hemo de peroxidasa de rábano y de las DyPs: *TfuDyP* y *AauDyP1*. En magenta se representa la superficie de HRP (código PDB: 1H58) (Berglund et al. 2002), en verde *TfuDyP* de *T. fusca* (código PDB: 5FW4) (Rahmanpour et al. 2016) y en cian *AauDyP1*. En los cuadros aparece una ampliación de los accesos al grupo hemo señalizando su situación.

Los mutantes L357G y F359G de *AauDyP1* presentan un canal de entrada al grupo hemo modificado, que permite el paso de sulfuros aromáticos poco voluminosos, para la oxidación directa. Pese a la mejora en la accesibilidad para el mutante L357G, éste presenta una menor conversión del MTS, un sustrato con mayor volumen debido al metilo en posición *para* del anillo aromático. La ampliación del mutante F359G en el bolsillo hemo, produce un incremento de la zona distal del centro activo que permite una mejor colocación de estos sustratos y favorece la reacción selectiva hacia el enantiómero S.

2.2. ENSAYOS CINÉTICOS, SIMULACIONES COMPUTACIONALES Y RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA DE *PLEOSDYP4*:

La capacidad de oxidar manganeso es común en las manganeso peroxidadas (MnPs) y peroxidadas versátiles (VPs) (Ruiz-Dueñas et al. 2008). Esta actividad también se ha descrito en algunas peroxidadas de tipo DyP bacterianas como en *Rhodococcus jostii* (Roberts et al. 2011), *Amycolatopsis sp.* (Brown et al. 2012) y *Pseudomonas fluorescens* (Rahmanpour and Bugg 2015). El nivel de actividad de oxidación de manganeso de las peroxidadas de tipo DyP es muy inferior a la presentada por las MnPs y VPs.

En estudios realizados con peroxidadas de tipo DyP se ha descrito la oxidación de sustratos voluminosos (compuestos modelo de lignina y tintes antraquinónicos, entre otros) mediada por una cadena de transferencia electrónica de largo alcance que genera un radical reactivo en la superficie proteica (Strittmatter et al. 2013). En la estructura de DyP2 de *Amycolatopsis sp.* el sitio de unión de Mn^{2+} se encuentra en la superficie proteica alejado del grupo hemo, la oxidación se produce mediante un sistema de transferencia electrónica a través de varios aminoácidos de la enzima (Brown et al. 2012). En DyP B de *R. jostii* el Mn^{2+} interacciona con uno de los propionatos del grupo hemo produce la reacción (Roberts et al. 2011).

En 2015 se describieron las primeras DyP fúngicas, DyP1 y DyP4 de *P. ostreatus*, capaces de oxidar Mn^{2+} con una eficiencia similar a las MnPs y VPs (Fernández-Fueyo et al. 2015). Para caracterizar esta actividad en *PleosDyP4* se diseñó una batería de mutantes que permitieran, mediante estudios estructurales, cinéticos y computacionales, identificar el sitio de unión y el mecanismo de oxidación del manganeso.

Se realizaron ensayos cinéticos de oxidación de Mn^{2+} con los distintos mutantes (**Tabla 13**). En los resultados destacan las cinéticas obtenidas con el mutante Y339A, los distintos mutantes del residuo Glu345 (E345A y E345A/D352A/D354A) y el mutante D215A, que indican el papel determinante que desempeña la Tyr339 junto al Glu345 y el Asp215 en la oxidación de Mn^{2+} . Las mutaciones en los residuos Asp352 y Asp354, presentan un descenso menos acusado de la eficiencia catalítica, lo cual indica que estos residuos intervienen en menor medida en la reacción de oxidación.

En los resultados obtenidos por PELE, se observa que el Asp354 es el residuo que presenta menor energía (cercana a -140 kcal/mol) y distancia ($\sim 2\text{Å}$) con el Mn^{2+} (**Figura 40**). Este residuo, junto con Glu345, Asp215 y Asp352, forman una cavidad de carácter ácido en la superficie proteica que actúa como sitio de unión del Mn^{2+} , resultados que coinciden con la estructura de la enzima nativa cocristalizada con $MnCl_2$ (**Figura 37**). Las simulaciones PELE indican que el Glu345, Asp215, Asp352 y Asp354 participan en el correcto posicionamiento del manganeso para su oxidación.

Por otro lado, los resultados obtenidos de las simulaciones utilizando mecánica cuántica y mecánica molecular (QM y MM) señalan que los residuos Thr338, Tyr339 y Trp405 presentan una alta reactividad, indicando que podrían formar parte de esta cadena de transferencia electrónica (**Figura 41**). Al comparar estos resultados con la estructura cristalográfica observamos que tanto la Thr338 como la Tyr339 están alineadas con la histidina proximal y con el sitio de unión del Mn^{2+} mostrando su, más que posible, participación en esta reacción. El Trp405, sin embargo, se encuentra en la superficie de la enzima a una distancia aproximada de 8 Å y 9 Å del Asp354 y la Tyr339, respectivamente, lo que parece indicar una posible falta de participación en esta reacción.

Para desentrañar el papel que desempeña el Trp405, se realizaron estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Los resultados se muestran en la **Figura 42** y revelan la presencia de un radical triptofanilo. Estudios previos muestran la presencia de un radical triptofanilo en la superficie de otras DyPs, como en *AauDyP1* y en DyP de *Thermomonospora curvata*. En estos casos, el triptofanilo interviene en la oxidación de sustratos aromáticos voluminosos de alto potencial redox (Linde, Pogni, et al. 2015; Shrestha et al. 2016).

Los resultados obtenidos con los mutantes de *PleosDyP4*, señalan que la oxidación del Mn^{2+} se realiza mediante una cadena de transferencia electrónica de largo alcance, que transfiere un electrón desde el ion manganeso al centro oxoferrilo del compuesto I. Como se muestra en la **Figura 52**, el sitio de unión del Mn^{2+} es una cavidad ácida en la superficie proteica. Las cinéticas de actividad indican que el Glu345 y el Asp215 son residuos importantes en el correcto posicionamiento del manganeso para su oxidación. Una vez unido el Mn^{2+} , el Glu345 y la Tyr339 transmiten un electrón a la Thr338 y posteriormente a la His334, hasta reducir el hierro del grupo hemo formando el denominado Compuesto II.

El Trp405 situado en la superficie y que forma radicales triptofanilo, según estudios previos actúa como sitio de unión de sustratos voluminosos como el alcohol veratrílico (VA), el colorante antraquinónico “*Reactive Blue 19*” (RB19) o compuestos derivados de

la lignina para su oxidación (Linde, Pogni, et al. 2015; Shrestha et al. 2016). En la estructura de *PleosDyP4*, el Trp405 podría interactuar con uno de los eslabones de la cadena de transferencia electrónica, la Thr338 situada a 3.6 Å. El radical triptofanilo se produciría mediante una transferencia electrónica desde el Trp405 al radical de la protoporfirina del compuesto I, pasando por la Thr338 y la His334. Así en este caso el compuesto I estaría formado por el centro oxoferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y un radical triptofanilo ($\text{Trp405}^{+\cdot}$) (Figura 2) que sería responsable de la oxidación de los sustratos voluminosos desde la superficie proteica (Figura 52).

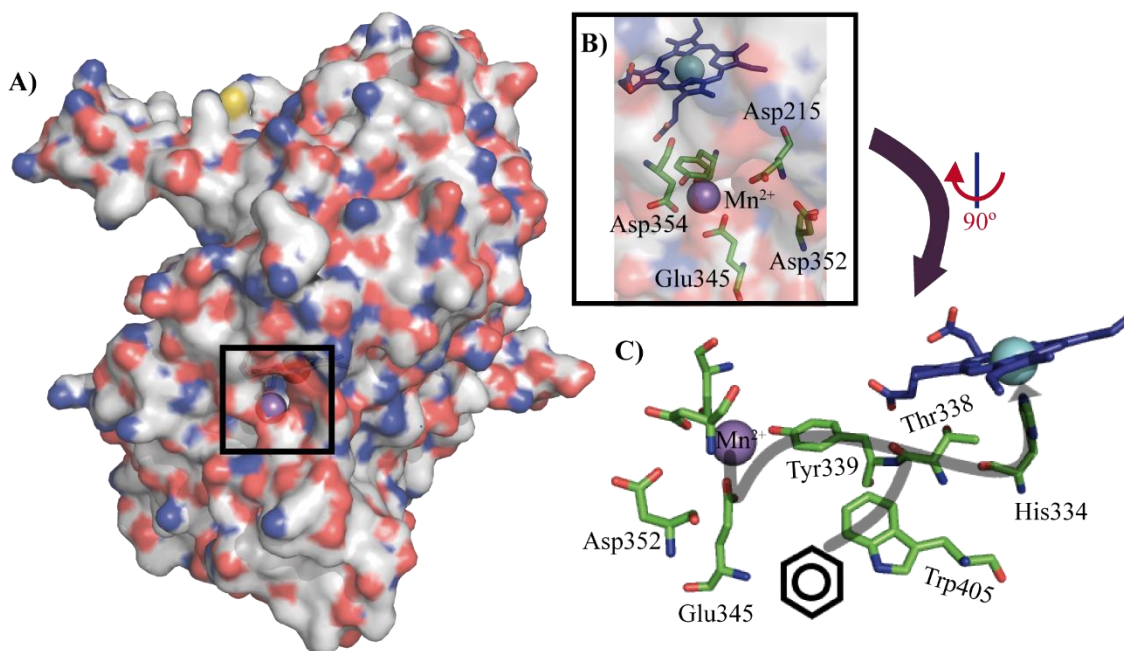


Figura 52. Cadena de transferencia electrónica de *PleosDyP4*. A) Superficie del modelo estructural de *PleosDyP4* nativa en complejo con Mn^{2+} , el cuadrado negro señala el centro de unión a Mn^{2+} . B) El ión Mn^{2+} (esfera morada) interactúa con los residuos Asp215, Asp352, Asp354, Glu345 y Tyr 339 (en verde), también se muestra el grupo hemo en azul. C) Esquema de la cadena de transferencia electrónica (en gris) desde el Mn^{2+} pasando por el Glu 345 y la His334. La formación del radical triptofanilo se produce gracias a la transferencia electrónica desde el Trp405 hasta el grupo hemo, pasando por la Thr338 y la His334.

La oxidación del Mn^{2+} se ha descrito en las DyPs de *P. fluorescens*, *R. jostii* y *Amycolatopsis sp.*, actualmente se han caracterizado los mecanismos moleculares que intervienen en las reacciones mediadas por estas dos últimas enzimas. Los estudios cinéticos y estructurales indican que *PleosDyP4* presenta un mecanismo similar al descrito para DyP2 de *Amycolatopsis sp.*, valiéndose de una cadena de transferencia electrónica para oxidar el Mn^{2+} , con un sitio de unión superficial de carácter ácido. Los residuos que forman esta cadena, en ambas especies presentan características similares (Brown et al. 2012). En la Figura 53 se muestran los residuos implicados en esta reacción de oxidación de los modelos estructurales de DyPB de *R. jostii* (Roberts et al. 2011), DyP2 de *Amycolatopsis sp.* (Brown et al. 2012) y *PleosDyP4*. Comparando la cadena de transferencia electrónica de DyP2 y *PleosDyP4* comprobamos que, pese a presentar residuos comunes, varía su disposición orientadas en espejo una con respecto a la otra. Otra diferencia significativa es su enlace con el grupo hemo. La cadena de DyP2 de

Amycolatopsis sp. se orienta hacia el ácido aspártico (D192) de la zona distal del grupo hemo, mientras la cadena de *PleosDyP4* finaliza en la histidina proximal (H334).

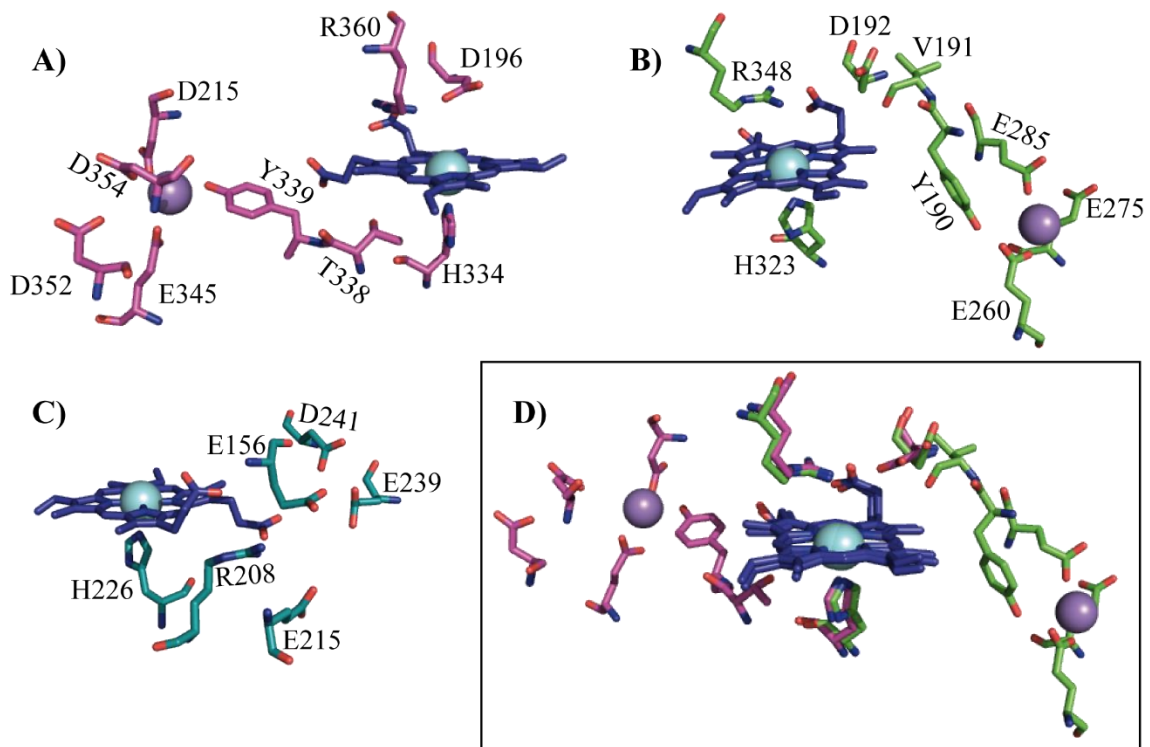


Figura 53. Residuos implicados en la oxidación de Mn^{2+} . Cadena de transferencia electrónica de *PleosDyP4* en magenta (A) y de DyP2 de *Amycolatopsis sp.* en verde (código PDB: 4G2C) (Brown et al. 2012) (B). C) Sitio de unión del Mn^{2+} de DyPB de *R. jostii* (código PDB: 3QNR) (Roberts et al. 2011). D) Superposición de las cadenas de transferencia electrónica de *PleosDyP4* (magenta) y de DyP2 (verde, código PDB: 4G2C) (Brown et al. 2012).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) *AauDyP1* es una peroxidasa de tipo DyP de clase V que presenta un canal de acceso para la entrada de sustratos poco voluminosos. Las estructuras de la enzima nativa y dos mutantes, resueltas por cristalografía de rayos X, nos han permitido identificar los residuos implicados en la formación del canal. Estos resultados han servido como punto de partida para optimizar la accesibilidad de sustratos al centro activo.

2) El canal de acceso presenta un estrechamiento, delimitado por un ácido aspártico (D168), una arginina (R332), una leucina (L357) y una fenilalanina (F359), que restringe la entrada al centro activo. De estos residuos, el ácido aspártico y la arginina son aminoácidos catalíticos que contribuyen a la desprotonación y posterior ruptura heterolítica del peróxido de hidrógeno, por lo que las mutaciones se diseñaron sobre la Leu357 y la Phe359 con el objetivo de mejorar el acceso al grupo hemo.

3) Las estructuras de los mutantes, L357G y F359G, conservan los motivos estructurales de la enzima nativa diferenciándose únicamente en la zona que da acceso al centro activo. En el mutante L357G se produce un ensanchamiento del diámetro del canal en la zona inmediatamente superior al átomo de hierro del grupo hemo, mientras que en el mutante F359G se observa un incremento de la cavidad del grupo hemo extendiéndose hacia uno de los grupos vinilo del mismo.

4) Los ensayos de actividad enzimática confirman que estas modificaciones mejoran el acceso al grupo hemo, facilitando el acceso de nuevos sustratos como los sulfuros con sustituyentes poco voluminosos. En ambos mutantes, se observó la oxidación del tioanisol (MPS) y del MTS, confirmándose una nueva actividad catalítica ausente en la enzima nativa. La reacción se produce de forma directa mediante el acceso del sustrato (MPS o MTS) al centro activo. Una vez posicionado, el átomo de azufre interacciona con el centro oxoferrilo (IV) produciéndose el sulfóxido correspondiente.

5) En la identificación de los productos de reacción se ha obtenido una sulfoxidación altamente selectiva de las reacciones catalizadas por el mutante F359G. En la oxidación de ambos sustratos se produce mayoritariamente el enantiómero S. Esta nueva actividad catalítica enantioselectiva podría tener aplicaciones en síntesis orgánica de alto valor añadido.

6) La resolución de la estructura cristalográfica de *PleosDyP4* ha permitido caracterizar una nueva peroxidasa de tipo DyP fúngica y establecer las bases moleculares implicadas en la oxidación de manganeso. Su arquitectura es similar a las de otros representantes de este grupo, con dos dominios similares a α , β -ferredoxina dispuestos en una conformación de α , β -sándwich. Cada dominio presenta una lámina β central formada por cadenas antiparalelas y rodeadas por α -hélices. El cofactor hemo B se dispone en el núcleo de la proteína con las láminas β en su zona distal.

7) El centro activo está compuesto por la protoporfirina que interacciona con tres residuos muy conservados. En la zona proximal se sitúa una histidina coordinada al átomo de hierro. En la zona distal se disponen una arginina y un aspártico que intervienen en la desprotonación y posterior ruptura heterolítica del peróxido de hidrógeno, necesaria

para la formación del compuesto I. Otro elemento conservado de este grupo, es el motivo GXXDG, posicionado en el entorno del grupo hemo interacciona con los propionatos. En *PleosDyP4* este motivo está compuesto por los residuos: G165–F166–L167–D168–G169.

8) Los ensayos de difusión de manganeso en los cristales de *PleosDyP4*, permitieron identificar el sitio de unión a la enzima. El manganeso interacciona en la superficie de la proteína, dentro de una cavidad ácida formada por los residuos Asp215, Glu345, Asp352 y Asp354.

9) Estudios cinéticos y estructurales, junto con las simulaciones computacionales muestran que la oxidación del manganeso se realiza a través de una ruta de transferencia electrónica. El ion Mn^{2+} interacciona inicialmente con el Glu345 que cede un electrón a la Tyr338, siguiendo así la ruta de transferencia con la Thr338 y la His334, esta última coordinada con el átomo de hierro del grupo hemo.

10) Tanto las simulaciones computacionales como la resonancia paramagnética electrónica muestran la presencia de un triptófano superficial, el Trp405, que forma un radical triptofanilo en presencia de peróxido de hidrógeno. Este radical interacciona con la Thr338 de la cadena de transferencia electrónica catalizando la oxidación superficial de sustratos voluminosos.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AauDyP1	DyP1 de <i>A. auricula-judae</i> .
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AutoMR	"Automated Molecular Replacement".
BRENDA	"Braunschweig Enzyme Database" .
CC	Coefficiente de Correlación de Pearson.
CCP4	"Collaborative Computational Project number 4".
CcP	Citocromo c peroxidasa.
CDE	Superfamilia peroxidasa-clorito dismutasa.
CHMO	Ciclohexanona monooxigenasa.
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas.
CiP	" <i>C. cinerea peroxidase</i> ".
Clase I	Clase intermedia.
Clase P	Clase primitiva.
Clase V	Clase avanzada.
Cld	Clorito dismutasas.
COOT	"Crystallographic Object-Oriented Toolkit".
"Cryo cap"	Base magnética.
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
CV	Volúmenes de columna.
DMP	2,6-dimetoxifenol.
DO	Densidad óptica.
DTT	Ditiotreitol.
DyP	Peroxidasas de tipo DyP o " <i>dye decolorizing peroxidases</i> ".

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EPR	“ <i>Electron paramagnetic resonance</i> ”.
ESRF	“ <i>European Synchrotron Radiation Facility</i> ” (Grenoble, Francia).
F	Factor de estructura.
F_{cal} F_c	Factor de estructura calculado.
F_{obs} F_o	Factor de estructura observado.
GP	“ <i>Generic peroxidase</i> ”
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia o “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”
HRP	Peroxidasa de rábano o “ <i>Horseradish peroxidase</i> ”.
I	Intensidad.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
JGI	“ <i>JOINT GENOME INSTITUTE</i> ”.
k_{cat}	Constante catalítica.
K_M	Constante de Michaelis–Menten.
LB	Medio de cultivo “Luria Bertani”.
LiP	Lignina peroxidasa.
LLG	“ <i>Log-likelihood gain</i> ”.
ME	Microscopía Electrónica.
MES	Ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico.
MM	“ <i>Molecular mechanics</i> ”.
MME	Monometil éter.
MPS	Metil fenil sulfuro.
MTS	Metil <i>p</i> -tolil sulfuro.
MnP	Manganeso peroxidasa.
PC15	Cepa haploide obtenida por de-dicariotización de <i>P. ostreatus</i> N001.

PDB	<i>“Protein Data Bank”</i> .
PEG	Polietilenglicol.
PELE	<i>“Protein Energy Landscape Exploration”</i> .
<i>PleosDyP4</i>	DyP4 de <i>P. ostreatus</i> .
QM	<i>“Quantum Mechanics”</i> .
RB5	<i>“Reactive black 5”</i> .
RB19	<i>“Reactive blue19”</i> .
SDS–PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”</i>)
TB	Medio de cultivo <i>“Terrific Broth”</i> .
TFZ	<i>“Final translation function Z score”</i> .
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
UV	Luz ultravioleta.
VA	Alcohol veratrílico.
VP	Peroxidasa versátil.
ϵ	Coefficiente de extinción molar.
Φ	Ángulos diedros.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, and P. H. Zwart. 2010. 'PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 213-21.
- Afonine, P. V., R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart, and P. D. Adams. 2012. 'Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68: 352-67.
- Alcorn, T., and D. H. Juers. 2010. 'Progress in rational methods of cryoprotection in macromolecular crystallography', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 366-73.
- Baunsgaard, L., H. Dalboge, G. Houen, E. M. Rasmussen, and K. G. Welinder. 1993. 'Amino acid sequence of Coprinus macrorhizus peroxidase and cDNA sequence encoding Coprinus cinereus peroxidase. A new family of fungal peroxidases', *Eur J Biochem*, 213: 605-11.
- Behrens, C. J., K. Zelena, and R. G. Berger. 2016. 'Comparative Cold Shock Expression and Characterization of Fungal Dye-Decolorizing Peroxidases', *Appl Biochem Biotechnol*, 179: 1404-17.
- Berglund, G. I., G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen, and J. Hajdu. 2002. 'The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution', *Nature*, 417: 463-8.
- Blodig, W., A. T. Smith, W. A. Doyle, and K. Piontek. 2001. 'Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in Escherichia coli and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism', *J Mol Biol*, 305: 851-61.
- Brown, M. E., T. Barros, and M. C. Chang. 2012. 'Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium', *ACS Chem Biol*, 7: 2074-81.
- Brünger, Axel T. 1992. 'Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures.', *Nature*, 355: 472-75.
- Cullity, B. D. 1956. *Elements Of X Ray Diffraction*. (Addison-Wesley Publishing Company, Inc.).
- Diederichs, K. 2010. 'Quantifying instrument errors in macromolecular X-ray data sets', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 733-40.
- Diederichs, K., & Karplus, P. A., 1997. 'Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.', *Nature Structural Biology*, 4: 269-75.
- Dunford, H.B, and J.S. Stillman. 1975. 'On the function and mechanism of action of peroxidases.', *Coordination Chemistry Reviews.*, 19: 187-251.
- Emsley, P., and K. Cowtan. 2004. 'Coot: model-building tools for molecular graphics', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 2126-32.
- Evans, P. R., and G. N. Murshudov. 2013. 'How good are my data and what is the resolution?', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69: 1204-14.

- Fawal, N., Q. Li, B. Savelli, M. Brette, G. Passaia, M. Fabre, C. Mathe, and C. Dunand. 2013. 'PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases', *Nucleic Acids Res*, 41: D441-4.
- Fernández-Fueyo, E., I. Davó-Siguero, D. Almendral, D. Linde, M.C. Baratto, R. Pogni, A. Romero, V. Guallar, and A.T. Martínez. 2018. 'Description of a Non-Canonical Mn(II)-Oxidation Site in Peroxidases.', *ACS Catalysis*, 8: 8386-95.
- Fernández-Fueyo, E., D. Linde, D. Almendral, M. F. López-Lucendo, F. J. Ruiz-Dueñas, and A. T. Martínez. 2015. 'Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II)', *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 8927-42.
- Fernández-Fueyo, E., F. J. Ruiz-Dueñas, M. J. Martínez, A. Romero, K. E. Hammel, F. J. Medrano, and A. T. Martínez. 2014. 'Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability', *Biotechnol Biofuels*, 7: 2.
- Fernández, I., and N. Khair. 2003. 'Recent developments in the synthesis and utilization of chiral sulfoxides', *Chem Rev*, 103: 3651-705.
- Gabardino, J., A. Beteva, M. Guijarro, V. Rey-Bakaikoa, D. Spruce, M. W. Bowler, S. Brockhauser, D. Flot, E. J. Gordon, D. R. Hall, B. Lavault, A. A. McCarthy, J. McCarthy, E. Mitchell, S. Monaco, C. Mueller-Dieckmann, D. Nurizzo, R. B. Ravelli, X. Thibault, M. A. Walsh, G. A. Leonard, and S. M. McSweeney. 2010. 'MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments', *J Synchrotron Radiat*, 17: 700-7.
- Glenn, J. K., M. A. Morgan, M. B. Mayfield, M. Kuwahara, and M. H. Gold. 1983. 'An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*', *Biochem Biophys Res Commun*, 114: 1077-83.
- Goblirsch, B., R. C. Kurker, B. R. Streit, C. M. Wilmot, and J. L. DuBois. 2011. 'Chlorite dismutases, DyPs, and EfeB: 3 microbial heme enzyme families comprise the CDE structural superfamily', *J Mol Biol*, 408: 379-98.
- Goblirsch, B. R., B. R. Streit, J. L. Dubois, and C. M. Wilmot. 2010. 'Structural features promoting dioxygen production by *Dechloromonas aromatica* chlorite dismutase', *J Biol Inorg Chem*, 15: 879-88.
- Hofrichter, M., R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, and T. Lundell. 2010. 'New and classic families of secreted fungal heme peroxidases', *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 871-97.
- Hrycay, E. G., and S. M. Bandiera. 2012. 'The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450', *Arch Biochem Biophys*, 522: 71-89.
- Huang, G., R. Shrestha, K. Jia, B. V. Geisbrecht, and P. Li. 2017. 'Enantioselective Synthesis of Dilignol Model Compounds and Their Stereodiscrimination Study with a Dye-Decolorizing Peroxidase', *Org Lett*, 19: 1820-23.
- Janusz, G., A. Pawlik, J. Sulej, U. Swiderska-Burek, A. Jarosz-Wilkolazka, and A. Paszczynski. 2017. 'Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution', *FEMS Microbiol Rev*, 41: 941-62.
- Jeske, L., S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, and D. Schomburg. 2019. 'BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource', *Nucleic Acids Res*, 47: D542-D49.
- Kabsch, W. 2010. 'Xds', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 125-32.

- Kabsch, W., and C. Sander. 1983. 'Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features', *Biopolymers*, 22: 2577-637.
- Karplus, P. A., and K. Diederichs. 2012. 'Linking crystallographic model and data quality', *Science*, 336: 1030-3.
- Kawabata, T. 2003. 'MATRAS: A program for protein 3D structure comparison', *Nucleic Acids Res*, 31: 3367-9.
- Keegan, R. M., and M. D. Winn. 2007. 'Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63: 447-57.
- Kim, S. J., and M. Shoda. 1999. 'Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes', *Appl Environ Microbiol*, 65: 1029-35.
- Letoffe, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange, and C. Wandersman. 2009. 'Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 11719-24.
- Liers, C., C. Bobeth, M. Pecyna, R. Ullrich, and M. Hofrichter. 2009. 'DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes.', *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 1869-79.
- Liers, C., M. J. Pecyna, H. Kellner, A. Worrlich, H. Zorn, K. T. Steffen, M. Hofrichter, and R. Ullrich. 2012. 'Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases', *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 5839-49.
- Linde, D., M. Cañellas, C. Coscolín, I. Davó-Siguero, A. Romero, F. Lucas, F.J. Ruiz-Dueñas, V. Guallar, and A.T. Martínez. 2016. 'Asymmetric sulfoxidation by engineering the heme pocket of a dye-decolorizing peroxidase.', *Catalysis Science & Technology*, 6: 6277-85.
- Linde, D., C. Coscolin, C. Liers, M. Hofrichter, A. T. Martinez, and F. J. Ruiz-Duenas. 2014. 'Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*', *Protein Expr Purif*, 103: 28-37.
- Linde, D., R. Pogni, M. Cañellas, F. Lucas, V. Guallar, M. C. Baratto, A. Sinicropi, V. Saez-Jimenez, C. Coscolin, A. Romero, F. J. Medrano, F. J. Ruiz-Dueñas, and A. T. Martínez. 2015. 'Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: a computational, spectroscopic and site-directed mutagenesis study', *Biochem J*, 466: 253-62.
- Linde, D., F. J. Ruiz-Dueñas, E. Fernández-Fueyo, V. Guallar, K. E. Hammel, R. Pogni, and A. T. Martínez. 2015. 'Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance', *Arch Biochem Biophys*, 574: 66-74.
- Liu, X., Q. Du, Z. Wang, D. Zhu, Y. Huang, N. Li, T. Wei, S. Xu, and L. Gu. 2011. 'Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157: ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes', *J Biol Chem*, 286: 14922-31.
- Madadkar-Sobhani, A., and V. Guallar. 2013. 'PELE web server: atomistic study of biomolecular systems at your fingertips', *Nucleic Acids Res*, 41: W322-8.

- Matsui, T., Y. Dekishima, and M. Ueda. 2014. 'Biotechnological production of chiral organic sulfoxides: current state and perspectives', *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 7699-706.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read. 2007. 'Phaser crystallographic software', *J Appl Crystallogr*, 40: 658-74.
- McPherson, A. 2017. 'Protein Crystallization', *Methods Mol Biol*, 1607: 17-50.
- Mendes, S., V. Brissos, A. Gabriel, T. Catarino, D. L. Turner, S. Todorovic, and L. O. Martins. 2015. 'An integrated view of redox and catalytic properties of B-type PpDyP from *Pseudomonas putida* MET94 and its distal variants', *Arch Biochem Biophys*, 574: 99-107.
- Miller, V. P., G. D. DePillis, J. C. Ferrer, A. G. Mauk, and P. R. Ortiz de Montellano. 1992. 'Monooxygenase activity of cytochrome c peroxidase', *J Biol Chem*, 267: 8936-42.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, and E. J. Dodson. 1997. 'Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 53: 240-55.
- Nordberg, H., M. Cantor, S. Dusheyko, S. Hua, A. Poliakov, I. Shabalov, T. Smirnova, I. V. Grigoriev, and I. Dubchak. 2014. 'The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates', *Nucleic Acids Res*, 42: D26-31.
- Ortiz de Montellano, P. R., S. I. Ozaki, S. L. Newmyer, V. P. Miller, and C. Harmann. 1995. 'Structural determinants of the catalytic activities of peroxidases', *Biochem Soc Trans*, 23: 223-7.
- Ozaki, S. & Ortiz de Montellano, P.R. . 1995. 'Molecular Engineering of Horseradish Peroxidase: Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants.', *Journal of the American Chemical Society*, 117 7056-64.
- Padilla, J. E., and T. O. Yeates. 2003. 'A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59: 1124-30.
- Perez-Boada, M., F. J. Ruiz-Dueñas, R. Pogni, R. Basosi, T. Choinowski, M. J. Martínez, K. Piontek, and A. T. Martínez. 2005. '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*, 354: 385-402.
- Puhse, M., R. T. Szweda, Y. Ma, C. Jeworrek, R. Winter, and H. Zorn. 2009. 'Marasmius scorodoni extracellular dimeric peroxidase - exploring its temperature and pressure stability', *Biochim Biophys Acta*, 1794: 1091-8.
- Rahmanpour, R., and T. D. Bugg. 2015. 'Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B', *Arch Biochem Biophys*, 574: 93-8.
- Rahmanpour, R., and T. D. H. Bugg. 2016. 'Chapter 14: Structure and reactivity of the dye-decolorizing peroxidase (DyP) family.' in.
- Rahmanpour, R., D. Rea, S. Jamshidi, V. Fulop, and T. D. Bugg. 2016. 'Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds', *Arch Biochem Biophys*, 594: 54-60.
- Rantwijk, F., and R.A. Sheldon. 2000. 'Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects.', *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 554-64.

- Reetz, M.T., S. Wu, H. Zheng, and S. Prasad. 2010. *Directed evolution of enantioselective enzymes: An unceasing catalyst source for organic chemistry*. (Pure and Applied Chemistry.).
- Rhode, G. 1993. *Crystallography made crystal clear. A guide for users of macromolecular models*. (San Diego: Academic Press).
- Roberts, J. N., R. Singh, J. C. Grigg, M. E. Murphy, T. D. Bugg, and L. D. Eltis. 2011. 'Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1', *Biochemistry*, 50: 5108-19.
- Rodríguez, D. D., C. Grosse, S. Himmel, C. González, I. M. de Ilarduya, S. Becker, ..., and I. Usón. 2009. 'Crystallographic ab initio protein structure solution below atomic resolution.', *Nature Methods*, 6: 651–53.
- Ruiz-Dueñas, F. J., E. Fernández, M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 2011. 'Pleurotus ostreatus heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure', *C R Biol*, 334: 795-805.
- Ruiz-Dueñas, F. J., M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 1999. 'Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*', *Mol Microbiol*, 31: 223-35.
- Ruiz-Dueñas, F. J., M. Morales, E. García, Y. Miki, M. J. Martínez, and A. T. Martínez. 2008. 'Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases', *J Exp Bot*, 60: 441-52.
- Santos, A., S. Mendes, V. Brissos, and L. O. Martins. 2014. 'New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications', *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 2053-65.
- Savenkova, M. I., S. L. Newmyer, and P. R. Montellano. 1996. 'Rescue of His-42 --> Ala horseradish peroxidase by a Phe-41 --> His mutation. Engineering of a surrogate catalytic histidine', *J Biol Chem*, 271: 24598-603.
- Shrestha, R., X. Chen, K. X. Ramyar, Z. Hayati, E. A. Carlson, S. H. Bossmann, L. Song, B. V. Geisbrecht, and P. Li. 2016. 'Identification of Surface-Exposed Protein Radicals and A Substrate Oxidation Site in A-Class Dye-Decolorizing Peroxidase from *Thermomonospora curvata*', *ACS Catal*, 6: 8036-47.
- Strittmatter, E., C. Liers, R. Ullrich, S. Wachter, M. Hofrichter, D. A. Plattner, and K. Piontek. 2013. 'First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: substrate interaction sites and long-range electron transfer', *J Biol Chem*, 288: 4095-102.
- Studier, F. W. 2005. 'Protein production by auto-induction in high density shaking cultures', *Protein Expr Purif*, 41: 207-34.
- Sturm, A., A. Schierhorn, U. Lindenstrauss, H. Lilie, and T. Bruser. 2006. 'YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins', *J Biol Chem*, 281: 13972-8.
- Sugano, Y. 2009. 'DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family', *Cell Mol Life Sci*, 66: 1387-403.
- Sugano, Y., R. Muramatsu, A. Ichiyanagi, T. Sato, and M. Shoda. 2007. 'DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases', *J Biol Chem*, 282: 36652-8.

- Sugano, Y., R. Nakano, K. Sasaki, and M. Shoda. 2000. 'Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1', *Appl Environ Microbiol*, 66: 1754-8.
- Sutter, M., D. Boehringer, S. Gutmann, S. Gunther, D. Prangishvili, M. J. Loessner, K. O. Stetter, E. Weber-Ban, and N. Ban. 2008. 'Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment', *Nat Struct Mol Biol*, 15: 939-47.
- Tien, M., and T. K. Kirk. 1983. 'Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds', *Science*, 221: 661-3.
- Tronrud, D. E. 2004. 'Introduction to macromolecular refinement', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 2156-68.
- UniProt, Consortium. 2019. 'UniProt: a worldwide hub of protein knowledge', *Nucleic Acids Res*, 47: D506-D15.
- Urzhumtseva, L., P. V. Afonine, P. D. Adams, and A. Urzhumtsev. 2009. 'Crystallographic model quality at a glance', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 65: 297-300.
- Vagin, A. A., R. A. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long, and G. N. Murshudov. 2004. 'REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 2184-95.
- Vagin, A., and A. Teplyakov. 2010. 'Molecular replacement with MOLREP', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 22-5.
- Van Berkel, W. J., N. M. Kamerbeek, and M. W. Fraaije. 2006. 'Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts', *J Biotechnol*, 124: 670-89.
- Van Bloois, E., D. E. Torres Pazmino, R. T. Winter, and M. W. Fraaije. 2010. 'A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily', *Appl Microbiol Biotechnol*, 86: 1419-30.
- Weiss, M. S. 2001. 'Global indicators of X-ray data quality.', *Journal of Applied Crystallography*, 34: 130-35.
- Weiss, M. S., & Hilgenfeld, R. . 1997. 'On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data.', *Journal of Applied Crystallography*, 30: 203-05.
- Welinder, K.G. 1992. 'Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases.', 2: 388-93.
- Williams, C. J., J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, W. B. Arendall, 3rd, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 2018. 'MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation', *Protein Sci*, 27: 293-315.
- Wlodawer, A. 2017. 'Stereochemistry and Validation of Macromolecular Structures', *Methods Mol Biol*, 1607: 595-610.
- Wlodawer, A., W. Minor, Z. Dauter, and M. Jaskolski. 2008. 'Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures', *FEBS J*, 275: 1-21.
- Yoshida, T., H. J. Ogola, Y. Amano, T. Hisabori, H. Ashida, Y. Sawa, H. Tsuge, and Y. Sugano. 2016. 'Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers', *Proteins*, 84: 31-42.

- Yoshida, T., and Y. Sugano. 2015. 'A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family', *Arch Biochem Biophys*, 574: 49-55.
- Yoshida, T., H. Tsuge, H. Konno, T. Hisabori, and Y. Sugano. 2011. 'The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue', *FEBS J*, 278: 2387-94.
- Zamocky, M., B. Gasselhuber, P. G. Furtmuller, and C. Obinger. 2014. 'Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases', *Cell Mol Life Sci*, 71: 4681-96.
- Zamocky, M., S. Hofbauer, I. Schaffner, B. Gasselhuber, A. Nicolussi, M. Soudi, K. F. Pirker, P. G. Furtmuller, and C. Obinger. 2015. 'Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies', *Arch Biochem Biophys*, 574: 108-19.
- Zelena, K., B. Hardebusch, B. Hulsdau, R. G. Berger, and H. Zorn. 2009. 'Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases', *J Agric Food Chem*, 57: 9951-5.
- Zubieta, C., R. Joseph, S. S. Krishna, D. McMullan, M. Kapoor, H. L. Axelrod, M. D. Miller, P. Abdubek, C. Acosta, T. Astakhova, D. Carlton, H. J. Chiu, T. Clayton, M. C. Deller, L. Duan, Y. Elias, M. A. Elsliger, J. Feuerhelm, S. K. Grzechnik, J. Hale, G. W. Han, L. Jaroszewski, K. K. Jin, H. E. Klock, M. W. Knuth, P. Kozbial, A. Kumar, D. Marciano, A. T. Morse, K. D. Murphy, E. Nigoghossian, L. Okach, S. Oommachen, R. Reyes, C. L. Rife, P. Schimmel, C. V. Trout, H. van den Bedem, D. Weekes, A. White, Q. Xu, K. O. Hodgson, J. Wooley, A. M. Deacon, A. Godzik, S. A. Lesley, and I. A. Wilson. 2007. 'Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA', *Proteins*, 69: 234-43.

PUBLICACIONES

Cite this: *Catal. Sci. Technol.*, 2016,
6, 6277Asymmetric sulfoxidation by engineering the
heme pocket of a dye-decolorizing peroxidase†Dolores Linde,^{‡a} Marina Cañellas,^{‡bc} Cristina Coscolín,^{§a} Irene Davó-Siguero,^a
Antonio Romero,^a Fátima Lucas,^{bc} Francisco J. Ruiz-Dueñas,^a
Victor Guallar^{*bd} and Angel T. Martínez^{*a}

The so-called dye-decolorizing peroxidases (DyPs) constitute a new family of proteins exhibiting remarkable stability. With the aim of providing them new catalytic activities of biotechnological interest, the heme pocket of one of the few DyPs fully characterized to date (from the fungus *Auricularia auricula-judae*) was redesigned based on the crystal structure available, and its potential for asymmetric sulfoxidation was evaluated. Chiral sulfoxides are important targets in organic synthesis and enzyme catalysis, due to a variety of applications. Interestingly, one of the DyP variants, F359G, is highly stereoselective in sulfoxidizing methyl-phenyl sulfide and methyl-*p*-tolyl sulfide (95–99% conversion, with up to 99% excess of the *S* enantiomer in short reaction times), while the parent DyP has no sulfoxidation activity, and the L357G variant produces both *R* and *S* enantiomers. The two variants were crystallized, and their crystal structures were used in molecular simulations to provide a rational explanation for the new catalytic activities. Protein energy landscape exploration (PELE) showed more favorable protein–substrate catalytic complexes for the above variants, with a considerable number of structures near the oxygen atom of the activated heme, which is incorporated into the substrates as shown in ¹⁸O-labeling experiments, and improved affinity with respect to the parent enzyme, explaining their sulfoxidation activity. Additional quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations were performed to elucidate the high stereoselectivity observed for the F359G variant, which correlated with higher reactivity on the substrate molecules adopting pro-*S* poses at the active site. Similar computational analyses can help introduce/improve (stereoselective) sulfoxidation activity in related heme proteins.

Received 10th March 2016,
Accepted 23rd May 2016

DOI: 10.1039/c6cy00539j

www.rsc.org/catalysis

Introduction

There is increasing interest in the synthesis and use of molecules containing stereogenic centers. The sulfur atom of sulfoxides bearing two different substituents is a chiral center, since it adopts tetrahedral sp³ hybridization, with a lone electron pair occupying the fourth quadrant. Chiral sulfoxides

have a wide range of applications, from chiral auxiliaries to pharmaceuticals.¹ Among enzymes of interest in chiral synthesis,² flavoenzymes (including Baeyer–Villiger mono-oxygenases) and hemeperoxidases are used for sulfoxidation reactions.^{3–5} Cytochrome P450 enzymes also catalyze sulfoxidations, but the requirement of an auxiliary flavin-containing enzyme/domain (and a source of reducing power, as in the case of NAD[P]H-dependent flavoenzymes) limits their biotechnological applicability.⁶ The enzymatic production of active *S* omeprazole, a multibillion dollar drug, by a modified cyclohexanone monooxygenase is a good example of these biotransformations.⁷

In peroxidases, the oxidation reaction is mediated by a peroxygenase mechanism rather than a peroxidase mechanism, and sulfoxidation of thioanisole (methyl-phenyl sulfide, MPS) and methyl-*p*-tolyl sulfide (MTS) yielding the corresponding sulfoxides has been used as a probe of oxygen transfer to organic sulfides. In this way, sulfoxidation has been reported for the well-known fungal chloroperoxidase (CPO)^{8–10} and horseradish peroxidase (HRP),^{10–12} as well as for other haloperoxidases (including vanadium peroxidases),¹³ several

^a Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain. E-mail: ATMartinez@cib.csic.es

^b Joint BSC-CRG-IRB Research Program in Computational Biology, Barcelona Supercomputing Center, Jordi Girona 29, E-08034 Barcelona, Spain. E-mail: victor.guallar@bsc.es

^c Anaxomics Biotech, Balmes 89, E-08008 Barcelona, Spain

^d ICREA, Passeig Lluís Companys 23, E-08010 Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Table S1 shows the X-ray data collection and refinement statistics, Fig. S1 shows the simulation position and distance analysis for the L357G variant, and Fig. S2 shows correlation between substrate spin density and charge distribution. See DOI: 10.1039/c6cy00539j

‡ These two authors contributed equally to this work.

§ Current address: Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain.



animal peroxidases,¹⁴ and also for cytochrome *c* peroxidase (CcP),¹⁵ *Coprinopsis cinerea* peroxidase (CiP),¹⁶ and lignin peroxidase (LiP),¹⁷ with different conversion rates and stereoselectivities. Recently, a robust peroxidase/ peroxygenase of the HTP protein superfamily has been described from the basidiomycete *Agrocybe aegerita* with predominant monooxygenase activity (unspecific peroxygenase, UPO),¹⁸ which is able to selectively convert MPS into the *R* enantiomer of methyl-phenyl sulfoxide.^{19,20} Another UPO, from the related fungus *Coprinellus varians*, is especially efficient in sulfoxidizing dibenzothiophene.²¹

Although the natural substrate/s of the so-called dye-decolorizing peroxidases (DyPs), forming part of the new CDE protein superfamily,²² are still to be identified, these enzymes present considerable catalytic versatility and exceptional stability under extreme pH, temperature, and even pressure conditions.^{23,24} DyPs, as some fungal ligninolytic peroxidases of the peroxidase–catalase superfamily (LiP and versatile peroxidase), have the ability to oxidize substrates at two catalytic sites, one located at an exposed protein radical and a second one at the heme pocket, which has a more axial access in DyPs than in ligninolytic and related peroxidases.²⁵

In this work, we engineer the heme pocket of the *Auricularia auricula-judae* DyP, one of the few members of this new family fully characterized to date,^{26–28} with the aim of providing new catalytic properties to the enzyme. The native recombinant DyP is unable to perform sulfoxidation reaction, but interestingly, two individual mutations at the heme pocket provide sulfoxidation activity on MPS and MTS. More interestingly, one of them was stereoselectively forming the *S* enantiomer, while the second variant yielded similar percentages of both isomers. With the use of molecular modeling techniques, we aim to provide a rational explanation at the atomic level of the differences in yield and selectivity observed during sulfoxidation of MPS and MTS by the native DyP and its two heme pocket variants, whose crystal structures were solved.

Results and discussion

Experimental enzyme engineering and sulfoxidation reactions

The heme pockets of *A. auricula-judae* DyP and other peroxidases were compared, and variants with enlarged access to the enzyme cofactor were obtained and evaluated for sulfoxidation of two organic sulfides, as described in the next three sections.

Redesigning the DyP heme pocket for sulfoxidation. A comparison of the upper side of the heme pocket (where Fe⁴⁺=O is located in compound I after H₂O₂ activation) in peroxidases from three different superfamilies is shown in Fig. 1. In HRP (Fig. 1A), the so-called distal histidine occupies an axial position (above the heme iron) contributing to the reaction with H₂O₂ together with a neighbor arginine.²⁹ In UPO (Fig. 1B), a glutamate/arginine couple plays a similar function,³⁰ while the couple is aspartate/arginine in DyP (Fig. 1C).²⁷

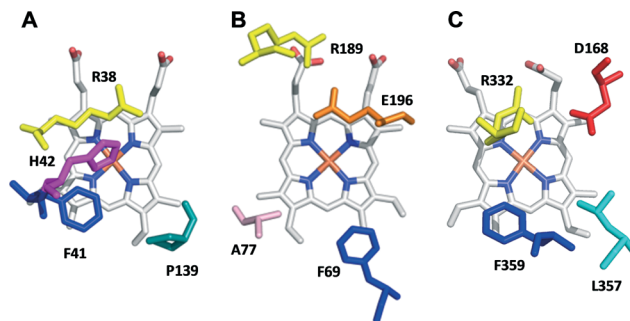


Fig. 1 Upper side of the heme pocket in the crystal structures of (A) HRP (PDB 1ATJ), (B) *A. aegerita* UPO (PDB 2YP1), and (C) *A. auricula-judae* DyP (PDB 4W7J) (this heme side is also known as the distal side due to the presence of the distal histidine of peroxidase-catalases, His42 in A).

Due to their crucial role in the formation of reactive compound I, site-directed mutagenesis of the above-mentioned residues in *A. auricula-judae* DyP drastically decreased its catalytic efficiency reducing H₂O₂ (measured with 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid], ABTS, as the enzyme reducing substrate), which passed from 2050 s⁻¹ mM⁻¹ in native DyP to only 4 and 1 s⁻¹ mM⁻¹ in the D168N and R332L variants, respectively. Therefore, other residues contributing to a confined heme pocket in DyP, such as Phe359 (homologous to Phe41 in HRP) and Leu357 (Fig. 1C), were modified, and the enlarged pocket variants were expressed in *E. coli*, *in vitro* activated, purified to homogeneity (with specific activities of 400–500 U mg⁻¹ measured with ABTS), and crystallized, and their sulfoxidation activity was evaluated, as described below.

Although the L357G variant showed slightly decreased thermal and pH stabilities ($T_{50} = 59$ °C and 50% activity at pH 9), the F359G variant did not show significantly modified stability in the range of pH 4–9 (being always higher than 85%) and had only one degree lower T_{50} (61 °C) than the native recombinant DyP (62 °C).

Crystal structures of the DyP L357G and F359G variants. Crystal structures of the L357G (PDB 5IKG) and F359G (PDB 5IKD) variants were solved at 1.9 and 1.1 Å, respectively. Their subsequent analysis confirmed that the overall folding characterizing these enzymes as well as the position of the heme group were conserved. As expected, the only changes observed were in the region where mutations were introduced, and basically consisted in the enlargement of the heme pocket, which was more significant for the F359G variant (Fig. 2A–C), while the channel opening at the protein surface was wider in the L357G variant (Fig. 2D–F).

A close-up view of the heme pocket shows an asymmetric distribution of the cavity according to the volume and position of the mutated residue. Thus, in the F359G variant, the heme pocket is larger allowing the substrate to be properly positioned, with a potential effect on the stereoselectivity of sulfoxidation.



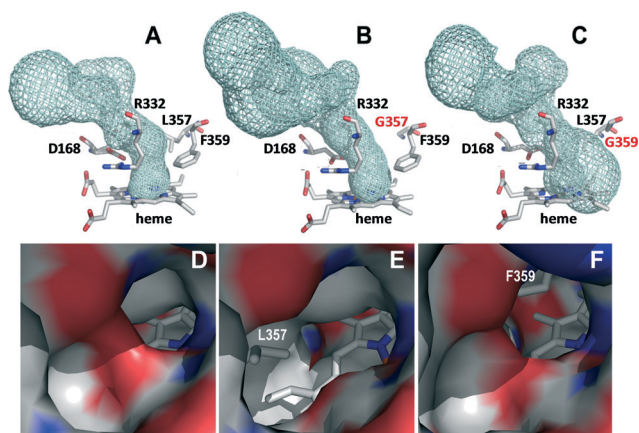


Fig. 2 Details of the access channel to the heme pocket (top) and its opening at the protein surface (bottom) in the crystal structures of the native DyP (A and D), L357G variant (B and E) and F359G variant (C and F). In A–C, the heme access channel is shown as cyan meshes and the heme and neighbor residues as CPK-colored sticks (the two mutated residues in B and C with red labels), while in D–F an electrostatic potential surface is shown, with the heme as CPK sticks and the removed side chains in the two variants as gray sticks.

Sulfoxidation chromatographic and kinetic analyses. Oxidation of MPS and MTS by the *A. auricula-judae* DyP (native recombinant protein) and its L357G, F359G, F359W and F359H variants was followed in time course reactions using chiral HPLC. Native DyP only produced a small amount of methyl phenyl sulfoxide, 25% MPS conversion after 6 h incubation, and it did not sulfoxidize the bigger substrate MTS (Fig. 3). However, the reactions with the heme pocket variants revealed that L357G and F359G were able to perform sulfoxidation with high efficiency. In the case of MPS, 92% conversion and 95% conversion after 30 min reaction were obtained with the L357G and F359G variants, respectively (Fig. 3A), while 65% conversion and 99% conversion of MTS under the same reaction conditions were obtained, respectively (Fig. 3D). The conversion rates were high (up to 95–99%), and no additional oxidation products (sulfones) were detected. The F359W and F359H variants, including changes that did not enlarge the heme pocket, were unable to sulfoxidize any of the two sulfides assayed. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses of reactions using $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (90% isotopic labeling) yielded ^{18}O -sulfoxides (88% and 79% labeling for MPS conversion with the F359G and L357G variants, respectively) revealing that sulfoxidation was a peroxygenation reaction (6% ^{18}O -labeling was found in the reactions with $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ in H_2^{18}O buffer).

These long-term incubation experiments were complemented by estimating kinetic constants for MPS and MTS oxidation under steady-state conditions. F359G showed higher catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) than L357G due to 2-fold higher turnover number (k_{cat}) and lower K_{m} (Table 1). This agrees with the higher catalytic efficiency of the F359G variant oxidizing the standard substrate ABTS at the heme channel ($1040 \pm 80 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) compared with L357G ($175 \pm 19 \text{ s}^{-1}$

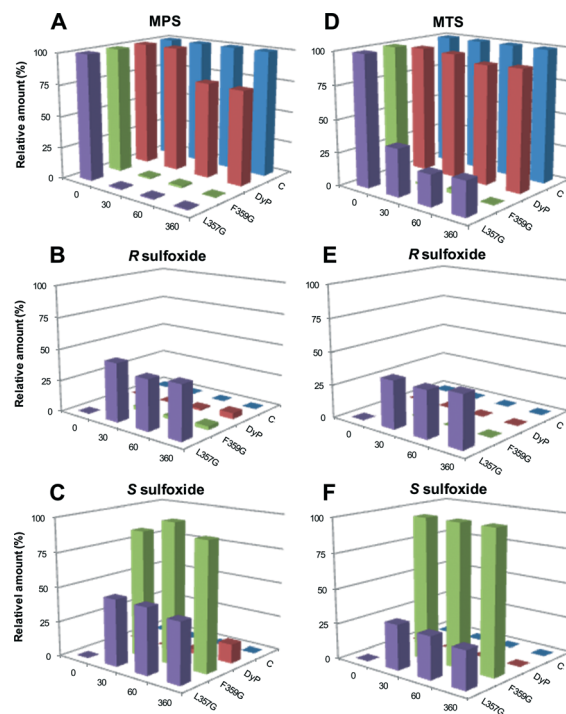


Fig. 3 Results from chiral HPLC analysis of MPS (A–C) and MTS (D–F) reactions with native DyP and L357G and F359G variants and controls (C) without the enzyme (after 0, 30, 60 and 360 min incubation) showing the remaining substrate (A and D) and the resulting R (B and E) and S (C and F) sulfoxides.

mM^{-1}). The sulfoxidation catalytic efficiency (and other kinetic constants) of F359G DyP is 2–3 orders of magnitude higher than that of wild-type HRP,^{11,12} in the same order of those reported for the best HRP variants,^{31–34} and lower than that reported for wild-type CPO (the classic sulfoxidation biocatalysts),³⁵ and especially for the recently discovered UPO.²⁰

Interestingly, in the MPS (Fig. 3B and C) and MTS (Fig. 3E and F) reactions, the enantiomeric production by the two variants is not the same. L357G produces nearly racemic mixtures of the methyl-phenyl and methyl-*p*-tolyl sulfoxides, while F359G is stereoselectively producing the *S* sulfoxide. From these values, enantiomeric excesses (ee) of 92% and 99% were calculated for MPS and MTS oxidation by the F359G variant, respectively, while the L357G was scarcely stereoselective, as shown in Table 2. On the other hand, F359G showed a higher total conversion rate than L357G, in agreement with its higher catalytic efficiency shown in Table 1.

Sulfoxidation had been reported for a bacterial (*Thermobifida fusca*) DyP, but the conversion was poor (no rate provided) and the reaction was only slightly selective (61/49% ee after 36 h reaction with MPS/MTS).³⁶ On the other hand, improvements in sulfoxidation ability have been reported by engineering the heme pocket of HRP,^{31–34} and CcP.¹⁵ These included the W51A and F41L variants, in which the bulky tryptophan/phenylalanine side chains in the active sites of CcP and HRP, respectively, were replaced by smaller groups. This agrees with the present results showing that



Table 1 Kinetic constants – k_{cat} (s^{-1}), K_{m} (mM) and $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) – for MPS and MTS sulfoxidation with native DyP and two directed variants (means and 95% confidence limits)

	MPS			MTS		
	k_{cat}	K_{m}	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	k_{cat}	K_{m}	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$
DyP	0	—	—	0	—	—
L357G	8.0 ± 0.5	0.60 ± 0.08	13.3 ± 1.0	0	—	—
F359G	17.2 ± 0.9	0.37 ± 0.01	45.9 ± 7.4	3.6 ± 0.4	0.13 ± 0.03	26.5 ± 3.8

Table 2 Chiral HPLC analysis of MPS and MTS reactions (30 min) with native DyP and two directed variants

	MPS			MTS		
	Conversion (%)	Isomer	ee (%)	Conversion (%)	Isomer	ee (%)
DyP	0	—	— ^a	0	—	—
L357G	92	<i>S</i>	2	65	<i>R</i>	8
F359G	95	<i>S</i>	92	99	<i>S</i>	99

^a Only 25% conversion of MPS by DyP after 360 min with 42% ee of the *S* isomer.

enlarging the heme pocket of DyP, as found in the F359G variant, resulted in efficient (and stereoselective) sulfoxidation. Protein engineering has also been reported to improve other sulfoxidation reactions, such as in the Codexis patent for the already mentioned production of *S* omeprazole by a bacterial monooxygenase.³⁷

Computational analyses

For a deeper inquiry on the atomic mechanistic details responsible for the observed differences in sulfoxidation (rate and selectivity) by the native DyP and its two variants, we turned to molecular modeling using the crystal structures solved in this work, as described in the next two sections.

Ligand diffusion energy profiles. When analyzing both the interaction energies and the substrate–heme distances (from the compound I oxygen to the sulfur atom of the substrates), protein energy landscape exploration (PELE) simulations show a more favorable protein–substrate catalytic complex for the two variants. In L357G and F359G (Fig. 4B and C, respectively), we find a considerable number of structures below 4 Å (which we consider to be optimal for the reaction) with better interaction energies, with respect to the native enzyme (Fig. 4A).

Moreover, we see a higher number of trajectories at catalytic distances for those conditions where we observe over 90% conversion in 30 min: F359G reaction with MTS and MPS and L357G reaction with MPS. Notice that although in native-DyP MPS interaction energies are quite favorable, the ligand is positioned too far from the heme. These differences in the energy profiles, which indicate an unfavorable ligand–protein interaction and ligand positioning on native DyP, can explain its undetectable (on MTS) or very low (on

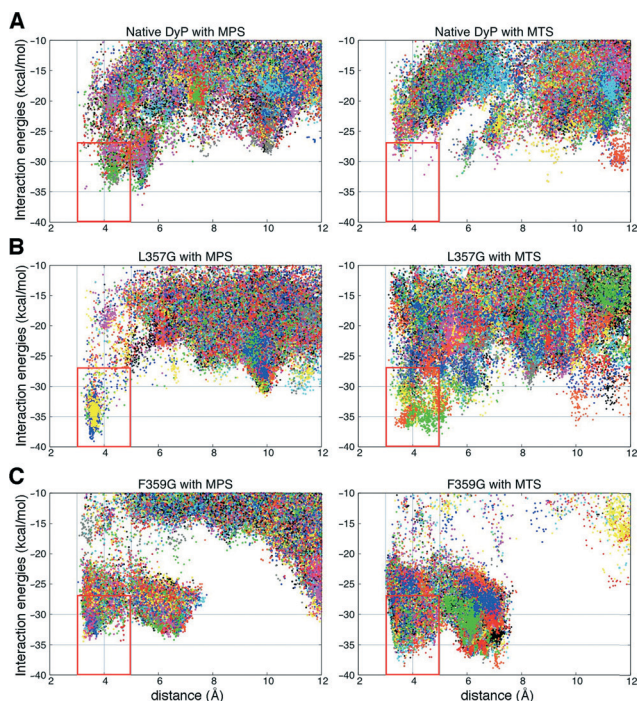


Fig. 4 Interaction energies (in kcal mol^{-1}) vs. ligand distances (in Å) from PELE simulations for MPS (left) and MTS (right) substrates in the (A) native DyP, (B) L357G variant, and (C) F359G variant. The distances are between the reactive O atom in the heme compound I and the sulfur (S) atom of the substrates; each color corresponds to a different trajectory. The structures used for the selectivity analysis are delimited with a red box.

MPS) activity, which was only observed in long-term incubation experiments.

Selectivity. To investigate the observed stereoselectivity of the sulfoxidation reaction, a study of the pro-*R* and pro-*S* positioning tendency for MPS and MTS was performed. For this, PELE structures from the lowest 10 kcal mol^{-1} interaction energies and with distances to the heme below 5 Å were selected (different criteria to select PELE structures did not significantly change the results). Then, the O–S–C1–C2 dihedral angles were extracted (Fig. 5), and all structures were classified into potential pro-*R*, pro-*S* or mixed pro-*R/S* poses.

First, it should be mentioned that there was a higher number of structures in a good position towards the heme and with an optimal energy to react in the F359G variant than in L357G, in agreement with the higher catalytic



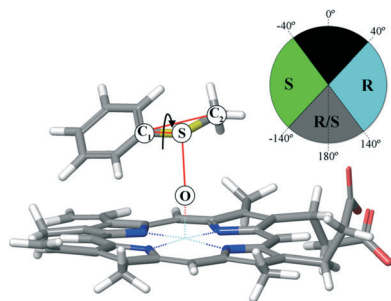


Fig. 5 *R/S* enantiomer classification criterion. The ϕ dihedral is computed from the compound I catalytic oxygen (O) atom and substrate S and carbon C1 and C2 atoms. When ϕ is between 40° and 140° , the substrate is classified as pro-*R*, and when ϕ is between -40° and -140° , it is classified as pro-*S*. Otherwise, the substrate is considered to be able to form both *R* and *S* enantiomers equally.

efficiency of the phenylalanine variant. The L357G and, especially, the F359G mutations cause a binding site enlargement, which improves MPS and MTS positioning in comparison with native DyP, as shown by PELE.

Fig. 6 shows the different pro-*R* (cyan) and pro-*S* (green) positions for the native DyP and F359G, the best variant. In DyP, the presence of large (and bulky) residues (Arg332, Leu357 and Phe359) in the heme pocket hinders the proper positioning of both MPS and MTS substrates. Otherwise, for the two mutant proteins, we find an easier positioning of the substrate ring, in correlation with the binding energy analysis shown above. However, contrary to experimental results, substrates on both DyP variants show a preference to adopt pro-*R* positions, even though pro-*S* and pro-*R/S* positions are also possible.

To clarify this apparent contradiction with the experimental results, substrate spin densities were computed with

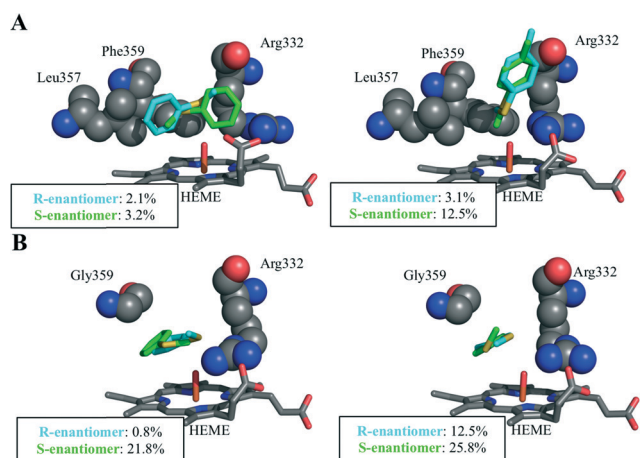


Fig. 6 Substrate positioning at the heme pocket: A) pro-*R* and pro-*S* MPS (left) and MTS (right) positioning on native DyP. B) Pro-*R* and pro-*S* MPS (left) and MTS (right) positioning on the F359G variant. Pro-*S* and pro-*R* substrate positions are shown as CPK sticks with the C atoms in green and cyan color, respectively. The spin density population on the substrate, from QM/MM calculations, is indicated in each image.

quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations on the best (substrate) positioned structures. The spin density originates from substrate oxidation, which directly correlates with sulfoxidation.^{38,39} In addition to having better protein–ligand interaction energies, as described above, the DyP variants showed a significantly larger spin density than the native DyP, again confirming the improvement in catalytic activity upon mutation. Moreover, in the F359G variant, we observe a substantial difference between the spin density values for the two enantiomers provided in Fig. 6, which might discriminate against the *R* enantiomer oxidation. Thus, even though a higher percentage of structures are placed favoring the formation of an *R* enantiomer, pro-*S* structures are more easily oxidized, which would explain the *S* stereoselectivity experimentally observed for this variant. In agreement with the racemic mixture seen experimentally for the L357G variant, we see a higher relative frequency of the pro-*R/S* position for L357G compared to F359G (Fig. S1A†).

Interestingly, changes in spin density, associated with the different enantiomers, correlate with the position adopted by the substrate with respect to Arg332. Mutations induce a change in the positioning of the ligand that leads to a closer interaction of the pro-*R* structures with this arginine residue (Fig. 7). As seen in previous publications,⁴⁰ the electrostatic environment changes caused by this positive charge could lead to an altered substrate oxidation. This effect is larger in the F359G variant, where differences in spin density are more pronounced, while L357G results do not show a significant population of the pro-*S* conformer at large distances (Fig. S1B†). The correlation between the substrate spin density and its charge distribution was further verified by QM/MM calculations on 10 selected structures with different charge distribution (Fig. S2†).

In connection with the above computational results, improvement in the HRP sulfoxidation ability has been reported by removing the distal arginine residue (Fig. 1A).³³ A similar change is not possible in DyP engineering, since Arg332 (Fig. 1C) is necessary for DyP activation by H₂O₂, the catalytic

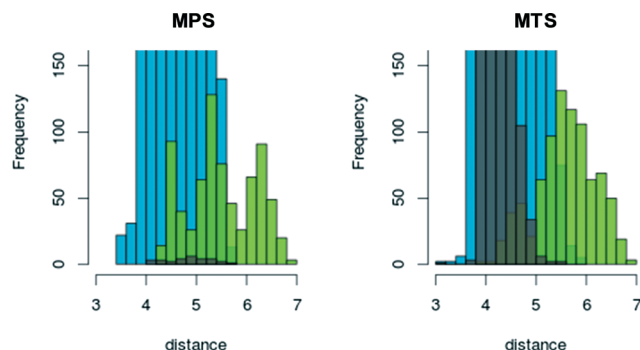


Fig. 7 Frequency–distance (in Å) distribution of MPS and MTS S atom to Arg332 CZ atom on the F359G variant for the selected reactive structures: last 10 kcal mol⁻¹ interaction energies and distances to the heme below 5 Å. Histograms for pro-*R* structures are shown in cyan, for pro-*S* structures in green, and for pro-*R/S* structures in grey.



efficiency being 2000-fold lower in the R332L variant, as shown above.

Conclusions

Stereoselective sulfoxidation ability could be introduced in a model (robust) peroxidase (*A. auricula-judae* DyP) by directed mutagenesis of residues at the distal side of the heme cofactor. The best variant (F359G) converted 95–99% MPS and MTS into the corresponding sulfoxides in 30 min reactions yielding the *S* enantiomer with 90–99 ee. The crystal structure of the F359G variant revealed an enlarged heme pocket enabling better accommodation of the sulfide substrates near the Fe⁴⁺=O of the activated heme cofactor, whose oxygen atom is transferred to the sulfide substrate as shown by ¹⁸O-labeling (in H₂¹⁸O₂ reactions).

Computational modeling, based on the crystal structures of the parent enzyme and several variants, showed that the sulfoxidation ability of the F359G variant (no reaction was produced by the parent enzyme) is due to better substrate access (closer distance) to the reactive cofactor with better interaction energies, as shown by the PELE software. Moreover, the sulfoxidation stereoselectivity could be rationalized by QM/MM calculations predicting a higher reactivity of the sulfide molecules adopting pro-*S* poses at the active site (which was affected by a heme pocket arginine residue).

The study also demonstrates how molecular simulations can help obtain the required oxidation yields and stereoselectivities in sulfoxidation engineering.

Materials and methods

Chemicals

Hexane (HPLC quality), 4'-methoxyacetophenone, methylphenyl sulfoxide, *R*-(+)-methyl-*p*-tolyl sulfoxide, *R/S* methyl-*p*-tolyl sulfoxide, MPS and MTS were from Sigma-Aldrich. Isopropyl alcohol (LC-MS quality) was from Fluka. Dichloromethane (HPLC quality) was from Merck.

Directed mutagenesis

Simple DyP variants were produced by PCR using the pET23a-DyPI vector harboring the mature protein-coding sequence of *A. auricula-judae* DyP as a template.²⁴ For each mutation, a direct primer and a reverse primer were designed complementary to opposite strands of the DNA region containing the desired mutation. The sequences of the direct primers (with the mutated codons in italics) used for mutagenic PCR were the following: D168N mutation, 5'-G TTC GGC TTC CTT AAC GGA ATT GCT CAG CC-3'; R332L mutation, 5'-GCT AAC TCT ATC ATG *CTC* AGC GGC ATC CC-3'; L357G mutation, 5'-CT CAG GAG CGC GGC *GGA* GCG TTT GTG GCA TAC-3'; F359G, F359H or F359W mutations, 5'-GGC CTT GCG (*GGA*, *CAC* or *TGG*, respectively) GTG GCA TAC-3'.

PCR reactions were carried out in an Eppendorf (Hamburg, Germany) Mastercycler Pro using 10 ng of template DNA, 250 μM of each dNTP, 125 ng of direct and reverse

primers, 2.5 units of polymerase (Expand Long Template PCR System), and the manufacturer's reaction buffer. Reaction conditions were as follows: i) a "hot start" of 95 °C for 1 min; ii) 18 cycles at 95 °C for 50 s, 55 °C for 50 s, and 68 °C for 10 min; and iii) a final cycle at 68 °C for 10 min. The mutated sequences were confirmed by DNA sequencing using an ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystem). pET23a-DyPI plasmids containing the mutations described above were digested with endonuclease DpnI and transformed into *E. coli* DH5α for propagation.

Enzyme production

E. coli BL21(DE3)pLysS cells with the pET23a-DyPI vector containing the *A. auricula-judae* mature DyP sequence (and those of DyP variants) were grown overnight at 37 °C and 170 rpm in Luria Bertani broth (with 100 μg mL⁻¹ ampicillin and 34 μg mL⁻¹ chloramphenicol) and used to inoculate 2 L flasks containing 1 L of Terrific Broth (TB) (with 100 μg mL⁻¹ ampicillin and 34 μg mL⁻¹ chloramphenicol) that were grown for 3 h at 37 °C and 200 rpm, induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, grown for further 4 h, and harvested by centrifugation. The apoenzyme, accumulated in inclusion bodies, was solubilized in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 8 M urea, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol for 1 h at 4 °C. *In vitro* activation of the native DyP and its D168N, R332L and L357G variants was carried out as previously described,²⁴ and specific activities were determined using 7.5 mM ABTS as a substrate and 2.5 mM H₂O₂.

For the three Phe359 variants, *in vitro* activation was performed at 4 °C using 0.15 M urea, 10 μM hemin, 0.02 mM dithiothreitol, 0.4 mM GSSG, 20% glycerol, 0.1 mM EDTA and 0.1 mg mL⁻¹ protein in 50 mM phosphate (pH 6.5). After 144 h, the folding mixture was concentrated using a Millipore Pellicon ultrafiltration system (10 kDa cutoff) and centrifuged for 18 h at 13 000 rpm. Once concentrated, samples were dialyzed against 20 mM sodium acetate (pH 4.3), and the insoluble material was eliminated by centrifugation (13 000 rpm, 30 min).

Active DyPs (native enzyme and four directed variants) were purified using a Resource Q column (GE Healthcare) coupled to an ÄKTA liquid chromatography system, using a gradient from 0 to 0.3 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7 (15 min, 2 mL min⁻¹). DyPs were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis to confirm the purity of the proteins. The absorption spectra were recorded in 10 mM sodium tartrate (pH 5) at 25 °C using a Thermo Spectronic diode-array spectrophotometer. The DyP molar absorption coefficient (ϵ_{405} 117 000 M⁻¹ cm⁻¹) was used for protein concentration determination.

Enzyme kinetics

Steady-state kinetic studies were performed by measuring the initial rates for MPS and MTS oxidation at 25 °C in 100 mM acetate, pH 5 (in triplicate). A 500 mM MPS and MTS stock in ethanol was serially diluted in ethanol to obtain final



substrate concentrations from 250 mM to 2 mM. 10 μL of substrate were used to measure activity in 1 mL of reaction, in 1 cm light path cuvettes (when the initial absorbance was greater than 1, 0.33 mL reactions in 0.1 cm light path cuvettes were performed). 200 nM and 100 nM concentrations of native DyP and its mutated variants were used, respectively, and the reactions were started by adding 2 mM H_2O_2 . The initial rates (absorbance decrease) were calculated using the differences in the molar absorption coefficients ($\Delta\epsilon$) of MPS and methyl-phenyl sulfoxide ($\Delta\epsilon_{254}$ 7870 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and MTS and methyl-*p*-tolyl sulfoxide ($\Delta\epsilon_{253}$ 8040 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).⁴¹ Kinetic constants for H_2O_2 reduction and ABTS oxidation were estimated by following the formation of the ABTS cation radical (ϵ_{436} 29 300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). In the former case, a saturation concentration of ABTS (7.5 mM for native DyP and the L357G variant and 2.5 mM for the D168N, R332L, F359G, F359H and F359W variants), 10 nM enzyme, and different concentrations of H_2O_2 (from 20 μM to 25 mM) in 100 mM tartrate, pH 3, were used, while in the second case oxidation of different ABTS concentrations, in the presence 2.5 mM H_2O_2 , was measured. Plotting and analysis of kinetic curves were carried out using SigmaPlot 11.0. Apparent affinity, turnover number and catalytic efficiency were estimated by non-linear least-squares fitting to the Michaelis–Menten model.

Chromatographic analyses

Reactions (at 25 $^\circ\text{C}$) were performed using 2 mL of 50 mM sodium acetate (pH 5) containing substrate (1 mM MPS or 0.5 mM MTS), 4 μM enzyme, and 1 mM H_2O_2 . At 0, 30, 60 and 360 min of reaction, 0.5 mL aliquots were taken, and after addition of 4'-methoxyacetophenone as internal standard, the solution was extracted with hexane and analyzed by chiral HPLC.

The reaction products were analyzed using an Agilent HPLC equipment fitted with a Chiralpack IB column (dimensions of 4.6 mm \times 250 mm and particle size of 5 μm) and as a mobile phase isocratic hexane : isopropyl alcohol (95 : 5, v/v) for 40 min for analysis of reactions with MPS and 98 : 2 (v/v) for 70 min for reactions with MTS, at a flow rate of 1 mL min^{-1} , at room temperature. Elution was monitored at 207, 216, 237, 248 and 263 nm. Calibration curves were obtained for identification and quantification of substrates and their sulfoxidation products. The retention times for the *R* (62 min) and *S* (64 min) methyl-*p*-tolyl sulfoxides were obtained from the corresponding standards, while those for the *R* (31 min) and *S* (33 min) methyl-phenyl sulfoxides were obtained from enzymatic oxidation of MPS assuming the published elution order,⁴² which coincided with that observed for the two methyl-*p*-tolyl sulfoxides.

Enzymatic reactions with ^{18}O -labeled hydrogen peroxide ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, 90% isotopic content, 2% w/v solution) and water (H_2^{18}O , 97% isotopic content) from Sigma-Aldrich were performed under the same conditions, extracted with dichloromethane, and analyzed by GC-MS using a gas chro-

matograph equipped with an HP-5MS column (Agilent, Santa Clara, CA, USA; 30 m \times 0.25 mm internal diameter; 0.25 μm film thickness) coupled to a quadrupole mass detector. Helium was used as the carrier gas, and the oven program started at 110 $^\circ\text{C}$ for 2 min and increased at 20 $^\circ\text{C} \text{min}^{-1}$ until 240 $^\circ\text{C}$. ^{18}O -labeling was calculated as the ratio between the abundances of the ^{18}O - to ^{16}O sulfoxide peaks, in their molecular ion (m/z 142 and 140, respectively, in the MPS reactions) chromatograms.

pH and temperature stability

The pH stability of the L357G and F359G variants and the native recombinant DyP was determined by incubating the enzymes (1 μM) for 24 h in 50 mM Britton–Robinson buffer (pH 2–12) at 25 $^\circ\text{C}$. To evaluate their temperature stability, the enzymes in 10 mM sodium tartrate (pH 5) were incubated in the range from 25 to 80 $^\circ\text{C}$ for 10 min, followed by 2 min at 4 $^\circ\text{C}$. The remaining activities were measured (in triplicate reactions) using 2.5 mM ABTS in 100 mM sodium tartrate (pH 3), as described above. The activity immediately after adding the enzyme to the buffer was taken as 100%. The T_{50} values, defined as the temperature at which 50% of activity is lost in 10 min incubation, were calculated.

Crystallization, data collection and refinement

Crystallization of the L357G and F359G variants was performed in 96-well sitting drop plates (Swissci MRC, England) at 22 $^\circ\text{C}$ using a Cartesian Honeybee robot (Digital, USA) and commercially available kits: JBScreen Classic (Jenna Bioscience, Germany), Wizard Classic Screen (Emerald Biostructures, USA) and ProPlex HT-96 (Molecular Dimensions, UK). Each droplet was 0.4 μL in size, containing 0.2 μL of protein (3 μg) solution and 0.2 μL of precipitant and was equilibrated over 50 μL of reservoir solution. Crystals of the L357G mutant were obtained in 5% MPD (v/v), 100 mM MES (pH 6.5) and 15% PEG 6000 (w/v). For the F359G variant, crystals were obtained in 2 M magnesium formate and 20% PEG 3350 (w/v). Crystals were cryoprotected using Paratone-N (Hampton Research).

X-ray diffraction images were collected at the ESRF (Grenoble, France) and ALBA (Barcelona, Spain) synchrotrons. Diffraction data were processed using XDS⁴³ and scaled using AIMLESS.^{44,45} The structures were solved by molecular replacement using PHASER,⁴⁶ with the *A. auricula-judae* native DyP (PDB 4W7J) as the search model. The initial model was first refined with REFMAC5 (ref. 47) and alternating manual building with COOT.⁴⁸ The final model was obtained by repetitive cycles of refinement using PHENIX.⁴⁶ Subsequent refinement, introduction of solvent molecules and structure validation were as described for the native DyP²⁶ (data collection, refinement and final statistics of the two DyP variants are summarized in Table S1†).

The L357G structure did not show electron density for the first residue at the N-terminus, but the whole sequence could be solved for the F359G variant. In contrast, the C-terminal



region showed good electron density for both structures. The coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank.

System preparation for molecular modeling

The starting structures for the computational simulations were the native DyP crystal at a resolution of 1.79 Å (PDB 4W7J)²⁶ and the crystal structures of the L357G and F359G variants (PDB 5IKG and 5IKD, respectively). Protein structures were prepared accordingly under pH 5 conditions, optimal for MPS and MTS sulfoxidation, using Schrödinger's Protein Preparation Wizard,⁴⁹ and the H++ web server.⁵⁰ Under these mild acidic conditions, histidines were double-protonated, with the exception of His-115 (ϵ -protonated) and His-304 (δ -protonated), and all other acidic residues were deprotonated. The heme site was modeled as thiolate-ligated compound I after being fully optimized in the protein environment with quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) using QSite (see below for the level of theory).⁵¹ Finally, MPS and MTS molecules were optimized with Jaguar,⁵² at the density functional theory (DFT) M06 level with the 6-31G** basis set and Poisson–Boltzmann Finite element (PBF) implicit solvent in order to obtain their electrostatic potential atomic charges.

PELE computational analysis

Once the protein structures had been prepared and ligands optimized, heme binding site exploration was performed with PELE, a Monte Carlo-based algorithm capable of effectively sampling the protein–ligand conformational space.^{53,54} The substrates were placed manually in identical positions at the entrance of the heme-access channel of each protein. PELE simulations were carried out in two stages: first, ligands were requested to move from the solvent to the heme site, and once the center of mass of the ligand was within 5 Å of the heme catalytic oxygen, it was free to explore the active site pocket with a 15 Å restraint. The results presented here are based on 240 trajectories \times 48 h for each ligand.

QM/MM simulations

Hybrid QM/MM calculations were carried out in order to investigate the mutation effect on substrate sulfoxidation. PELE minima snapshots of MPS and MTS substrates on native DyP, L357G and F359F variant binding sites were selected for quantum calculations. For each case, at least two structures were investigated: a structure with the ligand in an optimal orientation toward the heme reactive oxygen to produce an *R*(-)-sulfoxide product and a structure with the ligand placed correctly to give an *S*(+)-sulfoxide product. QM/MM calculations were performed by including the heme (modeled as compound I), its axial ligand and the substrate in the quantum region and computing the spin density. In order to prepare the system for QM/MM, 0.5 ns molecular dynamics were performed with Desmond,⁵⁵ using SPC (sim-

ple point charge) solvent and an ionic force of 0.15 M. Calculations were performed at the DFT M06-L(lacvp*)/OPLS level with QSite.⁵²

Acknowledgements

This work was supported by the INDOX (KBBE-2013-7-613549) EU project and by the BIO2014-56388-R (NOESIS), BFU2014-55448-P and CTQ2013-48287-R projects of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). Pedro Merino (University of Zaragoza, Spain) is acknowledged for his suggestions on chiral HPLC analyses, and Alicia Prieto and Leonor Rodríguez (CIB, Madrid, Spain) for their help in GC-MS analyses. We cordially thank the staff at ID23-1 beamline (ESRF) and the BL13-XALOC beamline (ALBA). F. J. R.-D. acknowledges a MINECO Ramón & Cajal contract.

Notes and references

- I. Fernández and N. Khair, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 3651–3706.
- H. Gröger, in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, ed. I. Ojima, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 269–341.
- W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek and M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 670–689.
- S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi and P. Pasta, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 163–168.
- A. Matura and K. H. van Pee, in *Enzyme catalysis in organic synthesis: A comprehensive handbook*, ed. K. Drautz, H. Gröger and O. May, Wiley, Weinheim, 2012, pp. 1553–1567.
- E. G. Hrycay and S. M. Bandiera, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2012, **522**, 71–89.
- T. Matsui, Y. Dekishima and M. Ueda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, **98**, 7699–7706.
- S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea and P. Pasta, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1992, **3**, 95–106.
- M. P. J. van Deurzen, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 13183–13220.
- S. Kobayashi, M. Nakano, T. Goto, T. Kimura and A. P. Schaap, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **135**, 166–171.
- S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea and P. Pasta, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 357–358.
- R. Z. Harris, S. L. Newmyer and P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1993, **268**, 1637–1645.
- V. M. Dembitsky, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 4701–4720.
- M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter and J. H. Dawson, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2841–2888.
- V. P. Miller, G. D. DePillis, J. C. Ferrer, A. G. Mauk and P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1992, **267**, 8936–8942.
- W. Adam, C. Mock-Knoblauch and C. R. Saha-Möller, *J. Organomet. Chem.*, 1999, **64**, 4834–4839.
- E. Baciocchi, M. F. Gerini, P. J. Harvey, O. Lanzalunga and S. Mancinelli, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 2705–2710.
- M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna and R. Ullrich, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2015, **851**, 341–368.



- 19 A. Horn, R. Ullrich, M. Hofrichter and K. Scheibner, *Abstracts BioTrans-2007*, Oviedo, 2007, p. 63.
- 20 A. Horn, *Der Einsatz einer neuartigen Peroxidase aus dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* am Beispiel der enantioselektiven Sulfoxidation*, PhD thesis, Universität Rostock, Rostock, 2009.
- 21 E. Aranda, M. Kinne, M. Kluge, R. Ullrich and M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **82**, 1057–1066.
- 22 B. Goblirsch, R. C. Kurker, B. R. Streit, C. M. Wilmot and J. L. Dubois, *J. Mol. Biol.*, 2011, **408**, 379–398.
- 23 M. Puhse, R. T. Szweda, Y. Y. Ma, C. Jeworrek, R. Winter and H. Zorn, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2009, **1794**, 1091–1098.
- 24 D. Linde, C. Coscolín, C. Liers, M. Hofrichter, A. T. Martínez and F. J. Ruiz-Dueñas, *Protein Expression Purif.*, 2014, **103**, 28–37.
- 25 D. Linde, F. J. Ruiz-Dueñas, E. Fernández-Fueyo, V. Guallar, K. E. Hammel, R. Pogni and A. T. Martínez, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2015, **574**, 66–74.
- 26 D. Linde, R. Pogni, M. Cañellas, F. Lucas, V. Guallar, M. C. Baratto, A. Sinicropi, V. Sáez-Jiménez, C. Coscolín, A. Romero, F. J. Medrano, F. J. Ruiz-Dueñas and A. T. Martínez, *Biochem. J.*, 2015, **466**, 253–262.
- 27 E. Strittmatter, C. Liers, R. Ullrich, S. Wachter, M. Hofrichter, D. A. Plattner and K. Piontek, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 2013, **288**, 4095–4102.
- 28 C. Liers, C. Bobeth, M. Pecyna, R. Ullrich and M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1869–1879.
- 29 J. N. Rodríguez-López, A. T. Smith and R. N. F. Thorneley, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1996, **271**, 4023–4030.
- 30 K. Piontek, E. Strittmatter, R. Ullrich, G. Grobe, M. J. Pecyna, M. Kluge, K. Scheibner, M. Hofrichter and D. A. Plattner, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 2013, **288**, 34767–34776.
- 31 S. L. Newmyer and P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1995, **270**, 19430–19438.
- 32 S. Ozaki and P. R. Ortiz de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 7056–7064.
- 33 M. I. Savenkova, J. M. Kuo and P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry*, 1998, **37**, 10828–10836.
- 34 M. I. Savenkova and P. R. Ortiz de Montellano, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **351**, 286–293.
- 35 F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 554–564.
- 36 E. van Bloois, D. E. T. Pazmino, R. T. Winter and M. W. Fraaije, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **86**, 1419–1430.
- 37 Y. K. Bong, M. D. Clay, S. J. Collier, B. Mijts, M. Vogel, X. Zhang, Y. Zhu, J. Nazor, D. Smith and S. Song, *Patent (International)*, WO071982, 2011.
- 38 S. Shaik, Y. Wang, H. Chen, J. Song and R. Meir, *Faraday Discuss.*, 2010, **145**, 49–70.
- 39 Y. Goto, T. Matsui, S. I. Ozaki, Y. Watanabe and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 9497–9502.
- 40 P. Molina-Espeja, M. Cañellas, F. Plou, M. Hofrichter, F. Lucas, V. Guallar and M. Alcalde, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 341–349.
- 41 C. Capeillere-Blandin, C. Martin, N. Gaggero, P. Pasta, G. Carrea and S. Colonna, *Biochem. J.*, 1998, **335**(Pt 1), 27–33.
- 42 Y. Wang, H. Li, W. Qi, Y. Yang, Y. Yan, B. Li and L. Wu, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 9181–9188.
- 43 W. Kabsch, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 125–132.
- 44 P. R. Evans, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2011, **67**, 282–292.
- 45 P. R. Evans and G. N. Murshudov, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2013, **69**, 1204–1214.
- 46 A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 658–674.
- 47 G. N. Murshudov, A. A. Vagin and D. J. Dodson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 1997, **53**, 255.
- 48 P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 486–501.
- 49 G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju and W. Sherman, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2013, **27**, 221–234.
- 50 R. Anandakrishnan, B. Aguilar and A. V. Onufriev, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, W537–W541.
- 51 Schrödinger, *QSite 5.7*, LCC, New York, 2011.
- 52 Schrödinger, *Jaguar 8.1*, LCC, New York, 2013.
- 53 K. W. Borrelli, A. Vitalis, R. Alcántara and V. Guallar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2005, **1**, 1304–1311.
- 54 K. Borrelli, B. Cossins and V. Guallar, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 1224–1235.
- 55 Desmond, *Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 2.4*, Schrödinger, New York, NY, 2010.



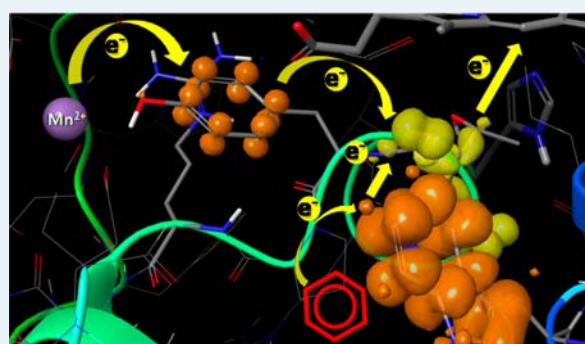
Description of a Non-Canonical Mn(II)-Oxidation Site in Peroxidases

Elena Fernández-Fueyo,^{§,‡} Irene Davó-Siguero,[§] David Almendral,[§] Dolores Linde,[§] Maria Camilla Baratto,^{#,⊥} Rebecca Pogni,^{#,⊥} Antonio Romero,[§] Victor Guallar,^{¶,†} and Angel T. Martínez^{*,§,‡}[§]Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), E-28006 Madrid, Spain[#]Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, I-53100 Siena, Italy[⊥]Consorzio per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase (CSGI), 50019 Florence, Italy[¶]Barcelona Supercomputing Center, E-08034 Barcelona, Spain[†]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), E-08010 Barcelona, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A dye-decolorizing peroxidase (DyP) from *Pleurotus ostreatus* (PosDyP4) catalyzes the oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺, in the presence of H₂O₂, with an efficiency similar to the well-known manganese peroxidases and versatile peroxidases from this and other white-rot fungi. PosDyP4 has been overexpressed in *Escherichia coli* as an active enzyme, and its crystal structure has been solved at 1.56 Å resolution. A combination of substrate diffusion simulations on the solved structure using the PELE software, electron paramagnetic resonance, and site-directed mutagenesis led to identification of the residues involved in Mn²⁺ oxidation. The oxidation site in PosDyP4 is different than the conserved site in the other Mn-oxidizing peroxidases mentioned above, and it includes four acidic residues (three aspartates and one glutamate) located at the surface of the protein. Moreover, since the Mn²⁺ ion is not in direct contact with the heme propionates, a tyrosine residue participates in the electron transfer to the cofactor, being the only essential individual residue for PosDyP4 oxidation of the metal ion. The four acidic residues contribute to Mn²⁺ binding in different extents, with the glutamate also involved in the initial electron transfer to the key tyrosine, as confirmed by the >50-fold decreased *k*_{cat} after removing its side-chain carboxylic group. A second electron transfer pathway operates in PosDyP4 for the oxidation of aromatics and dyes starting at a surface tryptophan, as reported in other fungal and prokaryotic DyPs, and connecting with the final part of the Mn²⁺ oxidation route. Both tryptophanyl and tyrosyl radicals, potentially involved in catalysis, were detected by electron paramagnetic resonance of the native enzyme and its tryptophan-less variant, respectively.

KEYWORDS: Mn-oxidation site, dye-decolorizing peroxidase, crystal structure, ligand diffusion, PELE, electron transfer, QM/MM calculations, EPR spectroscopy



INTRODUCTION

Peroxidases (EC1.11.1) can oxidize a variety of substrates using peroxides as final electron acceptors. They were traditionally classified into animal and nonanimal peroxidases, the second group being subdivided into three classes according to their origin, with fungal peroxidases forming class II. However, the recent discovery of new types of secreted fungal peroxidases has led to the establishment of two novel (super)families: the heme-thiolate peroxidases (HTP), in which classical chloroperoxidase and novel unspecific peroxxygenases are included; and the dye-decolorizing peroxidases (DyP),^{2–5} classified together with chlorite dismutases and *Escherichia coli* EfeB proteins in the CDE superfamily.⁶

The first DyP was discovered in a *Bjerkandera adusta* culture described as *Geotrichum candidum*.⁷ Its crystal structure was available in 2011,⁸ followed by that of *Auricularia auricula-*

judae DyP.⁹ Their tertiary structure revealed a very different topology from the other (super)families mentioned above. Nevertheless, the DyP active site presents some similarities with class II peroxidases, such as a histidine residue as heme iron ligand,¹⁰ while a cysteine occupies this position in HTPs.² However, the second histidine at the opposite side of heme in classical peroxidases is not conserved in DyPs, which generally present an aspartic acid at this position.^{5,11} Moreover, contrarily to class-II peroxidases, DyPs are not exclusive of fungi, with types A–C corresponding to prokaryotic enzymes and fungal DyPs preferentially included in type D.¹²

Received: June 13, 2018

Revised: July 25, 2018

Published: July 31, 2018

Since the discovery of the first DyP, a number of other family members has been studied, as wild type or heterologously expressed enzymes.⁵ After *in vitro* activation of fungal DyPs expressed as inclusion bodies,¹³ *Pleurotus ostreatus* DyP4 (*PosDyP4*) and a few other fungal DyPs have been recently expressed in *E. coli* as active proteins.^{14,15} Prokaryotic DyPs are easier to be expressed in *E. coli* facilitating different mechanistics and related studies.^{16–19}

DyPs present a broad substrate specificity, being able to oxidize substituted phenols, azo dyes, and even lignin model compounds, among other substrates, although nonphenolic aromatics with very low activity (see Linde et al.⁵ and Loncar et al.,²⁰ and references herein). Nevertheless, anthraquinonoid dyes, used in first DyP descriptions,⁷ appear as their best substrates. Additionally, the ability to oxidize Mn^{2+} to Mn^{3+} has been reported in DyPs from *Amycolatopsis* sp. 75iv2 (*AspDyP2*),²¹ *P. ostreatus* (*PosDyP4*),¹⁵ and very recently from *Irpex lacteus*,²² as well as, with much lower activity levels, in a few other bacterial^{21,23–26} and one more fungal²⁷ DyP. Interestingly, *PosDyP4* oxidizes Mn^{2+} with similar efficiency to the fungal ligninolytic manganese peroxidases (*MnP*) and versatile peroxidases (*VP*).¹⁵

Despite the variety of substrates reported, the eco-physiological role of DyPs still remains unclear. Their ability to oxidize lignin related compounds, together with their higher abundance in white-rot (ligninolytic) fungi compared with other basidiomycetes,⁵ and their widespread presence in forest soil fungal transcriptomes,²⁸ support a contribution to degradation of lignin and lignin-derived compounds. Furthermore, *PosDyP4* is one of the most abundant enzymes when *P. ostreatus* grows on lignocellulosic biomass.¹⁵ In the above context, DyPs have been described as bacterial “lignin peroxidases”,²⁹ although they preferentially act on phenolic technical lignins and lignin-derived substrates.^{5,30–32}

In the present study, we identified and characterize the DyP Mn^{2+} -oxidation site thanks to a combination of different techniques (such as X-ray diffraction, computational calculations, electron paramagnetic resonance, and directed mutagenesis). Interestingly, the site was determined to be different than the canonical Mn^{2+} -oxidation one found in class-II peroxidases because of its superficial location and involvement of a long-range electron pathway to heme.

MATERIAL AND METHODS

DyP Production in *E. coli*. The *PosDyP4* coding sequence (ref. no. 1069077 from the *P. ostreatus* genome at JGI, https://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2) was cloned in the pET15b vector carrying a N-terminal His-tag sequence (Novagen, Darmstadt, Germany), and the resulting plasmid (pET15b-1069077) was used for expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen).¹⁵ Cultures were grown for 60 h at 16 °C in ZYM-5052 autoinducing medium³³ in the presence of 100 μ M hemin. Cells were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min at 4 °C and suspended in 100 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 10 mM imidazole, and 300 mM NaCl) supplemented with 2 mg·mL⁻¹ lysozyme (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After 1 h, the suspension was sonicated, debris was removed by centrifugation at 20 000 rpm for 4 h, and the supernatant was concentrated (Amicon 10-kDa-cutoff; Millipore, Darmstadt, Germany).

The wild-type recombinant (hereinafter native) DyP and the mutated variants were purified in one single step using a 5 mL

HisTag column, at a flow rate of 5 mL·min⁻¹ of the above buffer in an ÄKTA HPLC system (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Sweden). After 15 mL, the retained proteins were eluted with a 0–50% gradient of 1 M imidazole in 50 mL, followed by 50–100% gradient in 5 mL and 100% NaCl in 15 mL. Peroxidase activity was followed by 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) oxidation, as described below. The appropriate fractions were pooled, concentrated, and dialyzed against 10 mM sodium tartrate (pH 5).

Purification was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 12% gels stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich) (Figure S1), although some minor contaminating proteins were observed for some of the variants (due to the single-step purification procedure). The UV-visible spectra of native *PosDyP4* and its Mn^{2+} -oxidation site variants (Figure S2) confirmed the incorporation of heme, with a characteristic Soret band at 406–407 nm. The above agrees with (i) Reinheitszahl (R_z , $A_{\text{Soret-band}}/A_{280\text{ nm}}$) ratios of 1.4–1.8 (except for the E345A/D352A/D354A variant with a 1.1 ratio); and (ii) molar heme content, estimated by the pyridine ferrohemochrome method,¹⁷ of 0.9 for *PosDyP4* and slightly lower (0.7–0.9) for the variants, due to minor contaminating proteins.

Crystal Structures. Crystallization trials were carried out by the sitting drop vapor diffusion technique, in 96-well MRC2 plates (Swissci MRC, Molecular Dimensions, Suffolk, England) using a Cartesian Honeybee System (Genomic Solutions, Irvine, U.S.A.) and the commercial screenings from Emerald (Wizard Screens I, II and III) and Jena Biosciences (JBScreen Classic Kits 1–10). Different $MnCl_2$ concentrations were included in the crystallization trials. Drops consisted of 0.2 μ L of protein solution (10 mg/mL in 10 mM sodium tartrate, pH 5.0) and 0.2 μ L of precipitant and were equilibrated against a 50 μ L reservoir solution, at 295 K. Crystals suitable for X-ray data collection were obtained in 0.2 M 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 5.75, containing 25% polyethylene glycol (PEG) MME 2000. Furthermore, crystal soaking in $MnCl_2$ solutions was attempted to solve enzyme: Mn^{2+} structures.

Crystals were mounted in nylon loops and flash-frozen in liquid nitrogen in the mother liquor using Paratone-N (Hampton Research, Aliso Viejo, U.S.A.) as cryoprotectant. All diffraction data were collected at 100 K on beamline ID30B at the ESRF (Grenoble, France) using a wavelength of 0.9762 Å and a Pilatus 6 M detector. Diffraction data were indexed and integrated using XDS,³⁴ and scaled and merged using Aimless from CCP4 program suite.³⁵

The structure was solved by molecular replacement using the crystal structure of *B. adusta* DyP (PDB: 3afv) as the search model and the program MOLREP in CCP4 suite.³⁵ The final model was obtained by consecutive rounds of refinement with RefMac, in CCP4 suite,³⁵ and alternating manual model building with Coot³⁶ using σ_A weighted $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps. Solvent molecules and MES were added automatically and visually inspected for chemically plausible positions. A total of 5% of reflections was used to calculate the R_{free} value throughout the refinement process. The structures were validated with MolProbity.³⁷

X-ray data collection and refinement statistics are summarized in Table S1. The refined model consists of a partial polypeptide chain of 484 amino acids (residues 6–489),

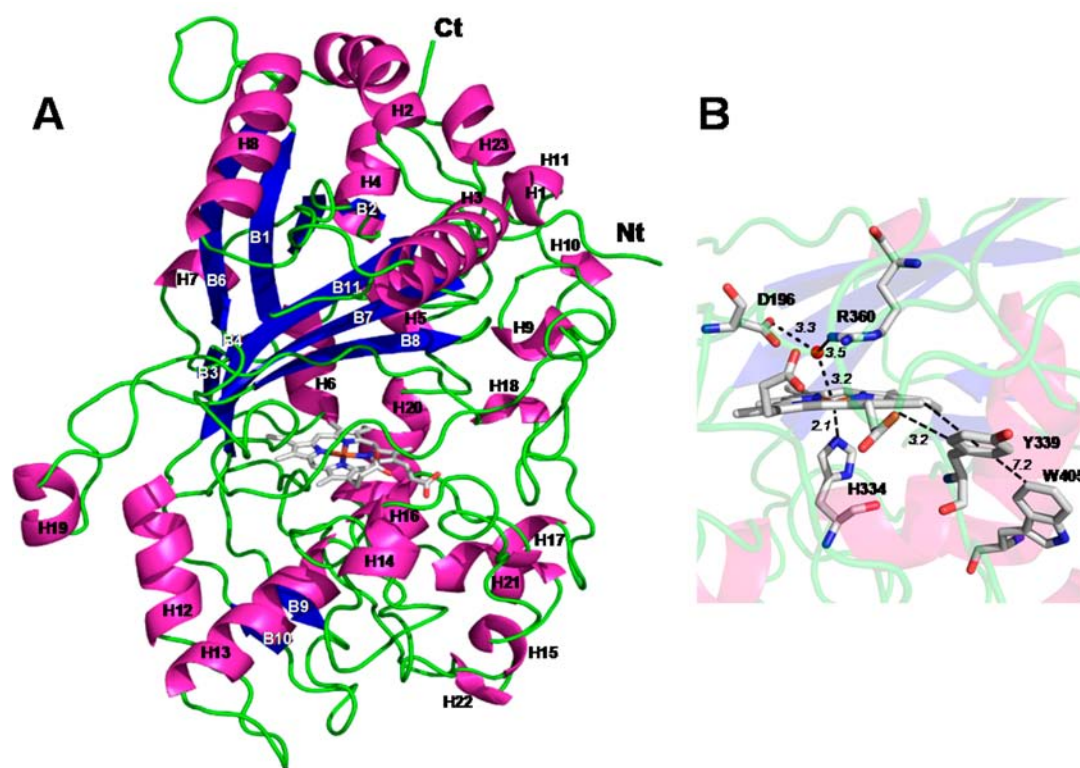


Figure 1. *PosDyP4* crystal structure. (A) Ribbon representation of the overall fold with α -helices in magenta (H1 to H28), β -strands in blue forming two β -sheets (B1–B6 and B7, B8 and B11), random coil in green, C and N termini of the solved structure (Ct and Nt) included, and the heme cofactor as CPK-colored sticks (PDB: 6fsk). (B) Detail of the heme pocket with His334, Asp196, Arg360, and water134 (at the sixth coordination position of heme iron), and Trp405 and Tyr339 at 7.2 and 3.2 Å from the heme cofactor, respectively, as CPK-colored sticks.

in which the first five and the last 15 residues were not visible in the electron density maps, one heme group, one MES, and 1119 water molecules. Figures were produced with PyMOL (Schrödinger, Portland, OR, U.S.A.). The coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank with accession code 6fsk.

Molecular Simulations. The solved crystal structure (6fsk, chain A) was used for *PosDyP4* molecular simulations. The system was prepared at pH 4.5 (optimal activity) with the protein preparation wizard from Schrödinger, resulting in aspartic acids 32 and 241 being protonated; histidines 49, 138, 148, 168, 191, and 220 being protonated in their $N\epsilon$; and histidines 380 and 299 being double protonated (positively charged). Crystallographic water molecules were retained because of their (potential) importance in Mn^{2+} coordination.

For substrate diffusion molecular mechanics (MM) simulations with PELE, heme charges were obtained from a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) minimization using QSite,³⁸ at the DFT M06-L(lacvp*)/OPLS level of theory. Based on previous experience in manganese heme-bound systems,³⁹ the charge of the Mn^{2+} ion was set to 1.2. The ion was then placed on five different initial positions, all of them in the bulk solvent at distances >25 Å from the heme iron. The new adaptive-PELE software⁴⁰ was used to study Mn^{2+} diffusion and binding. The adaptive protocol improves sampling in PELE by running multiple short simulations (epochs) where the initial conditions in each of them are selected through a reward function aiming at sampling nonvisited areas. In particular, three simulations of 256 processors with 20 epochs, of 12 PELE steps each, were used. We should remark that along all simulations, the ligand

moves freely, without any predetermined bias. Interaction energies, in kcal/mol, were derived as $E_{ab} - (E_a + E_b)$ where E_{ab} is the total energy of the complex, E_a the energy of the “receptor” (protein + crystallographic waters), and E_b the energy of the Mn^{2+} ion; all of them obtained at the OPLS2005 level of theory with a surface GB implicit solvent model.

Oxidation QM/MM simulations were performed also with Qsite.³⁸ The QM region included: the heme (compound I, i.e. $Fe^{4+}=O$ and porphyrin cation radical complex), Trp405, Mn^{2+} ion, residues 215, 334 to 345, and 352 to 357, and two water molecules coordinated to the metal ion, for a total of 502 QM atoms. They were modeled at the DFT M06-L(lacvp*) level of theory, the remainder of the system being described with the OPLS-AA force field. To facilitate convergence of compound-I’s electronic wave function, the triplet spin state was selected.⁴¹ For the QM/MM e-pathway calculations,⁴² monitoring the electron transfer route, the heme group, Mn^{2+} ion and its directly coordinated residues were subtracted from the QM region. Three iterations of the procedure were performed, where Trp405 and both Trp405 and Tyr339 were subtracted from the QM region in the second and third iterations, respectively.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Measurements. Continuous-wave EPR X-band (9.38/9.39 GHz) measurements were performed with a Bruker E500 EleXsys Series using the Bruker ER 4122SHQE cavity, equipped with an Oxford Instruments helium continuous flow cryostat (ESR900). Enzyme activation was carried out by adding H_2O_2 in a *PosDyP4*/peroxide molar ratio of 1:8, with a final concentration of 0.25 mM enzyme in tartrate buffer, pH 3. H_2O_2 was added directly in a 3.5 mm EPR tube, and the

reaction time before freezing was ~ 10 s. The g -values were calculated with a strong pitch sample as reference, and an error of ± 0.0002 was estimated.

Site-Directed Mutagenesis. The D196A, D215V, Y339A, E345A, D352A, D354A, and W405S simple mutations, and the D352A/D354A double and E345A/D352A/D354A triple mutations were introduced in the *PosDyP4* sequence by PCR using the expression plasmid pET15b-1069077 (see above) as template, and the QuikChange kit from Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.). The direct and reverse primers for PCR (Table S2) were synthesized. To obtain the triple variant, the plasmid harboring the D352A/D354A mutations was used as a template and combined with the primer E345A.

The PCR reaction (50 μ L volume) was carried out in an Eppendorf (Hamburg, Germany) Mastercycler pro-S thermal cycler using 20 ng of template DNA, 500 μ M each dNTP, 125 ng of direct and reverse primers, 2.5 units of *PfuTurbo* polymerase (Stratagene), and the manufacturer's buffer. Reaction conditions included: (i) a start cycle of 1 min at 95 $^{\circ}$ C; (ii) 18 cycles of 50 s at 95 $^{\circ}$ C, 50 s at 55 $^{\circ}$ C, and 10 min at 68 $^{\circ}$ C; and (iii) a final cycle of 10 min at 68 $^{\circ}$ C. The mutated genes were expressed in *E. coli*, and the variants were purified as described above for the wild gene and native DyP.

Enzyme Kinetics. The kinetic constants of *PosDyP4* and its variants were estimated from absorbance changes during substrate oxidation in 0.1 M tartrate (optimal pH values) at 25 $^{\circ}$ C in a Biomate5 spectrophotometer (Thermo Scientific). The reactions were initiated by addition of H_2O_2 to a concentration of 0.25 mM.

Oxidation of Mn^{2+} was followed at pH 4.5 by monitoring formation of Mn^{3+} -tartrate complex (ϵ_{238} 6.5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Reactive Blue 19 (RB19) and ABTS oxidation were assayed at pH 3.5 and monitored by RB19 disappearance (ϵ_{595} 10 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) and formation of ABTS cation radical (ϵ_{436} 29.3 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), respectively. Reactive Black 5 (RB5), 2,6-dimethoxyphenol (DMP) and veratryl alcohol (VA) oxidation were assayed at pH 3, and monitored by RB5 disappearance (ϵ_{598} 30 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), dimeric coeruleinone (ϵ_{469} 55 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) formation, and veratraldehyde (ϵ_{310} 9.3 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) formation, respectively.

Means and standard errors for Michaelis constant (K_m) and turnover (k_{cat}) values were obtained by nonlinear least-squares fitting to the Michaelis–Menten model. Fitting of these constants to the normalized equation $v = (k_{\text{cat}}/K_m)[S]/(1 + [S]/K_m)$ yielded the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) with their standard errors. Biphasic kinetics was observed for Mn^{2+} oxidation by some *PosDyP4* variants enabling calculation of two sets of kinetic constants, as found also for other DyPs.^{13,43}

RESULTS AND DISCUSSION

Solving the Crystal Structure of *PosDyP4*. We have solved the crystal structure of *PosDyP4* at 1.56 \AA resolution, after the heterologous expression in *E. coli*, as an active enzyme, of the sequence obtained from the *P. ostreatus* genome available at the DOE JGI.¹⁵ All attempts to solve the structure of native *PosDyP4* in complex with Mn^{2+} were unsuccessful (an electron-density map, corresponding to the Asp215, Tyr339, Glu345, Asp352, Asp354, and water31 region discussed below, is shown in Figure S3). *PosDyP4* shows the overall topology (Figure 1A) characteristic of the DyP family and other members of the CDE superfamily.^{5,6} Each of the two ferredoxin-like domains is formed by a four-stranded antiparallel β -sheet (strands B1–B6 and B7–B11 in the C-

terminal and N-terminal domains, respectively) and several helices (up to a total of 28, when short helical regions are included). Two additional β -strands (B9 and B10) are located at the bottom of the N-terminal domain, which also harbors the heme cofactor.

A structural search with the *PosDyP4* molecular structure at the DALI server⁴⁴ shows the highest fitting (Z value) and identity (id) with the reported crystal structures of: (i) the only two fungal DyPs whose structure had been reported, from *B. adusta* and *Auricularia auricula-judae* (Z: > 51, id: >43%); (ii) two structurally related DyPs from *Amycolatopsis* sp. and *Anabaena* sp. (Z: 39, id: 28–29%); and (iii–iv) two other groups of prokaryotic DyPs and CDE- proteins with 11 (Z: 26–28, id: 15–20%) and two (Z: 12, id: 7–9%) members (see Table 1 with PDB entries and additional details).

Table 1. Crystal Structures Related to *PosDyP4* from Search at the DALI Server⁴⁴ Including 2 Fungal Followed by 15 Prokaryotic Proteins^a

	PDB	\AA	Z	%
<i>Bjerkandera adusta</i>	3afv	1.4	54	48
<i>Auricularia auricula-judae</i>	4au9	2.1	51	43
<i>Amycolatopsis</i> sp.	4g2c	2.3	39	28
<i>Anabaena</i> sp.	5c2i	1.9	39	29
<i>Thermobifida fusca</i>	5fw4	1.8	28	20
<i>Shewanella oneidensis</i>	2iiz	2.3	28	17
<i>Escherichia coli</i>	3o72	2.0	28	20
<i>Thermomonospora curvata</i>	5jxu	1.8	28	18
<i>Streptomyces lividans</i>	5mjh	1.5	27	19
<i>Streptomyces coelicolor</i>	4gt2	1.8	27	19
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2gvk	1.6	27	16
<i>Enterobacter ligninolyticus</i>	5vj0	1.9	26	28
<i>Rhodococcus jostii</i>	3veg	2.4	27	15
<i>Thermobifida cellulolytica</i>	4gs1	1.7	26	19
<i>Vibrio cholera</i>	5de0	2.2	26	19
<i>Candidatus Nitrospira diffluvii</i>	3nn2	1.9	12	9
<i>Thermus thermophilus</i>	1vdh	2.0	12	7

^aSee Figure S4 for 3D models. PDB entries, resolution (\AA), Z value and identity with *PosDyP4* (%) are provided.

Although the sequence identity is low, around 50% among fungal members and below 30% between the fungal and prokaryotic members, there are noteworthy similarities in the tertiary structure of the above DyPs and related CDE proteins (Figure S4). A peculiarity of the *P. ostreatus*, *Amycolatopsis* sp. and *Anabaena* sp. DyPs is a prominent helix-8 (red asterisks in Figure S4).^{12,21} Interestingly, it has been proposed to include these two prokaryotic proteins in a new DyP type together with the fungal DyPs.⁴⁵ *AspDyP2* and *PosDyP4* also share its ability to efficiently oxidize Mn^{2+} , as described below.

In contrast with class-II peroxidases, which have a main heme access channel (in front of the heme δ -meso carbon) and eventually a small second channel in front of one of the heme propionates (Mn^{2+} channel),¹⁰ *PosDyP4* only has a narrow access channel connecting the solvent with the upper side of the heme pocket (Figure S5) and lacks a channel at the vicinity of the heme propionates. This led to the exposed Mn^{2+} -oxidation site described here.

The heme pocket region in *PosDyP4* (Figure 1B) shows several conserved residues including His334, which appears as a ligand of the heme iron, and Asp196 occupying a mirror position at the opposite side of the cofactor together with

neighboring Arg360, and Trp405 and Tyr339 mentioned below at ~ 7 and ~ 3 Å from the heme, respectively. Asp196 and Trp405 are homologous to residues involved in catalysis by other fungal DyPs.⁵ To confirm their role in *PosDyP4*, they were substituted by alanine and serine, respectively, and the activities (on ABTS, DMP, Mn^{2+} , RBS, RB19 and VA) were analyzed on different substrates (data not shown in tables). Asp196, located over the heme plane, is essential in *PosDyP4*, since no activity was detected in the D196A variant. This is in agreement with a role in the heterolytic cleavage of H_2O_2 to form compound I, as reported in other fungal^{5,11} and some bacterial DyPs.²⁷

Mutation of the solvent-exposed Trp405 (W405S variant) suppressed VA oxidation and decreased the activity toward all other substrates with the only exception of Mn^{2+} , whose oxidation was unaffected. This tryptophan would be homologous to *AauDyP* Trp377 involved in oxidation of high redox-potential substrates, such as VA, by formation of a solvent-exposed aromatic radical, followed by long-range electron transfer from the substrate to the heme.⁴³ Formation of a similar catalytically active tryptophanyl radical has been recently demonstrated also for *Thermomonospora curvata* DyP,¹⁸ while reactive tyrosyl radicals have been reported in other prokaryotic DyPs.⁴⁶ Interestingly, the Trp405 radical was detected by EPR (see below) after peroxide activation of *PosDyP4*, and the W405S variant was used in EPR experiments, as described below.

Diffusion Simulations Revealing an Unusual Mn^{2+} Binding Site. Attempts to obtain the crystal structure of a *PosDyP4*: Mn^{2+} complex failed. Therefore, to identify the Mn^{2+} -oxidation site, a free (nonbiased) exploration of Mn^{2+} diffusion with adaptive PELE⁴⁰ was performed by mapping the entire enzyme surface. Figure 2 shows the protein–ligand interaction energy profile against the distance from the Mn^{2+} ion to the Asp354 mentioned below.

While the ion finds multiple small cavities (local minima) in various sites of the surface, all simulations indicated a highly acidic area (Figure 3) where Mn^{2+} binds preferentially coordinated by the Glu345, Asp352 and Asp354 carboxyl groups at ~ 2 Å distance (Figure 4). These three acidic

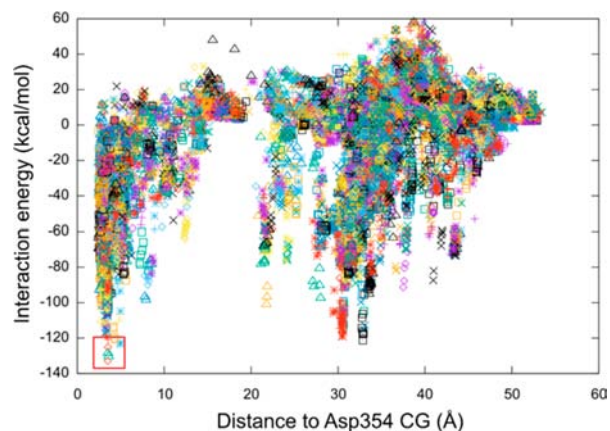


Figure 2. Results of Mn^{2+} diffusion with adaptive-PELE. The protein–ligand interaction energy is shown against the distance to the side-chain carboxyl CG atom in Asp354. Each color (symbol) corresponds to a different trajectory. The best energy positions were located near Asp354 (red box), and one of them is shown in Figures 3 and 4

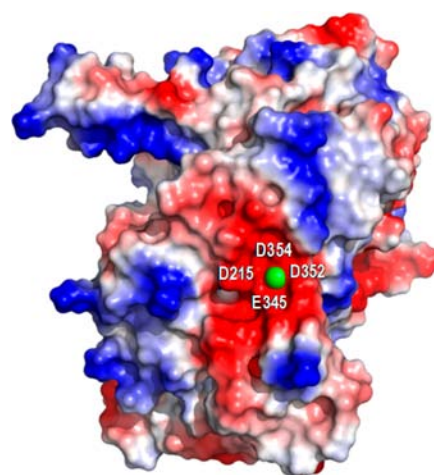


Figure 3. Solvent access surface of *PosDyP4*, colored by electrostatic potential (blue, positive; and red, negative) showing the highly acidic region (with Asp215, Glu345, Asp352, and Asp354) surrounding the Mn^{2+} ion (green sphere) after its diffusion by PELE (on PDB: 6f5k).

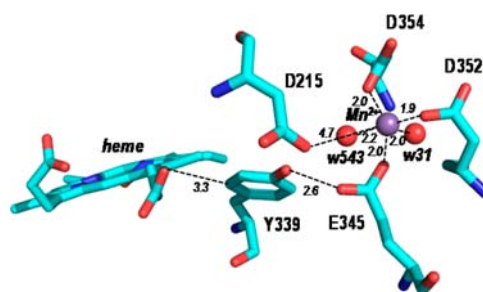


Figure 4. Four acidic residues and two water molecules (red spheres) involved in the coordination of Mn^{2+} (purple sphere) by *PosDyP4* and Tyr339 located between the Mn^{2+} -binding site and the heme cofactor (residues and heme as CPK-colored sticks), in one snapshot from the best ligand-binding region in PELE simulations (red square in Figure 3). Some distances are indicated in Å.

residues, along with Asp215 (at a longer distance from the Mn^{2+} ion) and two water molecules, form an octahedral coordination environment. Tyr339, another residue involved in *PosDyP4* oxidation of Mn^{2+} , as shown by site-directed mutagenesis, is far from the metal ion (4.9 Å) but at 2.6 Å from Glu345 (Figure 4) bridging the Mn^{2+} -binding site with the heme cofactor. Comparison between the lowest interaction energy structure and the (apo) crystal structure without Mn^{2+} reveals some side-chain rearrangement in several amino acids during binding of the metal ion (Figure S6).

Electron Transfer Route Mapped by QM/MM Simulations. Figure 5A shows the total spin density obtained in QM/MM modeling of the Mn^{2+} oxidation process, with over 500 atoms being included in the quantum calculations. As in previous models of cytochromes's compound I,⁴¹ we observe two unpaired electrons in the iron-oxo moiety, localized in the d_{xz}/d_{yz} and p_x/p_y orbitals, respectively. More relevant is the nature of the third unpaired electron, largely localized in the Mn^{2+} d orbitals. This indicates that compound I is capable of extracting one electron from the Mn^{2+} ion. In addition, we observe a minor component on Trp405, supporting the role of this residue as a catalytic radical, as shown by EPR and directed mutagenesis.

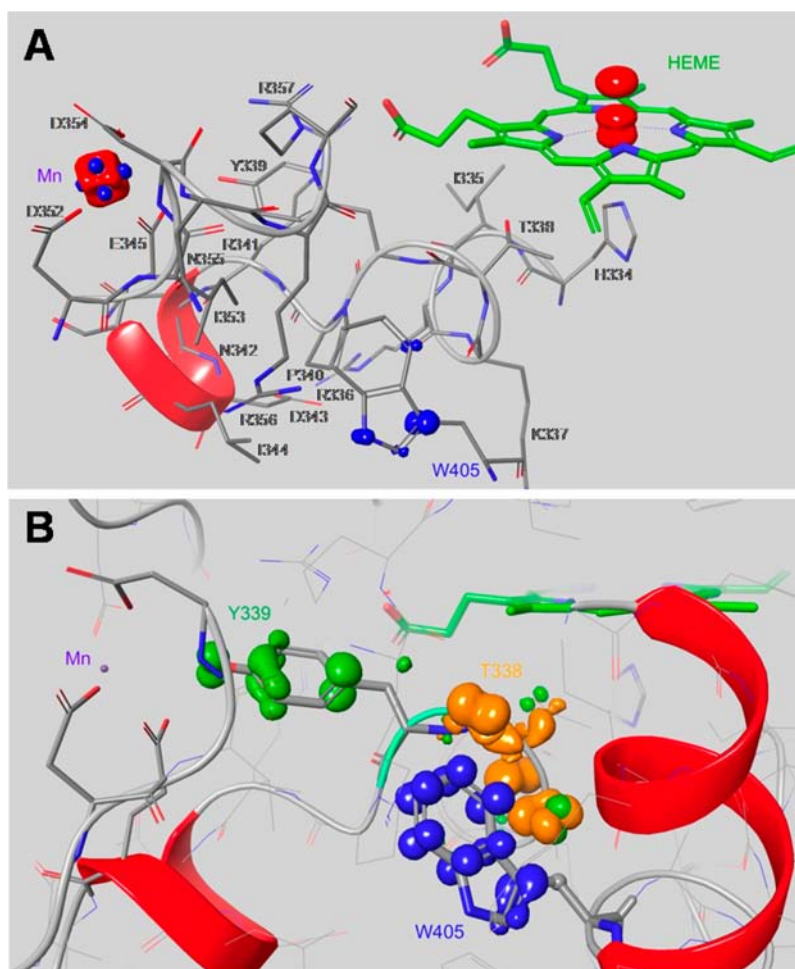


Figure 5. QM/MM simulations of Mn^{2+} oxidation and electron transfer to heme. (A) Spin density in the QM/MM calculations for Mn^{2+} oxidation in the triplet state. Residues in the QM region are shown in thin sticks, together with a backbone trace in a cartoon style. The heme is shown in green and a thicker stick format. (B) Electron transfer route from the QM/MM e-pathway analysis. The spin densities of the first three iterations are shown (in order): Trp405 (blue), Tyr339 (green), and Thr338 (orange). These three regions and the environment of the donor (Mn^{2+}) and acceptor (heme) are shown in sticks; the remainder of the system is in wire style. The enzyme backbone is shown in a cartoon style.

Figure 5B shows the results of applying the QM/MM e-pathway procedure, where we aim at mapping the electron transfer pathway. In this type of simulation, we do not include the donor and acceptor (heme and Mn^{2+}) in the QM region, focusing instead in the transfer region.⁴² The results show the first three iterations of the procedure: Trp405 in blue, Tyr339 in green, and Thr338 in orange. Thus, the analysis indicates that the Mn^{2+} oxidation and the above-mentioned Trp405 electron transfer pathways might converge in the backbone of Thr338, which is located next to the axial histidine. A close look at the carbonyl backbone of this threonine indicates a large hydrophobic environment, raising the energy levels of its π orbitals and facilitating the electron transport.

Protein Radical Formation As Shown by EPR. In the EPR spectrum of the native *PosDyP4* resting state, the heme Fe^{3+} is in a rhombically distorted high spin state with an almost undetectable amount of low spin state (Figure S7, black line). After the addition of H_2O_2 (Figure S7, red line), the Fe^{3+} signal decreased and the appearance of a radical species was observed, a close up of which is shown in Figure 6A. The line shape and the g value equal to 2.0041 are similar to that reported for the H_2O_2 -activated *AauDyP*, which was assigned to a tryptophanyl radical in combination with other minor radical species.^{43,47}

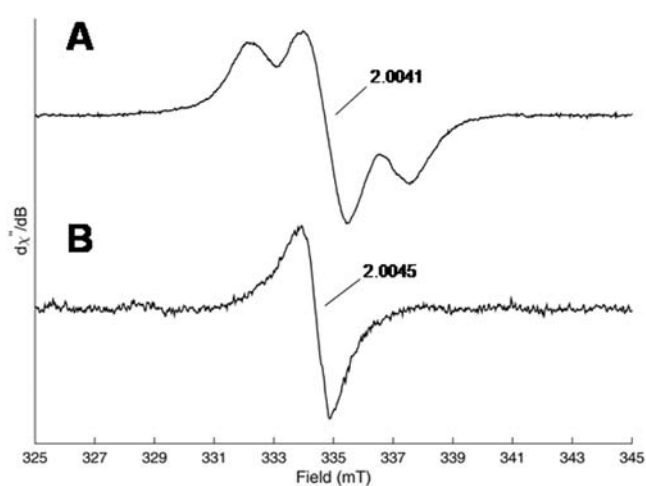


Figure 6. Twenty mT scan width X-band EPR spectra of 0.25 mM native *PosDyP4* (A) and W405S variant (B) in tartrate buffer, pH 3, after the addition of 8 equiv of H_2O_2 . Conditions were 5 mW microwave power, 0.2 mT modulation amplitude, and $\nu = 9.39$ (A) or 9.38 (B) GHz. The EPR spectra are normalized (see Figures S7 and S8 for entire spectrum, before and after H_2O_2 addition, and for comparison of non-normalized signals, respectively).

Table 2. Steady-State Kinetic Parameters, Including K_m (μM), k_{cat} (s^{-1}), and K_m/k_{cat} ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$), for Oxidation of Mn^{2+} by *PosDyP4* and Seven Variants Mutated at the Mn^{2+} -Oxidation Site (with Two Sets of Constants in Three of Them, Characterized by Higher and Lower Affinity for Mn^{2+})^a

		DyP4	Y339A	D215A	E345A	D352A	D354A	D352A/D354A	E345A/D352A/ D354A
Mn^{2+} higher affinity	K_m	290 ± 30	-	4400 ± 1000	630 ± 90	350 ± 120	260 ± 10	300 ± 40	1400 ± 160
	k_{cat}	56 ± 2	0	28 ± 2	1 ± 0	13 ± 2	10 ± 0	25 ± 1	11 ± 0
	k_{cat}/K_m	200 ± 20	0	6 ± 0	2 ± 0	36 ± 0	39 ± 1	85 ± 5	8 ± 0
Mn^{2+} lower affinity	K_m	-	-	-	-	3500 ± 900	4300 ± 700	2300 ± 700	-
	k_{cat}	0	0	0	0	40 ± 3	39 ± 2	73 ± 5	0
	k_{cat}/K_m	0	0	0	0	11 ± 1	9 ± 1	32 ± 4	0

^aMeans and 95% confidence limits from reactions at 25 °C in 0.1 M tartrate, pH 4.5.

Radicals immobilized in proteins are mainly represented by tryptophanyl and/or tyrosyl radicals, whose identification and assignment might lead to ambiguities. In both cases, the dominant splitting in the EPR spectrum arises from distinct hyperfine couplings of the β -methylene protons β_1 and β_2 at C_β , attached to C3 or C1 of the tryptophan or tyrosine ring, respectively.⁴⁷ The hyperfine coupling constants of these two β protons govern the EPR spectrum and depend on the side-chain orientation measured as the dihedral angle (ϑ) for each of the β protons according to the Heller-McConnell relation.⁴⁷ When the dihedral angles are equivalent, the side chain is either in the tryptophan ring plane or perpendicular to it. In the first case, the dihedral angle for both β protons is $\approx 30^\circ$ and in the latter case $\approx 60^\circ$.

The crystallographic dihedral angles for the β protons of Trp405 (PDB: 6fsk) are $\vartheta_1 \approx 123.5^\circ$ for H- β_1 and $\vartheta_2 \approx 135.5^\circ$ for H- β_2 . These values correspond to almost equivalent isotropic coupling constants (2.18 mT for H- β_1 and 1.72 mT for H- β_2 , calculated from the Heller–McConnell relation) and are in agreement with the $A_{\text{iso}} = 1.92$ mT value determined from the experimental spectrum where the tryptophanyl radical represents the main contribution. For *AauDyP* the crystallographic dihedral angles for the β protons are $\vartheta_1 \approx 130^\circ$ for H- β_1 and $\vartheta_2 \approx 140^\circ$ for H- β_2 revealing approximately the same orientation for both the catalytically active Trp405 and Trp377 in *PosDyP4* and *AauDyP*, respectively.^{43,47}

The EPR spectrum of the W405S variant, which was shown to be inactive on all the substrates assayed except on Mn^{2+} , also shows a high-spin Fe^{3+} . After the addition of H_2O_2 , a low intensity signal of a protein radical species is observed, lacking the tryptophanyl radical component observed in the native *PosDyP4* spectrum (Figures 6B and S8). The nonstructured signal has a line width around 1 mT, and its g value (2.0045) suggests a tyrosyl radical, similar to those detected in the H_2O_2 -activated form of several peroxidases.^{43,47,48}

The *PosDyP4* crystal structure shows Tyr339, and several phenylalanine residues, in close proximity to Trp405. Therefore, the mixed protein radical in the EPR spectrum of activated *PosDyP4* includes components of both Trp405 (its main contribution being also confirmed by the spectrum of the W405S variant lacking the tryptophanyl component) and Tyr339 radicals. Then, the tyrosyl signal observed in the EPR spectrum of the W405S variant most probably corresponds to Tyr339, whose radical signal is affected by the neighboring phenylalanine residues.

These EPR results substantiate the QM/MM calculations that: (i) identified Trp405 as the residue with the highest tendency to form a radical (highest spin density) at the heme neighborhood (Figure 5A); and (ii) predicted that this

tendency would pass to Tyr339 in the W405S variant, as shown when excluding Trp405 from the QM region (Figure 5B).

Functionality of the Mn^{2+} -Oxidation Site Confirmed by Mutagenesis. According to the computational predictions, four acidic amino acids (Asp215, Glu345, Asp352, and Asp354) could be involved in the binding of Mn^{2+} , with Tyr339 also located at the cation vicinity (Figure 4). To confirm the role of the above residues, we replaced them for alanines and seven mutated variants, carrying from 1 to 3 mutations, were characterized.

As shown in Table 2, all the variants exhibited a reduced Mn^{2+} oxidation activity, while their activity on ABTS (which initially was only slightly lower than the one found on Mn^{2+}) remained basically unchanged (Table S3). This confirms the specific role of these residues in Mn^{2+} binding and oxidation. Tyr339 appears as the most important residue because no Mn^{2+} oxidation was observed for the Y339A variant. Glu345 seems to be also a key residue because its E345A variant exhibited a 50-fold decrease in the k_{cat} and a 2-fold increase in the K_m , resulting in an overall 100-fold lower catalytic efficiency (Table 2 and Figure 7). In contrast, substitution of Asp215, Asp352, or Asp354 had a lesser effect in terms of

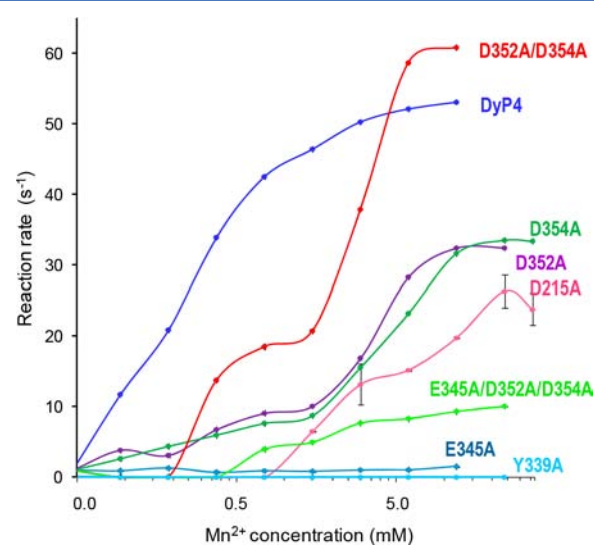


Figure 7. Kinetics of Mn^{2+} oxidation by *PosDyP4* and seven simple, double and triple variants (substrate concentration in a logarithmic scale). Biphasic kinetics are evident for several variants, such as D352A/D354A, compared with native *DyP4* (see Table 2). Means and 95% confidence limits.

$\text{Mn}^{2+} k_{\text{cat}}$, which was less than 2-fold reduced, most probably due to suboptimal positioning of the substrate ion.

Nevertheless, changing the latter three residues impaired the Mn^{2+} affinity, resulting in an increase of the K_m value from 9- to 15-fold. Interestingly, the Asp352 and Asp354 substitutions, individually or together, resulted in a biphasic kinetics, as shown in Figure 7 (see Figure S9 for representation using a nonlogarithmic scale). These results enabled calculation of two sets of kinetic constants, as described previously,^{13,43} characterized by their higher and lower affinities for Mn^{2+} (which would correspond to different binding sites or geometries) (Table 2). The combination of mutations (D352A/D354A or E345A/D352A/D354A) strongly impaired the enzyme activity, but no Mn^{2+} oxidation was only found for the Y339A variant.

New Mn^{2+} -Oxidation Site in DyPs. The well characterized Mn^{2+} oxidation site in fungal MnPs and VPs comprises three acid residues (Glu35, Glu39, and Asp179 in *Phanerochaete chrysosporium* MnP, PDB: 1mnp; and Glu36, Glu40 and Asp175 in *Pleurotus eryngii* VP, PDB: 2boq) and one heme propionate.^{10,49} This site includes a narrow access channel toward the heme propionate (or manganese channel), different from the wider heme access channel that provides access to H_2O_2 and some reducing substrates to the heme edge.¹⁰ In the above channel, the Mn^{2+} ion is located at ~ 2 Å from the heme propionate, allowing direct electron transfer. However, in PosDyP4, the Mn^{2+} binding site is located at the protein surface further from the heme (~ 11 Å), and an electron transfer pathway is required. This pathway involves Tyr339, as predicted by the QM/MM calculations and confirmed by the mutagenesis experimental results described above.

Up to this study, two Mn^{2+} -binding sites have been reported in DyPs from *Rhodococcus jostii* RHA1,²⁶ and its N246A variant with improved Mn^{2+} -oxidation activity,²³ and from *Amycolatopsis* sp. 75iv2.²¹ Although crystallographic evidence was provided in these cases, including Mn-anomalous map of the *R. jostii* variant, no experimental confirmation on their involvement in the Mn^{2+} oxidation reaction has been reported. Even though the location of the manganese-binding site in *R. jostii* DyPB is reminiscent (but at 4 Å distance from heme) of the one described for class II peroxidases, metal coordination is limited to only water molecules (PDB: 4hov) hindering its fixation and electron transfer. In contrast, the Mn^{2+} -binding site in the *Amycolatopsis* sp. DyP2, which has much better Mn-oxidation activity than *R. jostii* DyP,²¹ is analogous to the one characterized here in PosDyP4, appearing as mirror images when the heme cofactors are superimposed (Figure 8). In both cases, the manganese is located at the protein surface (Figure S10), far from the heme group, and a direct oxidation is not possible. However, this limitation is solved by transferring the electron via an intermediate tyrosine residue, as demonstrated here for PosDyP4. Interestingly, the more distant residue in the PosDyP4 Mn^{2+} -binding site (Asp215) is equivalent to AspDyP2 Glu273, which was reported by Brown et al.²¹ to occupy a second position in the coordination sphere of the Mn^{2+} ion. The latter authors also reported that the four amino acids involved in Mn^{2+} oxidation (one tyrosine and three acidic residues) are conserved in a few other DyP-type prokaryotic sequences, in addition to AspDyP4.²¹

CONCLUSIONS

As illustrated in the scheme of Figure 9 (upper arrow), we demonstrate for the first time (using directed mutagenesis)

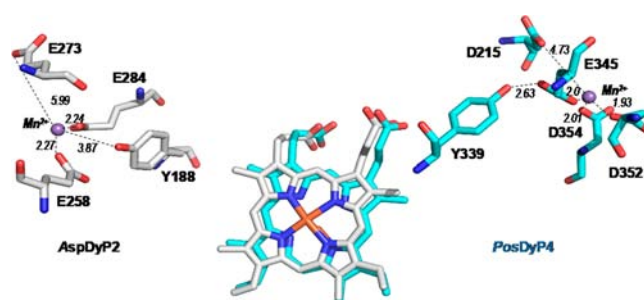


Figure 8. Superposition of the heme cofactors showing the mirror position of the Mn^{2+} oxidation sites in the DyPs of *P. ostreatus* (after ligand diffusion with PELE on PDB: 6fsk) and *Amycolatopsis* sp. (as found in PDB: 4g2c). Residues are shown as CPK-colored sticks with blue and white carbons, respectively, and Mn^{2+} ions as spheres. Residue numbering in AspDyP2 is based on Brown et al.²¹ Some distances are indicated in angstroms.

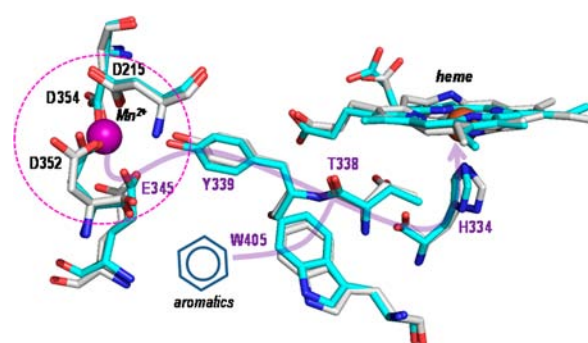


Figure 9. Proposed long-range electron transfer pathways (thick arrows) to the PosDyP4 heme for the oxidation of Mn^{2+} at the new site described (dashed circle) and oxidation of aromatics at the catalytic Trp405. Displacement of several side chains during Mn^{2+} binding are shown by superposition of the molecular structures before (CPK colored) and after (cyan colored) PELE simulations.

that oxidation of Mn^{2+} by a fungal DyP, from *P. ostreatus*, and probably also by some prokaryotic DyPs, such as that from *Amycolatopsis* sp. 75iv2, is produced at the protein surface (>11 Å from the heme) implying a long-range electron transfer pathway. Four acidic residues (and two water molecules) coordinate the metal ion at this position. One of these residues (Glu345) would receive the electron from Mn^{2+} transferring it to a neighbor tyrosine (Tyr339), which is absolutely necessary for the oxidation reaction to take place. Among fungal ligninolytic peroxidases, the involvement of a tyrosine residue in electron transfer from reducing substrate to heme has been reported only for the lignin peroxidase of *Trametes cervina*.⁴⁸ In contrast, tyrosine involvement in electron transfer for Mn^{2+} -oxidation, as suggested for the first time by Brown et al.²¹ in AspDyP2, seems to be produced in distant DyPs of both eukaryotic and prokaryotic origins.

QM/MM calculations predicted the involvement of Tyr339 in the electron transfer from Mn^{2+} to the heme, as confirmed later by directed mutagenesis of PosDyP4. EPR spectra are consistent with the formation of a tyrosyl radical in the H_2O_2 -activated W405S variant oxidizing Mn^{2+} , which in the native enzyme overlapped with a tryptophanyl radical. The latter would correspond to the solvent-exposed Trp405 radical involved in oxidation of aromatic substrates. Its formation was also predicted by QM/MM and confirmed by the EPR spectrum of the W405S variant, where only the tyrosyl radical

component was observed. The abstracted electron must travel from the exposed Trp405 to the heme, the final part of the route being shared with the Mn²⁺-oxidation pathway described above (Figure 9, lower arrow).

The new Mn²⁺ oxidation site, whose operation is demonstrated, could contribute to microbial biodegradation of lignin, acting on its phenolic moiety via Mn³⁺ chelates, as well as in the subsequent transformation of lignin-derived products. The Mn³⁺ chelates could also act on the nonphenolic lignin by promoting the formation of reactive lipid radicals, as proposed for selective degradation of lignin by some white-rot fungi.⁵⁰ DyPs could have a relevant contribution to the above reactions, especially in the case of the bacterial DyPs oxidizing Mn²⁺, such as those from *Amycolatopsis* species, because no typical ligninolytic peroxidases have been described in prokaryotes, despite the likely bacterial contribution to degradation of lignin products and their incorporation to soil humus.⁵¹

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscatal.8b02306.

Crystallographic data (Table S1); PCR primers (Table S2); ABTS oxidation kinetic parameters (Table S3); SDS-PAGE of PosDyP4 (Figure S1); UV–visible spectra of PosDyP4 and seven variants (Figure S2); detail of the PosDyP4 crystal electron-density map (Figure S3); overall crystal structures of PosDyP4 and 11 related proteins (Figure S4); heme access channel in PosDyP4 (Figure S5); comparison of empty Mn²⁺ binding site in the PosDyP4 crystal structure and after ion binding simulation (Figure S6); EPR spectra before and after activation by H₂O₂ (Figure S7); Intensity comparison of PosDyP4 and W405S EPR signals (Figure S8); kinetics of Mn²⁺ oxidation in nonlogarithmic scale (Figure S9); and solvent access surface of *P. ostreatus* and *Amycolatopsis* sp. DyPs showing Mn²⁺ binding (Figure S10) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: ATMartinez@cib.csic.es.

ORCID

Angel T. Martínez: 0000-0002-1584-2863

Present Address

‡E.F.-F.: Technical University of Delft, 2600 AA, Delft, The Netherlands

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the H2020 BBI-JU (www.bbi-europe.eu) project EnzOx2 (BBI-PPP-2015-2-720297; www.enzox2.eu) and the FP7 project INDOX (KBBE-2013-7-613549; www.indoxproject.eu), together with the BIO2014-56388-R (NOESIS), BFU2016-77835-R, CTQ2016-79138-R, and (BIO2017-86559-R (GENOBIOREF) projects of the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, cofinanced by FEDER funds. The sequencing of *P. ostreatus* genome at JGI was supported by the DOE Office of Science,

under Contract No. DE-AC02-05CH11231. We thank the staff of the ID30B beamline at ESRF (Grenoble, France) for assistance. CSGI (Florence, Italy) FFABR 2017 (Legge 232/2016 Comma 295, and Legge di Bilancio 2017) and MIUR (Dipartimento di Eccellenza, 2018-2022) grants are acknowledged for financial support.

■ REFERENCES

- (1) Welinder, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 388–393.
- (2) Hofrichter, M.; Ullrich, R.; Pecyna, M. J.; Liers, C.; Lundell, T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 871–897.
- (3) Rahmanpour, R.; Bugg, T. D. Structure and reactivity of the dye-decolorizing peroxidase (DyP) family. In *Heme Peroxidases*; Raven, E. L., Dunford, H. B., Eds.; RSC: London, 2015; pp 334–357.
- (4) Sugano, Y. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1387–1403.
- (5) Linde, D.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Fernández-Fueyo, E.; Guallar, V.; Hammel, K. E.; Pogni, R.; Martínez, A. T. Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 66–74.
- (6) Goblirsch, B.; Kurker, R. C.; Streit, B. R.; Wilmot, C. M.; Dubois, J. L. Chlorite dismutases, DyPs, and EfeB: 3 microbial heme enzyme families comprise the CDE structural superfamily. *J. Mol. Biol.* **2011**, *408*, 379–398.
- (7) Kim, S. J.; Shoda, M. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1029–1035.
- (8) Yoshida, T.; Tsuge, H.; Konno, H.; Hisabori, T.; Sugano, Y. The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J.* **2011**, *278*, 2387–2394.
- (9) Strittmatter, E.; Liers, C.; Ullrich, R.; Wachter, S.; Hofrichter, M.; Plattner, D. A.; Piontek, K. First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: Substrate interaction sites and long-range electron transfer. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 4095–4102.
- (10) Ruiz-Dueñas, F. J.; Morales, M.; García, E.; Miki, Y.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 441–452.
- (11) Sugano, Y.; Muramatsu, R.; Ichiyangi, A.; Sato, T.; Shoda, M. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family. Asp171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36652–36658.
- (12) Singh, R.; Eltis, L. D. The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 56–65.
- (13) Linde, D.; Coscolín, C.; Liers, C.; Hofrichter, M.; Martínez, A. T.; Ruiz-Dueñas, F. J. Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. *Protein Expression Purif.* **2014**, *103*, 28–37.
- (14) Behrens, C. J.; Zelena, K.; Berger, R. G. Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye-decolorizing peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**, *179*, 1404–1417.
- (15) Fernández-Fueyo, E.; Linde, D.; Almendral, D.; López-Lucendo, M. F.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, A. T. Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 8927–8942.
- (16) Chen, C.; Shrestha, R.; Jia, K.; Gao, P. F.; Geisbrecht, B. V.; Bossmann, S. H.; Shi, J.; Li, P. Characterization of dye-decolorizing peroxidase (DyP) from *Thermomonospora curvata* reveals unique catalytic properties of A-type DyPs. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 23447–23463.
- (17) Mendes, S.; Brissos, V.; Gabriel, A.; Catarino, T.; Turner, D. L.; Todorovic, S.; Martins, L. O. An integrated view of redox and catalytic properties of B-type PpDyP from *Pseudomonas putida* MET94 and its distal variants. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 99–107.

- (18) Shrestha, R.; Chen, X.; Ramyar, K. X.; Hayati, Z.; Carlson, E. A.; Bossmann, S. H.; Song, L.; Geisbrecht, B. V.; Li, P. Identification of surface-exposed protein radicals and a substrate oxidation site in A-class dye-decolorizing peroxidase from *Thermomonospora curvata*. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 8036–8047.
- (19) Shrestha, R.; Huang, G.; Meekins, D. A.; Geisbrecht, B. V.; Li, P. Mechanistic insights into dye-decolorizing peroxidase revealed by solvent isotope and viscosity effects. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 6352–6364.
- (20) Loncar, N.; Colpa, D. I.; Fraaije, M. W. Exploring the biocatalytic potential of a DyP-type peroxidase by profiling the substrate acceptance of *Thermobifida fusca* DyP peroxidase. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7276–7281.
- (21) Brown, M. E.; Barros, T.; Chang, M. C. Y. Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 2074–2081.
- (22) Duan, Z.; Shen, R.; Liu, B.; Yao, M.; Jia, R. Comprehensive investigation of a dye-decolorizing peroxidase and a manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17, a lignin-degrading basidiomycete. *AMB Express* **2018**, *8*, 119.
- (23) Singh, R.; Grigg, J. C.; Qin, W.; Kadla, J. F.; Murphy, M. E. P.; Eltis, L. D. Improved manganese-oxidizing activity of DypB, a peroxidase from a lignolytic bacterium. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 700–706.
- (24) Santos, A.; Mendes, S.; Brissos, V.; Martins, L. O. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 2053–2065.
- (25) Rahmanpour, R.; Bugg, T. D. Characterisation of DyP-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 93–98.
- (26) Roberts, J. N.; Singh, R.; Grigg, J. C.; Murphy, M. E. P.; Bugg, T. D. H.; Eltis, L. D. Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5108–5119.
- (27) Kolwek, J.; Behrens, C.; Linke, D.; Krings, U.; Berger, R. G. Cell-free one-pot conversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by a unique dye-decolorizing peroxidase combined with a laccase from *Funalia trogii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *45*, 89–101.
- (28) Kellner, H.; Luis, P.; Pecyna, M. J.; Barbi, F.; Kapturska, D.; Krüger, D.; Zak, D. R.; Marmeisse, R.; Vandenbol, M.; Hofrichter, M. Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. *PLoS One* **2014**, *9*, e95557.
- (29) Ahmad, M.; Roberts, J. N.; Hardiman, E. M.; Singh, R.; Eltis, L. D.; Bugg, T. D. H. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5096–5107.
- (30) Martínez, A. T.; Camarero, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, M. J. Biological lignin degradation. In *Lignin Valorization: Emerging Approaches*; Beckham, G. T., Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 2018; pp 199–225.
- (31) Brissos, V.; Tavares, D.; Sousa, A. C.; Robalo, M. P.; Martins, L. O. Engineering a bacterial DyP-type peroxidase for enhanced oxidation of lignin-related phenolics at alkaline pH. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3454–3465.
- (32) Rahmanpour, R.; Rea, D.; Jamshidi, S.; Fueloep, V.; Bugg, T. D. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *594*, 54–60.
- (33) Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 207–234.
- (34) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.
- (35) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
- (36) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- (37) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.
- (38) QSite 4.5; Schrödinger, Inc.: Portland, OR, 2007.
- (39) Acebes, S.; Fernández-Fueyo, E.; Monza, E.; Lucas, F.; Almendral, D.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Lund, H.; Martínez, A. T.; Guallar, V. Rational enzyme engineering through biophysical and biochemical modeling. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1624–1629.
- (40) Lecina, D.; Gilabert, J. F.; Guallar, V. Adaptive simulations, towards interactive protein-ligand modeling. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8466.
- (41) Guallar, V.; Wallrapp, F. H. QM/MM methods: Looking inside heme proteins biochemistry. *Biophys. Chem.* **2010**, *149*, 1–11.
- (42) Guallar, V.; Wallrapp, F. Mapping protein electron transfer pathways with QM/MM methods. *J. R. Soc., Interface* **2008**, *5*, S233–S239.
- (43) Linde, D.; Pogni, R.; Cañellas, M.; Lucas, F.; Guallar, V.; Baratto, M. C.; Sinicropi, A.; Sáez-Jiménez, V.; Coscolín, C.; Romero, A.; Medrano, F. J.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, A. T. Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: A computational, spectroscopic and directed mutagenesis study. *Biochem. J.* **2015**, *466*, 253–262.
- (44) Holm, L.; Rosenstrom, P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W545–W549.
- (45) Yoshida, T.; Sugano, Y. A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 49–55.
- (46) Uchida, T.; Sasaki, M.; Tanaka, Y.; Ishimori, K. A dye-decolorizing peroxidase from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* **2015**, *54*, 6610–6621.
- (47) Baratto, M. C.; Sinicropi, A.; Linde, D.; Sáez-Jiménez, V.; Sorace, L.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, A. T.; Basosi, R.; Pogni, R. Redox-active sites in *Auricularia auricula-judae* dye-decolorizing peroxidase and several directed variants: A multifrequency EPR study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13583–13592.
- (48) Miki, Y.; Calviño, F. R.; Pogni, R.; Giansanti, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, M. J.; Basosi, R.; Romero, A.; Martínez, A. T. Crystallographic, kinetic, and spectroscopic study of the first ligninolytic peroxidase presenting a catalytic tyrosine. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 15525–15534.
- (49) Gold, M. H.; Youngs, H. L.; Gelpke, M. D. Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* **2000**, *37*, 559–586.
- (50) Fernández-Fueyo, E.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Ferreira, P.; Floudas, D.; Hibbett, D. S.; Canessa, P.; Larrondo, L.; James, T. Y.; Seelenfreund, D.; Lobos, S.; Polanco, R.; Tello, M.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Watanabe, T.; Ryu, J. S.; Kubicek, C. P.; Schmoll, M.; Gaskell, J.; Hammel, K. E.; St. John, F. J.; Vanden Wymelenberg, A.; Sabat, G.; Bondurant, S. S.; Syed, K.; Yadav, J.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V.; Lavín, J. L.; Oguiza, J. A.; Perez, G.; Pisabarro, A. G.; Ramírez, L.; Santoyo, F.; Master, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; Lombard, V.; Magnuson, J. K.; Kües, U.; Hori, C.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Held, B. W.; Barry, K.; LaButti, K.; Lapidus, A.; Lindquist, E.; Lucas, S.; Riley, R.; Salamov, A.; Hoffmeister, D.; Schwenk, D.; Hadar, Y.; Yarden, O.; de Vries, R. P.; Wiebenga, A.; Stenlid, J.; Eastwood, D. C.; Grigoriev, I. V.; Berka, R.; Blanchette, R. A.; Kersten, P.; Martínez, A. T.; Vicuña, R.; Cullen, D. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 5458–5463.
- (51) de Gonzalo, G.; Colpa, D. I.; Habib, M. H. M.; Fraaije, M. W. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J. Biotechnol.* **2016**, *236*, 110–119.

OTRAS PUBLICACIONES



The structure of VgrG1 from *Pseudomonas aeruginosa*, the needle tip of the bacterial type VI secretion system

Mercedes Spínola-Amilibia,* Irene Davó-Siguero, Federico M. Ruiz, Elena Santillana, Francisco Javier Medrano and Antonio Romero*

Received 11 September 2015

Accepted 6 November 2015

Edited by Z. S. Derewenda, University of Virginia, USA

Keywords: VgrG1; T6SS; secretion; virulence; effectors; toxins; infection; *P. aeruginosa*; structure; X-ray crystallography.

PDB reference: VgrG1, 4uhv

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

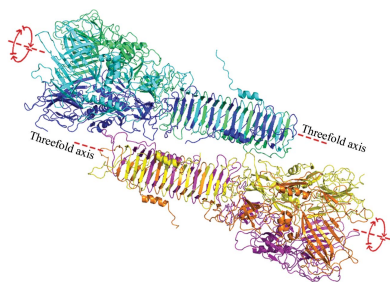
Departamento de Biología Físico-Química, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, Calle de Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. *Correspondence e-mail: mspinola@cib.csic.es, romero@cib.csic.es

The type VI secretion system (T6SS) is a mechanism that is commonly used by pathogenic bacteria to infect host cells and for survival in competitive environments. This system assembles on a core baseplate and elongates like a phage puncturing device; it is thought to penetrate the target membrane and deliver effectors into the host or competing bacteria. Valine-glycine repeat protein G1 (VgrG1) forms the spike at the tip of the elongating tube formed by haemolysin co-regulated protein 1 (Hcp1); it is structurally similar to the T4 phage (gp27)₃–(gp5)₃ puncturing complex. Here, the crystal structure of full-length VgrG1 from *Pseudomonas aeruginosa* is reported at a resolution of 2.0 Å, which through a trimeric arrangement generates a needle-like shape composed of two main parts, the head and the spike, connected *via* a small neck region. The structure reveals several remarkable structural features pointing to the possible roles of the two main segments of VgrG1: the head as a scaffold cargo domain and the β -roll spike with implications in the cell-membrane puncturing process and as a carrier of cognate toxins.

1. Introduction

Bacterial secretion is an important mechanism used by several species in adaptation and survival in specific environments. This secretory process involves the translocation of different molecules from the interior of the cell to its exterior or the delivery of effectors, such as proteins, toxins or enzymes, into eukaryotic cells. These secreted proteins are necessary for bacteria to exploit the hostile environment of the host. Thus, secretion is an essential tool in bacterial pathogenesis and virulence (Cossart & Sansonetti, 2004; Merrell & Falkow, 2004).

Several bacterial secretion systems have been described to date, with the type VI secretion system (T6SS) being the sixth and latest to be identified (Mougous *et al.*, 2006) in *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative nosocomial pathogen responsible for lethal chronic infections in cystic fibrosis patients. This system has also been implicated in virulence and interbacterial competition (Kapitein & Mogk, 2013; Tashiro *et al.*, 2013). T6SS contains three main multimeric components: the transmembrane core (TssJLM), the baseplate (TssEFGK), and the tail and sheath complex (Hcp, VgrG and TssBC) (Durand *et al.*, 2015; Bingle *et al.*, 2008; English *et al.*, 2014), a puncturing device that is structurally reminiscent of the bacteriophage tail sheath. This bacterial machinery is used as a contractile injection apparatus that punctures the target cell membrane and thus delivers effectors into the host cell (Russell *et al.*, 2011; Hood *et al.*, 2010).



Several components of the T6SS share structural similarity with elements of the viral infection machinery, such as the tube formed by hexamers of the bacterial Hcp1 (Mougous *et al.*, 2006), which resembles the T4 virus spike tube gp19 proteins (Leiman *et al.*, 2009; Pell *et al.*, 2009; Cascales & Cambillau, 2012). Indeed, analysis of the structure of Hcp1 also suggests a relationship with the gpV tail tube protein of the λ phage tail protein (Pell *et al.*, 2009). Moreover, the sheath formed by VipA/VipB (TssB1/TssC1 in *P. aeruginosa*; Zoued *et al.*, 2014) seems to be a contractile structure that has been suggested to hug the Hcp1 tube and eject effectors upon polymerization, contraction and disassembly (Leiman *et al.*, 2009; Bönemann *et al.*, 2009, 2010; Basler *et al.*, 2012; Clemens *et al.*, 2015; Kudryashev *et al.*, 2015). Hcp1 and VgrG1 have been described among these effectors (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2007). This latter exoprotein, VgrG1, is structurally similar to the T4 phage (gp27)₃–(gp5)₃ puncturing spike complex that is arranged as a needle-like β -helix and is located at the tip of the shooting phage machinery (Leiman *et al.*, 2009; Pukatzki *et al.*, 2007; Browning *et al.*, 2012; Kanamaru *et al.*, 2002). It has been proposed that the dual Hcp1/VgrG1 system acts as a spike in which Hcp1 constitutes the long tail and VgrG1 is the piercing tip. Both of these proteins cross the target membrane together, like the tail and tip used by phages to inject their DNA into the host cell (Leiman *et al.*, 2009; Kanamaru *et al.*, 2002).

Only a few X-ray structures related to the T6SS puncturing device have been solved. So far, there are several crystal structures of Hcp homologues from *P. aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006), *Acinetobacter baumannii* (Ruiz *et al.*, 2015), *Edwardsiella tarda* (Jobichen *et al.*, 2010), *Burkholderia pseudomallei* (Lim *et al.*, 2015) and *Yersinia pestis* (PDB entry 3v4h; Center for Structural Genomics of Infectious Diseases, unpublished work) and a double mutant from entero-aggregative *Escherichia coli* (Douzi *et al.*, 2014). While this work was being performed, the coordinates of a low-resolution structure of full-length *P. aeruginosa* PAO1 VgrG1 were deposited in the Protein Data Bank (PDB entry 4mtk; L. V. Sycheva, M. M. Shneider, M. Basler, B. T. Ho, J. J. Mekalanos & P. G. Leiman, unpublished work). However, to date we have found no publication associated with this deposition. Furthermore, structural information for VgrG1 includes the N-terminal domain of *E. coli* VgrG1 (Leiman *et al.*, 2009) and the C-termini of *E. coli* (Uchida *et al.*, 2014) and *V. cholerae* (Durand *et al.*, 2012) VgrG1. This latter structure contains the actin cross-linking domain (ACD) that is absent in VgrG1 from *P. aeruginosa*, and thus the majority of the hypothetical models generated for VgrG1 have been based on the T4 phage gp27–gp5 complex (Leiman *et al.*, 2009). This prompted us to study the three-dimensional details of full-length VgrG1 in order to obtain a better understanding of the different components of this bacterial secretion system.

Here, we have determined the crystal structure of full-length VgrG1 from *P. aeruginosa* at a resolution of 2.0 Å, providing structural insights into a key component of the T6SS bacterial machinery. The high-resolution three-dimensional structure reveals a trimeric fold that differentiates two main

parts of the protein assembly, the head and the spike, which are connected by a loop-based neck. This particular molecular arrangement resembles the puncturing-device machinery of the T4 bacteriophage (gp27)₃–(gp5)₃ complex that the virus uses to inject its DNA into the host cell.

2. Materials and methods

2.1. Cloning, expression and purification

The DNA fragment encoding the full-length VgrG1 sequence from *P. aeruginosa* PAO1 was amplified from genomic DNA by PCR using the forward primer 5'-CGCGC-ATATGCAACTGACCCGCCTGGTCCA-3' and the reverse primer 5'-CGCCTCGAGGCCCTTCGCCGGCGCGGAA-A-3'. The PCR product was cloned into the pET-29 vector (Novagen) without the stop codon, generating the plasmid pET-VgrG1 that allows the expression of a C-terminally Leu-Glu-6 \times His-tagged protein.

For the production of native VgrG1, the pET-VgrG1 plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS cells. The cells were grown at 310 K in 2 \times TY medium until the optical density at 600 nm reached a value of 0.7, at which point isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM and the culture was grown for a further 4 h.

The cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 146 mM sarkosyl (*N*-lauroylsarcosine sodium salt; Sigma) and 0.2 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF; Sigma)].

After sonication, the lysate was clarified by centrifugation (20 000g, 30 min, 277 K) and the supernatant was filtered through a 0.34 μ m pore-size filter (Sartorius). The sample was bound to an Ni-Sepharose column (5 ml HiTrap Chelating column, GE Healthcare) previously loaded with 0.1 M NiSO₄ solution and washed with 40 column volumes (CV) of a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl in order to remove the free sarkosyl. The column was further washed with 5 CV of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole and VgrG1 was eluted with a linear gradient using 13 CV of wash buffer containing 500 mM imidazole. The fractions containing VgrG1 were mixed, concentrated with Amicon ultrafiltration devices (100 kDa cutoff, Millipore) and further purified by gel filtration. The sample was loaded onto a Superdex 200 16/60 column (GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM NaCl at 295 K. The VgrG1-containing fractions were pooled and concentrated to 10 mg ml⁻¹ as above, and the protein was finally flash-cooled under liquid nitrogen and stored at 193 K until use.

Overproduction of the target selenomethionine (SeMet)-derivatized protein was carried out at 310 K according to a modification of the inhibition of methionine-biosynthesis pathway technique described by Van Duyne *et al.* (1993), using the same non-auxotrophic cells as used for expression of the wild-type protein. The cells were first grown in 2 \times TY medium to an optical density of 0.7 at 600 nm and the culture

was then centrifuged twice (10 min at 3000g) and resuspended in 30 ml M9 medium (8.8 g l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 3 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g l⁻¹ NaCl, 1 g l⁻¹ NH₄Cl). The cells were then grown in 1 l enriched M9 medium (1×; 14.7 mg l⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 246 mg l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 10 mg l⁻¹ vitamin B₁, 0.4% glucose) for 30 min at 310 K. Subsequently, an amino-acid cocktail was added directly as a powder to the culture [50 mg l⁻¹ SeMet (Sigma), 100 mg l⁻¹ lysine, 100 mg l⁻¹ threonine, 100 mg l⁻¹ phenylalanine, 50 mg l⁻¹ leucine, 50 mg l⁻¹ isoleucine and 50 mg l⁻¹ valine] and, after 15 min, IPTG was added to a final concentration of 1 mM to induce gene expression. The overall yield was approximately 6 mg of SeMet-derivatized VgrG1 protein per litre of culture.

2.2. Protein crystallization and X-ray data collection

Initial crystallization trials were carried out with a Cartesian Honeybee robot (Digilab) using commercially available screens. Optimized crystals were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method at 277 K. After refining the initial conditions, crystals were obtained in 0.1 M HEPES pH 7.2, 0.2 M Li₂SO₄, 38% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) by mixing 1 µl purified SeMet-labelled VgrG1 protein (10 mg ml⁻¹) with 1 µl reservoir solution and equilibrating against 0.5 ml reservoir solution. SeMet-derivatized protein was produced in order to obtain experimental phases because at the beginning of the project there was no structure deposited in the PDB that could be used for solution of the structure. Heavy-metal soaks were also attempted in order to obtain experimental phases. Since the crystals of the SeMet-derivatized protein diffracted better than those of the native protein, we used the SeMet-derivative data to solve the structure and for the discussion of the results. High-resolution data (2.0 Å) were clearly evident for an SeMet-derivatized crystal soaked in 2 mM Nd₂(SO₄)₃ solution for 16 min at 277 K.

Crystals were mounted on nylon loops and flash-cooled in liquid nitrogen. Diffraction data were collected on the BL13-XALOC beamline at the ALBA synchrotron, Barcelona, Spain and on both the PROXIMA1 and PROXIMA2-A beamlines at the SOLEIL synchrotron, Gif-sur-Yvette, France. The data set used for structure solution was collected at ALBA using a wavelength of 1.72785 Å (the Nd L₁ edge) at 100 K.

The reflections were integrated and scaled with XDS (Kabsch, 2010) and merged using AIMLESS (Evans & Murshudov, 2013) from the CCP4 program suite (Winn *et al.*, 2011). The crystals belonged to space group P6₃, with unit-cell parameters $a = b = 78.6$, $c = 430.4$ Å. This space group was selected owing to the presence of systematic absences on the c axis ($00l; l = 2n$). Analysis of the content of the asymmetric unit indicated the presence of two molecules (V_M of 2.6 Å³ Da⁻¹, with a solvent content of 53%). Data quality was analyzed with *phenix.xtriage* from the PHENIX package (Adams *et al.*, 2010). This indicated the presence of merohedral twinning in all of the VgrG1 crystals measured that belonged to this space group. The twinning fraction was 0.48

Table 1

Data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Data collection	
X-ray source	BL13-XALOC, ALBA
Space group	P6 ₃
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = b = 78.6$, $c = 430.4$, $\alpha = \beta = 90$, $\gamma = 120$
Resolution range (Å)	86.08–2.00 (2.03–2.00)
Total No. of reflections	1236141 (39470)
No. of unique reflections	94941 (4223)
R _{merge} (%)	13.5 (81.4)
Average mosaicity (°)	0.21
Completeness (%)	94.1 (85.1)
Multiplicity	13.0 (9.3)
Mean $\langle I/\sigma(I) \rangle$	12.9 (2.1)
CC _{1/2} (%)	96.4 (62.9)
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)	2.6
Solvent content (%)	53
Subunits per asymmetric unit	2
Wilson B factor (Å ²)	44
Twin operator	$h, -h - k, -l$
Twin fraction (H -test)	0.48
Refinement	
Resolution range (Å)	71.73–2.00 (2.05–2.00)
No. of working reflections	90119 (4702)
Final R _{work} /R _{free}	0.22 (0.25)/0.25 (0.31)
No. of residues per asymmetric unit	1289
No. of protein atoms (non-H)	10216
No. of Na ⁺ ions	13
No. of Cl ⁻ ions	38
No. of water molecules	651
Mean B factors (Å ²)	
Protein atoms (non-H)	37.5
Na ⁺ ions	38.4
Cl ⁻ ions	47.0
Water molecules	29.5
Deviations from ideality	
R.m.s.d., bond lengths (Å)	0.01
R.m.s.d., bond angles (°)	1.66
Ramachandran plot statistics	
Allowed (%)	96.7
Outliers (%)	3.3
PDB code	4uhv

according to the H -test. Data-collection statistics are shown in Table 1.

2.3. Structure determination and refinement

We were never able to obtain experimental phases from our SeMet-derivatized or heavy-metal-soaked crystals owing to the presence of severe merohedral twinning. In October 2014 we were able to obtain the coordinates of the low-resolution structure of VgrG1 from *P. aeruginosa* that had been deposited by Sycheva and coworkers. This structure has not been published to date. These coordinates (PDB entry 4mtk) were used to solve the structure of VgrG1 by molecular replacement using Phaser (McCoy *et al.*, 2007). The initial model was first refined using *phenix.refine* from the PHENIX package, with twin law $h, -h - k, -l$ and simulated annealing. The final model was obtained by consecutive rounds of refinement performed with REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011), using intensity-based twin refinement and alternating manual building with Coot (Emsley *et al.*, 2010). Solvent molecules were introduced automatically and inspected visually. A total

of 5% of the reflections were used to calculate the R_{free} value throughout the refinement process.

The final model of VgrG1 from *P. aeruginosa* contains all 643 residues for each monomer. In addition, one (Leu) and two (Leu and Glu) extra residues belonging to the spacer of the His tag could be traced for chains *A* and *B*, respectively. 651 solvent molecules, 38 chloride ions and 13 sodium ions were also included (Table 1). The quality of the model was assessed with *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010) and macromolecular interfaces and assemblies were explored with *PISA* (Krissinel & Henrick, 2007). Assignment of the secondary-structure elements was carried out using *DSSP* (Joosten *et al.*, 2010) together with a careful examination of the structure. 96.6% of the residues belonged to the preferred and allowed regions in the Ramachandran plot (the refinement statistics obtained for the final model are summarized in Table 1).

Three-dimensional structure superpositions were performed using the 'SSM superpose' and 'LSQ superpose' tools within *Coot* (Emsley *et al.*, 2010). All structure figures were generated with *PyMOL* (<http://www.pymol.org/>).

The structure of Hcp1 from *P. aeruginosa* was retrieved from the PDB (PDB entry 1y12; Mougous *et al.*, 2006). The docking analysis of Hcp1 and VgrG1 was carried out with the *HEX* docking software (Macindoe *et al.*, 2010).

2.4. Analytical ultracentrifugation

Experiments were carried out at the Analytical Ultracentrifugation Facility of the CIB, Madrid. The protein sample (0.5 mg ml^{-1} , $7 \mu\text{M}$) was pre-cleared at $16\,000g$ in buffer consisting of 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM NaCl before the ultracentrifugation experiments. The analytical ultracentrifugation experiments were conducted at 293 K.

2.4.1. Sedimentation velocity. A sedimentation-velocity experiment was performed on an Optima XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman, California, USA) using an An-50 Ti rotor and standard double-sector Epon/charcoal centre-pieces (1.2 cm optical path length). The sample and reference solution ($400 \mu\text{l}$ of each) were loaded and centrifuged at $48\,000 \text{ rev min}^{-1}$ for 3 h and 30 min, registering entries for 1 min at 280 nm.

The sedimentation-coefficient distributions were calculated by least-squares boundary modelling of the sedimentation-velocity data using the $c(s)$ method as implemented in the *SedFit* software (v.2.51), as described elsewhere (Schuck, 2000). The calculated frictional ratios (1.38) were used to transform the $c(s)$ distribution into the corresponding molar-mass distribution.

2.4.2. Sedimentation equilibrium. An Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman, California, USA) equipped with UV-visible absorbance optics was employed for analytical ultracentrifugation measurements using an An-50 Ti rotor. Sedimentation-equilibrium experiments were carried out at several speeds (6500 , $13\,000$, $17\,000$ and $23\,000 \text{ rev min}^{-1}$) and at two wavelengths (280 and 292 nm) with a short column ($95 \mu\text{l}$). After the equilibrium scans,

a high-speed centrifugation run at $48\,000 \text{ rev min}^{-1}$ was performed to estimate the corresponding baseline offsets.

The weight-average buoyant molecular weight of the VgrG1 protein was calculated using *Hetero-Analysis* (v.1.1.44; Cole, 2004). The average molecular weight of the protein was determined from the experimental buoyant molecular values using a partial specific volume of $0.7239 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ and a density of $1.00293 \text{ g cm}^{-3}$.

2.5. Small-angle X-ray scattering (SAXS)

SAXS data were collected on BM29 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France using the BioSAXS robot and a Pilatus 1M detector (Dectris, Switzerland) with synchrotron radiation at a wavelength of 1.0 \AA . The sample-to-detector distance was 2.867 m (Pernot *et al.*, 2013) and the protein samples were prepared at concentrations of 6, 12 and 17 mg ml^{-1} in a buffer consisting of 20 mM Tris-HCl pH 6.9, 100 mM NaCl, 2 mM DTT. Each measurement consisted of ten frames of 1 s exposure of a $100 \mu\text{l}$ sample flowing continuously through a 1 mm diameter capillary during X-ray exposure. Buffer scattering was measured immediately before measurement of the corresponding protein samples at 277 K. The scattering images obtained were spherically averaged and the buffer-scattering intensities were subtracted using in-house software. The three different sample concentrations showed the expected increase in $I(0)$, as well as constant R_g and ratios of scattering intensity, indicating little or no interparticle interactions. Particle envelopes were generated *ab initio* using *DAMMIN* (Svergun, 1999). Multiple runs were performed to generate 20 independent model shapes that were combined and filtered to produce an averaged model using the *DAMAVR* software package (Volkov & Svergun, 2003).

3. Results

3.1. Crystal structure of full-length VgrG1

The wild-type VgrG1 protein from *P. aeruginosa* was successfully expressed in a heterologous expression system and crystallized. The crystals presented a hexagonal morphology and belonged to space group $P6_3$, diffracting to below 2.0 \AA resolution. Initially, the lack of a suitable model prompted us to collect data from heavy-atom derivatives in an attempt to obtain experimental phases. The best diffraction data were obtained from one crystal using SeMet-derivatized protein soaked in 2 mM $\text{Nd}_2(\text{SO}_4)_3$ solution. However, the crystals were found to be twinned, hampering the phasing procedure (Dauter, 2003). After a three-dimensional model became available (PDB entry 4mtk), we were able to solve the structure by molecular replacement.

The asymmetric unit contains two molecules, chains *A* and *B*, which establish interactions with their two threefold symmetry-related chains, forming two trimers (Fig. 1*a*). All 643 residues of both chains could be located in the electron-density map (Fig. 1*b*). Both monomers have an elongated shape with a long axis of around 180 \AA . However,

superposition of the two monomers of the asymmetric unit showed some conformational differences, which were especially significant at the top and the bottom of the molecule (Fig. 1c).

3.2. Biological assembly

The packing of the symmetry-related molecules in the crystal clearly indicates that the monomer does not represent the biological assembly. Three monomers related by a crystallographic threefold axis make up a compact unit (Figs. 1a and 2a). They establish very close and compact lateral contacts in the top half of the molecule, and at the bottom half the chains are intertwined with the symmetry-related chains, forming a triple-stranded β -helix that strongly sustains the trimeric assembly (Figs. 2a and 3a). The existence of this trimeric assembly is further supported by analysis of the protein interfaces using *PISA* (Krissinel & Henrick, 2007). Trimer *A* presents a surface area of $109\,375\text{ \AA}^2$ with a buried area of $22\,916\text{ \AA}^2$, whereas trimer *B* buries a surface of $23\,127\text{ \AA}^2$ in a total surface area of $106\,924\text{ \AA}^2$.

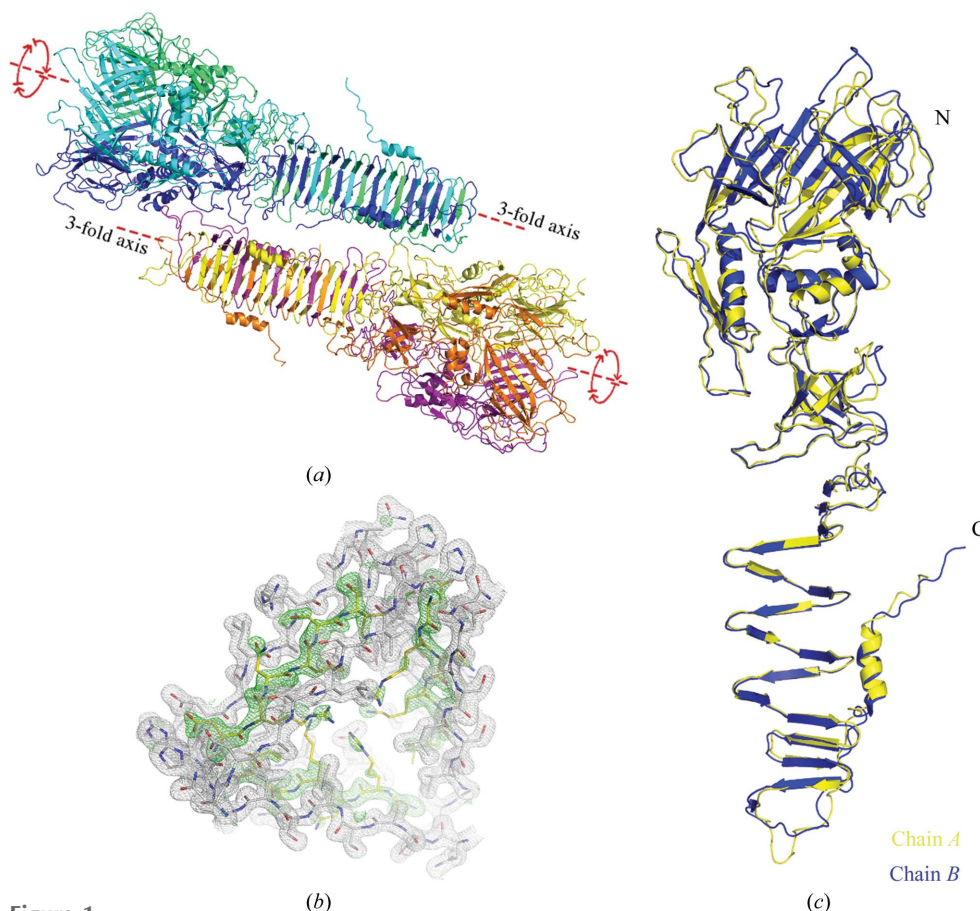


Figure 1

Content of the asymmetric unit of the full-length VgrG1 crystals. (a) The asymmetric unit of VgrG1 crystals contains two molecules, represented in yellow (chain *A*) and blue (chain *B*). Each chain interacts with two symmetry-related molecules (orange and purple in trimer *A* and cyan and green in trimer *B*) through one threefold axis to generate two trimers. The red dashed lines represent the ternary axes. (b) Electron-density map ($2F_o - F_c$ at 2.0σ , grey) and electron-density OMIT map ($F_o - F_c$ at 3.0σ , green). The represented region corresponds to three turns of the β -helix of the spike. The omitted region includes residues Asp519–Ile524 (yellow sticks). (c) Superposition of chains *A* (yellow) and *B* (blue). Amino and carboxylic termini are indicated by ‘N’ and ‘C’, respectively.

The quaternary arrangement derived from the crystal structure is also supported by the results of biophysical studies of the protein in solution, for example those obtained by both SAXS and analytical ultracentrifugation experiments. In SAXS studies the scattering profile together with the particle distribution function (Supplementary Fig. S1a) is consistent with an elongated molecule that has a maximum dimension (D_{\max}) of $173.6 \pm 6.3\text{ \AA}$ and a molecular mass of $226.0 \pm 32.3\text{ kDa}$, which are in close agreement with the trimeric arrangement, which has a D_{\max} of 178 \AA and a calculated molecular mass of 219.2 kDa . The crystallographic structure showed a very good fit to the SAXS *ab initio* model (Fig. 2b; Supplementary Fig. S1). These data are further supported by the results obtained by analytical ultracentrifugation for the molecular assembly present in solution (Supplementary Fig. S2).

3.3. Structure overview

The structure of VgrG1 results in a trimeric arrangement with a needle-like shape composed of two main domains, the head and the spike, and a small connecting region, the neck (Fig. 2c).

The upper part of the molecule is the head (residues 1–372, 388–411 and 430–449), which is the widest part of the molecule, and it can be subdivided into three regions arranged as three stacked rings (Fig. 2c). The first ring (Fig. 2c, yellow) consists of two concentric layers. The inner layer is composed by one eight-stranded antiparallel β -sheet (β_5 – β_6 – β_2 – β_1 – β_{18} – β_{19} – β_{15} – β_{12}) from each monomer that generates a triangular-shaped β -barrel with 24 strands and with lateral contacts among monomers between strands β_5 and β_{12} (Fig. 2d). The outer layer comprises a pair of two-stranded antiparallel β -sheets (β_3 – β_4 and β_{16} – β_{17} ; Fig. 2d). The middle ring is a more extensive α/β block with one 3_{10} -helix (α_1), three α -helices (α_2 – α_4), an antiparallel β -sheet (β_7 and β_9 strands), a Ψ -loop motif formed by three strands (β_8 , β_{11} and β_{10}) and one two-stranded (β_{13} – β_{14}) parallel β -sheet (Fig. 2c, green, and Fig. 2d). Here, the main contacts occur between strand β_{14} and residues located in the loop that connects the 3_{10} -helix and the β_7 strand. The third

ring presents an OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) motif (Murzin, 1993) consisting of a β -barrel made up by five strands (β 20– β 24; Fig. 2c, red, and Fig. 2d). The three OB-fold motifs stack laterally on each other, making hydrophobic contacts that stabilize the ring, such as through the β 23 and β 24 strands. Also, a salt bridge established between Arg409 and Glu430, located in β 22 and β 23,

respectively, of neighbouring OB-fold motifs represents another important stabilization point of this ring.

The neck, located in the middle of the trimer (residues 373–387, 412–429 and 450–464), is a small intertwined loop region with no ordered regular secondary structure that connects the head and the spike (Fig. 2c, blue). The neck is essentially formed by loops entering and leaving the OB-fold motifs. Two

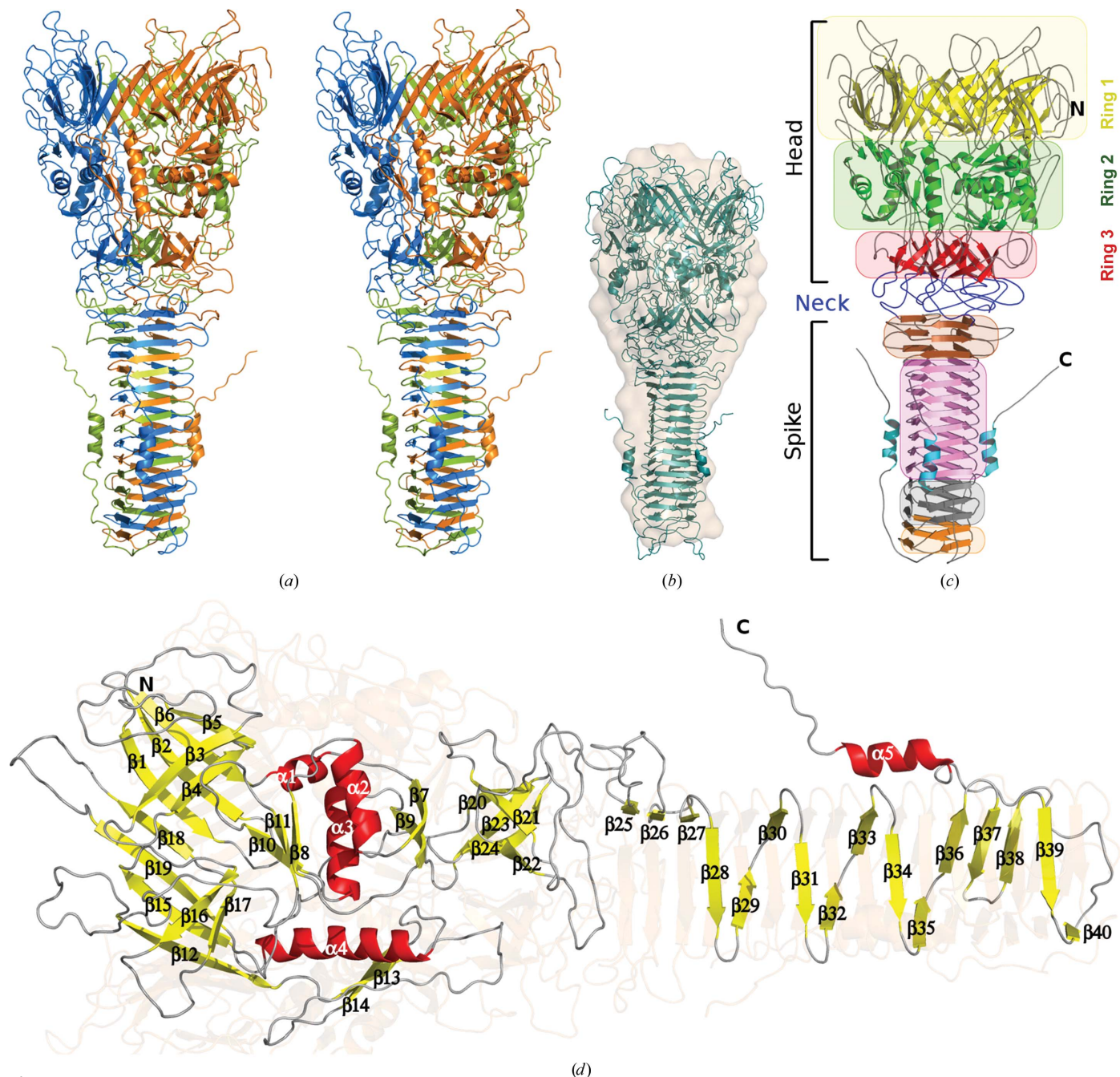


Figure 2

Overview of the VgrG1 trimer. (a) Side stereoview, in cartoon representation, of the trimeric arrangement of VgrG1. Each chain is shown in a different colour. (b) Fitting of the VgrG1 trimer (green) into the SAXS model. (c) Diagram of the different structural features of the trimeric assembly. VgrG1 has a needle-like shape with two main domains (the head at the N-terminal and the spike at the C-terminal) connected by a loop-rich domain (the neck; blue). The head comprises three rings. The top ring is a β -sheet-rich domain (ring 1; yellow), the middle ring is a mixed α/β block (ring 2; green) and the bottom ring is composed by three OB-fold motifs (ring 3; red). The spike is arranged as a β -helix with four different structural motifs: a first β -meander (brown), a long spiral β -sheet (pink), a second β -meander motif (grey) and the final two turns of the β -helix (orange). The α -helix located at the C-terminal extension of the molecule is shown in cyan. (d) Secondary-structure elements of VgrG1. β -Strands are shown in yellow, α -helices in red and loops in grey.

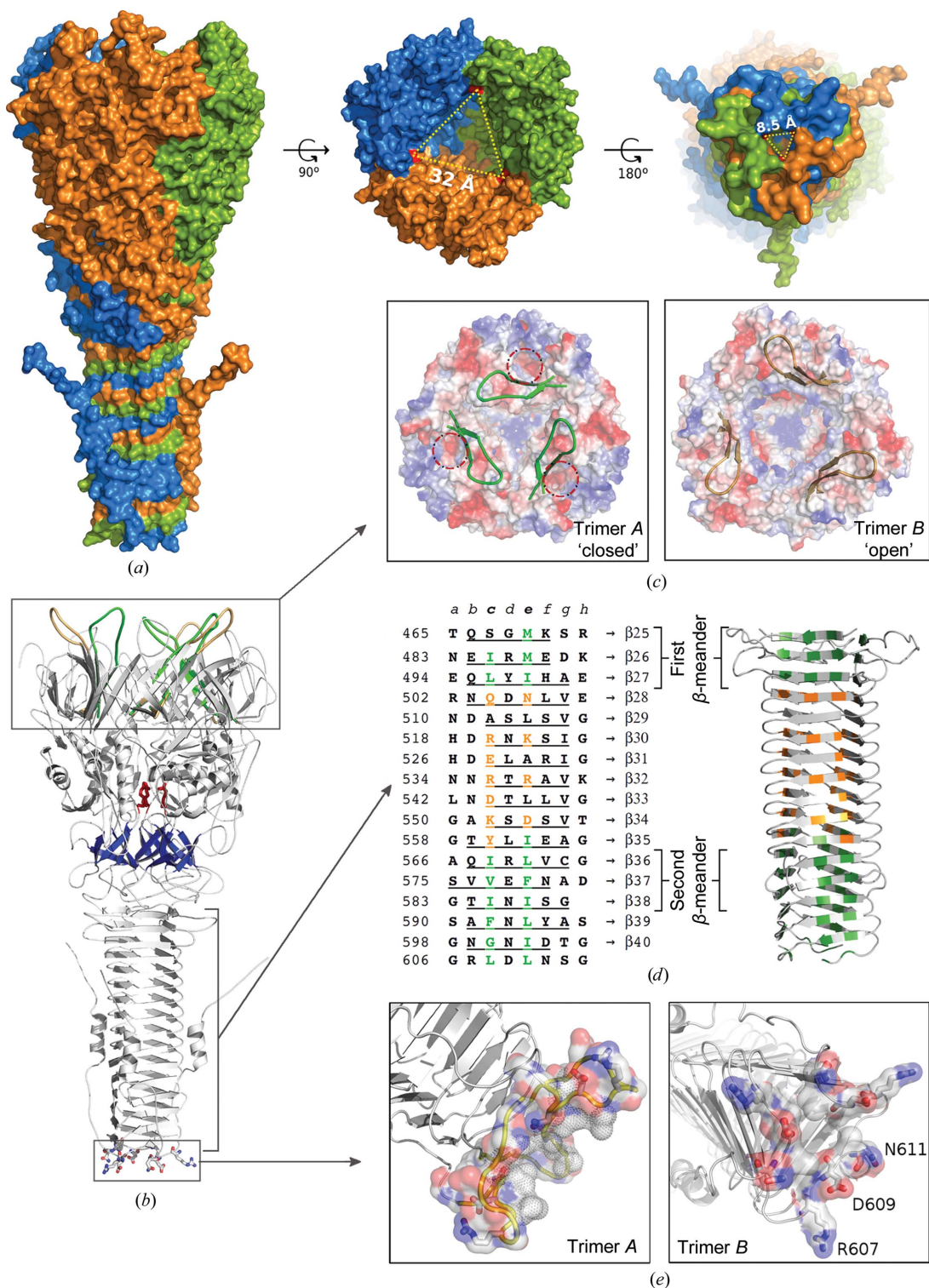


Figure 3

Surface of the VgrG1 trimer. (a) Side view of VgrG1 (left) with each monomer represented in different colours showing the beginning of the twisting at the neck and the intertwining of the spike. The top (middle) and bottom (right) views show the presence of cavities. Their contours are represented by dotted lines between Gln214 and Leu608 (red) from the symmetry-related monomers. (b) Specific features of VgrG1. The top rectangle shows the different conformations of the $\beta 18$ – $\beta 19$ loop from both trimers *A* and *B* represented in green and light orange, respectively. Arg365 located at the bottom of the head cavity is shown as red sticks. The OB-fold motifs are shown in blue. The polar residues located at the bottom of the spike are represented as sticks. (c) Top view of VgrG1 showing the electrostatic surface and the 'closed' (trimer *A*) and 'open' (trimer *B*) conformations of the $\beta 18$ – $\beta 19$ loops. The dotted circle in trimer *A* indicates the negatively charged cavities that are exposed in the 'closed' conformation. (d) Manual sequence alignment of the spike β -strands (underlined) showing an octad repeat pattern. Residues at positions *c* and *e* pointing inwards show a hydrophobic (green), hydrophilic (orange), hydrophobic (green) pattern. (e) Electrostatic potential surface showing the different conformations in the two trimers at the bottom of the spike. The three feet of trimer *A* are shown in yellow. Polar residues are shown as sticks and hydrophobic residues in trimer *A* are shown as dots.

of these loops from one monomer embrace the third loop that belongs to a neighbouring monomer, thus beginning the intertwining of the three monomers that continues throughout most of the C-terminal region.

The C-terminal segment of the molecule is the spike (residues 465–643) and includes 16 β -strands and one α -helix from each monomer (Fig. 2*d*). In the trimer assembly, these strands form three long β -sheets with 16 strands each [two antiparallel (β 26 and β 37) and 14 parallel] arranged in a triple-stranded β -helix with a twisted triangular prism shape. Each β -sheet comprises eight strands from one monomer, four from the second monomer and the other four from the third monomer. The spike can be divided into four structural regions according to the arrangement of the β -strands. In the first segment (Fig. 2*c*, brown), residues 466–500 form a β -meander motif of three β -strands (β 25– β 27; Fig. 2*d*), while in a second section residues 503–564 (Fig. 2*c*, pink) delineate a single spiral made up by eight β -strands from each monomer intertwined and forming the central part of the spike (β 28– β 35; Fig. 2*d*) that strongly sustains the C-terminal tail spike arrangement. The third region (Fig. 2*c*, grey) is another three-stranded β -meander motif (residues 567–589) named β 36– β 38 (Fig. 2*d*). The fourth region (residues 591–603; Fig. 2*c*, orange) includes the last two β -strands (β 39 and β 40; Fig. 2*d*) and one loop that forms the tip of the needle.

Finally, there is an extended loop from amino acid 612 including the last three-turn α -helix (α 5; residues 625–635; Fig. 2*d*) that folds back onto the surface of the spike, generating a sheath-like structure (Fig. 2*c*, cyan) that is mainly stabilized through hydrophobic interactions.

3.4. Surface

The outer surface of VgrG1 does not present any significant characteristics other than small positively and negatively charged patches (Fig. 3*c*). The top view shows an equilateral triangular opening to a central cavity with a side length of around 32 Å measured between Gln214 of two of the monomers (Fig. 3*a*, dotted triangle). This cavity acquires a funnel shape and extends deep into the molecule (around 60 Å), and a positively charged floor made up by Arg148 and Arg365 can be observed at the bottom (Fig. 3*b*, red). The inner side of the cavity is mainly composed by the side chains of charged and hydrophilic residues (30 Arg, three His, 24 Glu, six Asp, nine Thr, three Ser, 15 Gln and six Asn). Three small cavities can be observed at the top of trimer *A* of around 15 Å in depth (Fig. 3*c*, circles). These pockets present a negatively charged bottom made up by the side chain of Glu27 and the carbonyl O atoms of Glu28, Arg31, Leu32, Gly296 and Ala297. Thus, the entrance presents a positively charged edge towards the outside of the molecule and a hydrophobic edge towards the central cavity. In trimer *B* these pockets are not exposed, as the loops between strands β 18 and β 19 are located on top of these cavities and consequently hide them ('open' conformation; Figs. 3*c* and 5*b*). This loop flips over the β 18 axis, rotating the β 18– β 19 plane by more than 120° and thus reducing the

internal diameter of the VgrG1 head cavity by up to 15 Å in trimer *A* ('closed' conformation; Figs. 3*c* and 5*b*).

The spike presents a well characterized internal hydrophobic polar hydrophobic environment, a charge distribution that is originated by the side chains of the residues pointing towards the centre of the β -helix. These residues are aligned in a pattern that occupies a consensus position (Fig. 3*d*, positions *c* and *e*) in a manually assigned octad repeat pattern (*a*–*h*). The first β -meander motif (β 25– β 27) shows hydrophobic residues (Fig. 3*d*, residues in green), except for one Ser at the first inner position of the first β -strand. The next seven strands show mainly hydrophilic amino acids (from β 28 to β 34; Fig. 3*d*, residues in orange), except for four positions out of 14. The remaining six strands including the second β -meander together with the last segment of the spike again show mainly hydrophobic residues at these positions (Fig. 3*d*, residues in green). Tyr560 located in the β 35 strand (Fig. 3*d*) interacts with hydrophilic residues of β 34 apart from its symmetry-related tyrosines.

At the bottom, a small triangular cavity at the centre of the molecule can also be discerned with a side length of around 8.5 Å between Leu608 from each monomer (Fig. 3*a*, dotted triangle) and a depth of around 33 and 28 Å for molecules *A* and *B*, respectively. This length covers the last five β -strands of the C-terminal β -helix. The difference between these distances comes from the presence at the bottom part of three feet in trimer *A* (Fig. 3*e*, yellow) but not in trimer *B*. Each foot is made up by residues 602–610, with a distribution of hydrophobic residues towards the inside of the molecule (Fig. 3*e*, dots) and hydrophilic residues (Arg607, Asp609 and Asn611) towards the outside of the molecule (Fig. 3*e*, sticks). In trimer *B* these three residues are pointing downwards, conferring a polar character to the bottom part (Fig. 3*e*).

The last α -helix at the C-terminal extension possesses an amphipathic character with hydrophobic residues at the surface of interaction with the spike (Val625, Ile629, Val633 and Met636; Fig. 2*d*, α 5), followed by three successive prolines (638–640). This creates some possibilities for the rearrangement of this region with implications in the piercing of the host cell membrane.

4. Discussion

Bacteria use a wide variety of secretion systems; in particular, the type VI secretion system seems to be an important tool in Gram-negative bacteria to communicate and deliver effectors into both prokaryotic and eukaryotic cells (Russell *et al.*, 2011; Hood *et al.*, 2010; Bartonickova *et al.*, 2013). Two proteins, VgrG1 and Hcp1, are the major components of the T6SS tube (Durand *et al.*, 2015). It has been proposed that VgrG1 forms the needle apparatus that pierces through the host cell envelope and delivers effector proteins inside, thereby mediating the toxicity (Leiman *et al.*, 2009; Cascales & Cambillau, 2012). Also, the VgrG1 protein represents one of the principal effectors since it is a secreted and translocated component into eukaryotic cells (Bartonickova *et al.*, 2013). In this study, we present the crystal structure of full-length

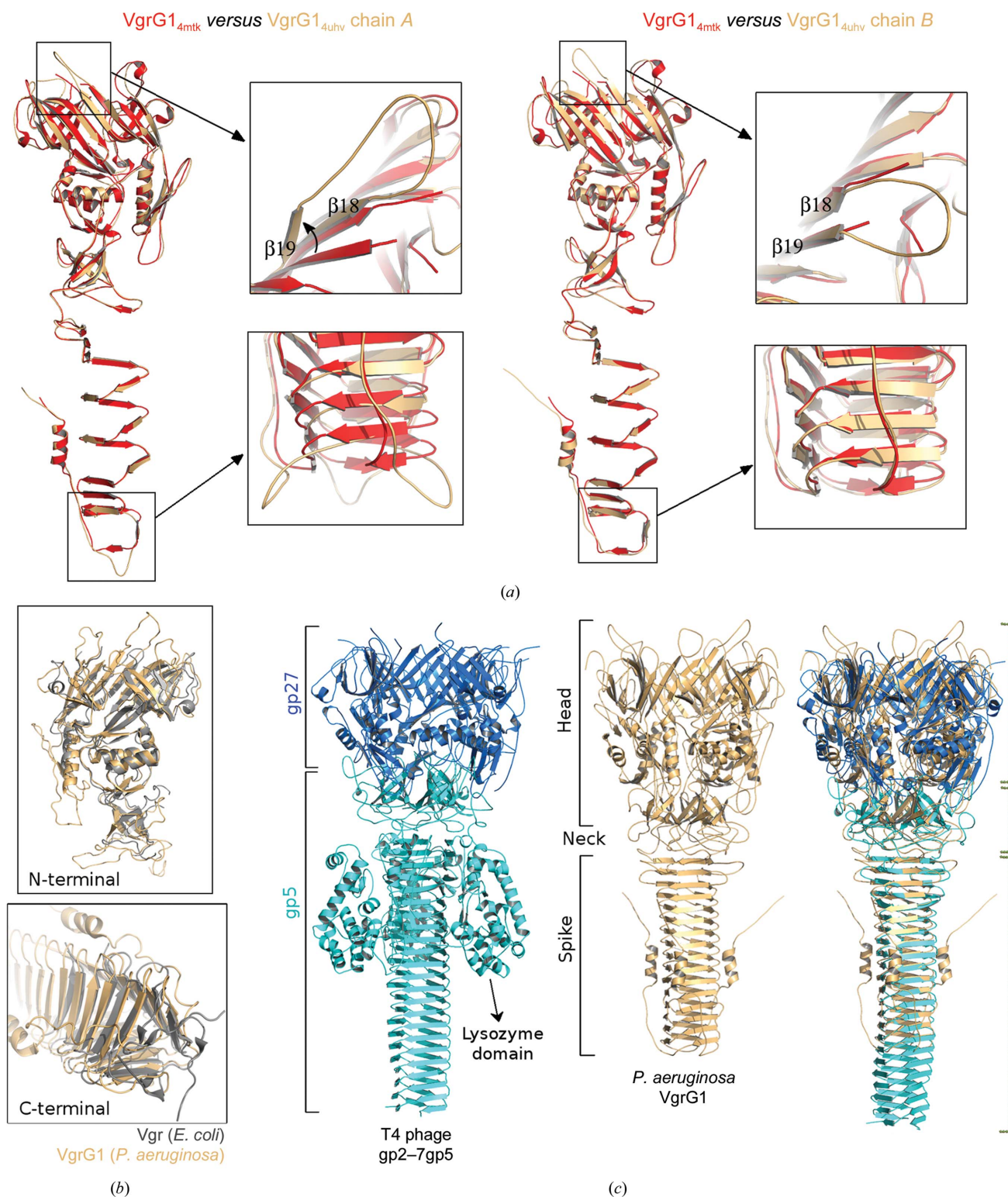


Figure 4
 Comparison of our VgrG1 structure with the unpublished structure 4mtk determined by Sycheva and coworkers and with its structural homologues Vgr from *E. coli* and the T4 phage cell-puncturing device. (a) Superpositions of monomers A (left) and B (right) of our VgrG1 structure (ochre) with a monomer of the unpublished 4mtk structure (PDB entry 4mtk, red). Boxes represent the differences between the structures in the loop between strands $\beta 18$ and $\beta 19$ (partially absent in VgrG1_{4mtk}) and at the bottom of the spike (top and bottom boxes, respectively). (b) Superpositions of putative Vgr proteins from *E. coli* (grey) with VgrG1 from *P. aeruginosa* (ochre). The top box shows a superposition of the N-terminal region of VgrG1 with the *E. coli* c3393 protein (PDB entry 2p5z; Leiman *et al.*, 2009) and the bottom box shows a superposition of the C-terminal region of VgrG1 with a putative Vgr protein from *E. coli* (PDB entry 3wit; Uchida *et al.*, 2014). (c) Structures of the bacteriophage T4 cell-puncturing device ($(gp27)_3-(gp5)_3$) (blue and cyan, respectively; PDB entry 1k28, left panel; Kanamaru *et al.*, 2002) and of the VgrG1 trimer from *P. aeruginosa* (ochre, middle panel). The superposition of VgrG1 trimer and $(gp27)_3-(gp5)_3$ without the lysozyme domain (right panel) shows that the bacteriophage spike is longer than that of VgrG1, with the β -helix having six additional turns.

VgrG1 at 2.0 Å resolution, providing the structure of a key component of the T6SS bacterial machinery and suggesting its possible roles in bacterial infection.

The low-resolution structure of VgrG1 deposited in the PDB (PDB entry 4mtk) shows a high degree of similarity to our structure (Fig. 4*a*). Superposition of C^α atoms shows an r.m.s.d. of 2.2 and 1.5 Å for monomers *A* and *B*, respectively. Despite this high similarity, there are some significant differences worth pointing out. The most significant differences are located at both ends of the structure. The loop between β-strands 18 and 19 has not been modelled in 4mtk, with only a few residues in both strands. However, in our structure this loop shows two different conformations (Figs. 3*b* and 3*c*). The conformation of this loop in monomer *B* adopts what we have defined as an ‘open conformation’, while what can be seen of this loop in 4mtk indicates a different conformation (Fig. 4*a*, right). This loop in monomer *A* adopts what we have defined as a ‘closed conformation’: in this case not only do the few residues that match those from 4mtk show a different conformation, but strand 19 is also displaced (Fig. 4*a*, left). The other significant difference is located at the bottom of the spike. This region in 4mtk shows a conformation very similar to that of monomer *B* (Fig. 4*a*, right), while monomer *A* in our structure adopts a three-feet conformation (Fig. 4*a*, left). The different conformations present in these two regions of the molecule that we have been able to model show a high degree of flexibility that might be important for the functionality of this protein in the context of interactions with other proteins.

Despite the low sequence similarity, VgrG1 shares structural similarity with two *E. coli* Vgr-related proteins, the N-terminal fragment of the c3393 protein (Leiman *et al.*, 2009; Fig. 4*b*) and the C-terminal part of a putative Vgr protein (Uchida *et al.*, 2014; Fig. 4*b*), showing a good overlap score with the N-terminal segment (secondary-structure superposition with an r.m.s.d. of 1.86 Å). However, this value corresponds to the superposition of the monomers, as the trimers do not superpose that well owing to the larger diameter of the N-terminal cavity of *E. coli* Vgr.

On the other hand, VgrG1 shares structural similarity with the two proteins from the cell-puncturing device of bacteriophage T4, gp27 and gp5 (Kanamaru *et al.*, 2002; Fig. 4*c*). Thus, the first two rings of the N-terminal domain of VgrG1 overlap with gp27, and the OB-fold domains and the spike overlap with gp5 (Fig. 4*c*). Only the lysozyme domain of gp5 is missing in VgrG1.

P. aeruginosa is able to use the T6SS for interaction with other bacteria as well as with eukaryotic cells (Mougous *et al.*, 2006; Tashiro *et al.*, 2013; Hood *et al.*, 2010). The translocation of VgrG1 into the latter should not require a glycosidase activity to cross the cell membrane. In the case of bacterial interaction this activity might help in crossing the cell wall. The lack of this domain does not seem to hamper the functionality of this type of protein. In the case of a close relative of T4, vibriophage KVP40, its gp5 also lacks the lysozyme domain (Rossmann *et al.*, 2004). A close inspection of the operon that encodes the T6SS shows the presence of a lysozyme-like protein that can be used for interaction with

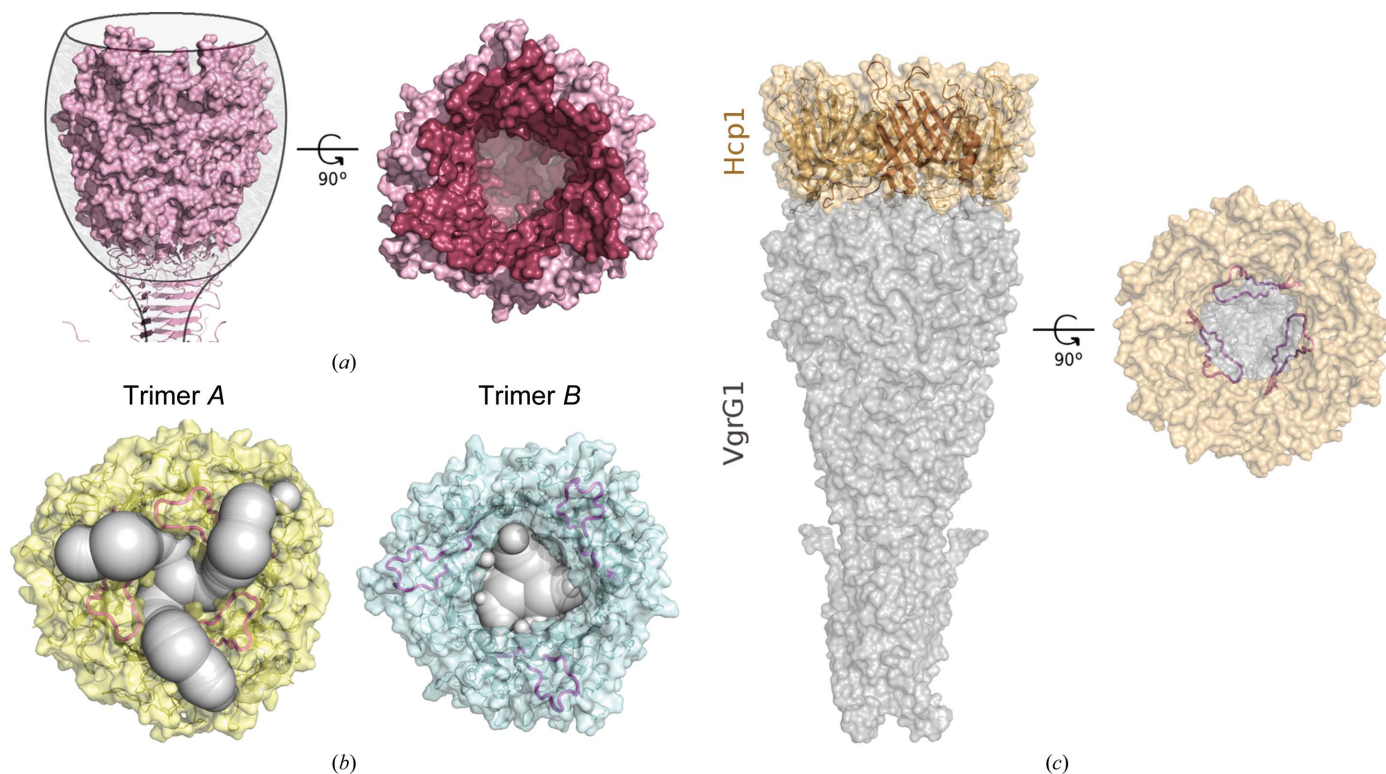
other bacteria (Mougous *et al.*, 2006). Also, *P. aeruginosa* possesses two effector proteins related to the T6SS with amidase and muramidase activities, Tse1 and Tse3, respectively, which are delivered into the periplasm of the host cell (Russell *et al.*, 2011).

4.1. The VgrG1 C-terminal domain: a needle-like structure with implications as a puncturing device

Superposition of the C-terminal domains of T4 gp5 and VgrG1 shows that the bacteriophage spike is longer, with six extra turns of β-helix (Fig. 4*c*). The other structural difference between them is the presence of a C-terminal extension in VgrG1 (Ser612–Gly643) that folds back onto the β-helix, interacting through the α5 helix (Figs. 2*c*, cyan, and 2*d*). One important role for this C-terminal spike could be the initial interaction with the membrane and its piercing for the delivery of effectors and toxins into the host cell. Two structural formations have been reported as piercing tips to attack the membrane: one is the terminal Apex domain located after the β-helical stalk of the membrane-piercing proteins of the P2 and φ92 bacteriophages (gpV and gp138, respectively; Browning *et al.*, 2012) and the second is found in the PAAR-repeat proteins that bind to the C-terminal β-helix of VgrG, sharpening the tip of the T6SS spike complex (Shneider *et al.*, 2013). These are examples of similar compact structures stabilized by iron or zinc ions.

However, the conformation of the end of the β-helix of the VgrG1 structure does not present a sharp point to pierce the membrane as does the Apex domain or the PAAR-repeat proteins. We can see several ways for VgrG1 to adopt this type of piercing tip. The most simple would be the existence of PAAR-repeat or Apex-type proteins in *P. aeruginosa* that bind to the end of the spike, generating the piercing tip. A search for protein sequences containing the PAAR motif in the UniProt database (<http://www.uniprot.org>) showed the existence of at least four entries in *P. aeruginosa* PAO1. This might indicate that the T6SS is likely to have one of these proteins interacting with VgrG1 at the piercing tip of the apparatus and it even could be anchored by the embrace of the C-terminal extension of VgrG1, creating a strong tip for piercing the host cell membrane. Another possibility could be that the C-terminal extension (amino acids 612–643) undergoes a conformational change, coming to the front of the spike and forming a piercing tip, with a three-helix bundle with three prolines (638–640) forming a tight helix as the tip of this complex. The high proportion of hydrophobic residues in this domain (20 apolar *versus* 12 polar amino acids) suggests that these residues might be located on the outer face of this tip, facilitating access to the membrane (Lupas, 1996; Mason & Arndt, 2004). It has been reported that proteins that adsorb to the membrane often do so by inserting at least some hydrophobic residues into the membrane core. This seems to be sufficient to deteriorate the chain-packing density of the lipid bilayer and to increase its permeability to water-soluble solutes (Cevc, 1995).

In addition to the putative piercing-tip role, VgrG1 might have a role as a carrier of cognate toxins by the formation of


Figure 5

Transport role of the VgrG1 N-terminal domain and the VgrG1–Hcp1 interaction model. (a) Left: side view of the cup-shaped head of VgrG1. Right: top view showing the inner cavity (raspberry). (b) The accessible cavities, represented as spheres, present in the head of VgrG1 trimer *A* (left) and trimer *B* (right). The position of the $\beta 18$ – $\beta 19$ loop is shown for each trimer (violet). (c) Left: side view of the model of interaction between a VgrG1 trimer (grey) and an Hcp1 hexamer (light brown; PDB entry 1y12) from *P. aeruginosa*, with one Hcp1 monomer shown in dark brown. Right: top view of the model of interaction, showing the possible docking role of the $\beta 18$ – $\beta 19$ loop (violet).

VgrG1–toxin complexes. It has been shown that the toxicity of Tse6, encoded by the *PA0093* gene, is dependent on VgrG1. Tse6 is a two-domain protein with a putative toxin domain (Toxin_61) at the C-terminus and a PAAR-repeat motif at the N-terminus that can bind to the end of the VgrG1 β -roll. This toxin is coupled with the Tsi6 immunity protein encoded by the *PA0092* gene (Hachani *et al.*, 2014; Whitney *et al.*, 2014).

4.2. VgrG1 N-terminal domain with a scaffold/transport role

The head domain of VgrG1 has the shape of a cup with a large cavity inside (Fig. 5*a*). This cavity presents a hydrophilic surface that allows interaction with soluble proteins (toxins and/or effectors) that could be transported into the interior of the host cell in this way, where they could exert their function upon release. Notably, the conformational differences between the two chains suggest that VgrG1 is a very dynamic protein, in which the $\beta 18$ – $\beta 19$ loop affects the motions responsible for opening (molecule *B*) and closing (molecule *A*) this cavity (Figs. 3*b*, 3*c* and 5*b*). Thus, this loop could play an important role in the Hcp1–VgrG1 interaction (see below) or act as a shutter to control the passage of molecules or effectors.

The current model of T6SS has Hcp1 hexameric rings (Mougous *et al.*, 2006) forming the injection tube surrounded by a contractile sheath formed by HsiB1–HsiC1 (Brunet *et al.*, 2013, 2014; Basler & Mekalanos, 2012; Bönemann *et al.*, 2009, 2010; Lossi *et al.*, 2013). In this model VgrG1 is placed on the

top of the injection apparatus as the tip of the needle. This implies a direct interaction between Hcp1 and VgrG1. This latter hypothesis is sustained by the detection of Hcp1 in secretions from patients infected with *P. aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006). In addition, VgrG1 is not found in the culture supernatant of *hcp*[−] cells and Hcp is not found in the *vgrG*[−] culture supernatant, suggesting that both molecules migrate together towards the host cell (Pukatzki *et al.*, 2007; Zheng & Leung, 2007; Hachani *et al.*, 2011). The external and internal diameters of the Hcp1 hexamer ring are 85 and 40 Å, respectively. The external diameter is very similar to that of the head of VgrG1, ~80 Å, and led us to propose a model for the Hcp1–VgrG1 complex (Fig. 5*c*). The uppermost part of the head has three exposed loops that show a high degree of mobility, as can be seen by the different conformations that they adopt in the two trimers (Fig. 1*c*). Also, small cavities in the wall of the head might help in the docking between Hcp1 and VgrG1. The docking results showed a good interaction between VgrG1 and Hcp1, with binding energies of −365 and −150 kcal mol^{−1} for molecules *A* and *B*, respectively. The higher interaction energy occurs with the ‘closed’ conformation of VgrG1, in which the three exposed loops protrude into the tube formed by the stacked hexamers of Hcp1 (Fig. 5*c*).

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2011-24615, BFU2014-55448-P

and CSD2009-00088) and the Regional Government of Madrid (S2010/BMD-2353). We thank the staff of the PROXIMA1 beamline at SOLEIL, France, the XALOC beamline at ALBA, Spain and the BM29 beamline at ESRF, France, and we are grateful to their local contacts for providing assistance in using the beamlines. We also thank Carlos Alfonso Botello and Juan Román Luque Ortega (CIB-CSIC, Madrid) for help with analytical centrifugation experiments. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under BioStructX-5959 (grant agreement No. 283570).

References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
- Bartonickova, L., Sterzenbach, T., Nell, S., Kops, F., Schulze, J., Venzke, A., Brenneke, B., Bader, S., Gruber, A. D., Suerbaum, S. & Josenhans, C. (2013). *Cell. Microbiol.* **15**, 992–1011.
- Basler, M. & Mekalanos, J. J. (2012). *Science*, **337**, 815.
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J. & Mekalanos, J. J. (2012). *Nature (London)*, **483**, 182–186.
- Bingle, L. E., Bailey, C. M. & Pallen, M. J. (2008). *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 3–8.
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H. & Mogk, A. (2009). *EMBO J.* **28**, 315–325.
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A. & Mogk, A. (2010). *Mol. Microbiol.* **76**, 815–821.
- Browning, C., Shneider, M. M., Bowman, V. D., Schwarzer, D. & Leiman, P. G. (2012). *Structure*, **20**, 326–339.
- Brunet, Y. R., Espinosa, L., Harchouni, S., Mignot, T. & Cascales, E. (2013). *Cell. Rep.* **3**, 36–41.
- Brunet, Y. R., Hénin, J., Celia, H. & Cascales, E. (2014). *EMBO Rep.* **15**, 315–321.
- Cascales, E. & Cambillau, C. (2012). *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 1102–1111.
- Cevc, G. (1995). *Biophys. Chem.* **55**, 43–53.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 12–21.
- Clemens, D. L., Ge, P., Lee, B.-Y., Horwitz, M. A. & Zhou, Z. H. (2015). *Cell*, **160**, 940–951.
- Cole, J. L. (2004). *Methods Enzymol.* **384**, 212–232.
- Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). *Science*, **304**, 242–248.
- Dauter, Z. (2003). *Acta Cryst.* **D59**, 2004–2016.
- Douzi, B., Spinelli, S., Blangy, S., Roussel, A., Durand, E., Brunet, Y. R., Cascales, E. & Cambillau, C. (2014). *PLoS One*, **9**, e86918.
- Durand, E., Derrez, E., Audoly, G., Spinelli, S., Ortiz-Lombardia, M., Raoult, D., Cascales, E. & Cambillau, C. (2012). *J. Biol. Chem.* **287**, 38190–38199.
- Durand, E., Nguyen, V. S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M.-S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujancourt, A., Roussel, A., Cambillau, C., Cascales, E. & Fronzes, R. (2015). *Nature (London)*, **523**, 555–560.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
- English, G., Byron, O., Cianfanelli, F. R., Prescott, A. R. & Coulthurst, S. J. (2014). *Biochem. J.* **461**, 291–304.
- Evans, P. R. & Murshudov, G. N. (2013). *Acta Cryst.* **D69**, 1204–1214.
- Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y. & Filloux, A. (2014). *J. Biol. Chem.* **289**, 17872–17884.
- Hachani, A., Lossi, N. S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jové, D. & Filloux, A. (2011). *J. Biol. Chem.* **286**, 12317–12327.
- Hood, R. D. *et al.* (2010). *Cell Host Microbe*, **7**, 25–37.
- Jobichen, C., Chakraborty, S., Li, M., Zheng, J., Joseph, L., Mok, Y.-K., Leung, K. Y. & Sivaraman, J. (2010). *PLoS One*, **5**, e12910.
- Joosten, R. P., te Beek, T. A. H., Krieger, E., Hekkelman, M. L., Hooft, R. W. W., Schneider, R., Sander, C. & Vriend, G. (2010). *Nucleic Acids Res.* **39**, D411–D419.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. & Rossmann, M. G. (2002). *Nature (London)*, **415**, 553–557.
- Kapitein, N. & Mogk, A. (2013). *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 52–58.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Kudryashev, M., Wang, R. Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., DiMaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E. H. & Basler, M. (2015). *Cell*, **160**, 952–962.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., Burley, S. K., Almo, S. C. & Mekalanos, J. J. (2009). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 4154–4159.
- Lim, Y. T., Jobichen, C., Wong, J., Limmathurotsakul, D., Li, S., Chen, Y., Raida, M., Srinivasan, N., MacAry, P. A., Sivaraman, J. & Gan, Y.-H. (2015). *Sci. Rep.* **5**, 8235.
- Lossi, N. S., Manoli, E., Förster, A., Dajani, R., Pape, T., Freemont, P. & Filloux, A. (2013). *J. Biol. Chem.* **288**, 7536–7548.
- Lupas, A. (1996). *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375–382.
- Macindoe, G., Mavridis, L., Venkatraman, V., Devignes, M.-D. & Ritchie, D. W. (2010). *Nucleic Acids Res.* **38**, W445–W449.
- Mason, J. M. & Arndt, K. M. (2004). *ChemBiochem*, **5**, 170–176.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Merrell, D. S. & Falkow, S. (2004). *Nature (London)*, **430**, 250–256.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. & Mekalanos, J. J. (2006). *Science*, **312**, 1526–1530.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 355–367.
- Murzin, A. G. (1993). *EMBO J.* **12**, 861–867.
- Pell, L. G., Kanelis, V., Donaldson, L. W., Howell, P. L. & Davidson, A. R. (2009). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 4160–4165.
- Pernot, P. *et al.* (2013). *J. Synchrotron Rad.* **20**, 660–664.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. & Mekalanos, J. J. (2007). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 15508–15513.
- Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. & Leiman, P. G. (2004). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 171–180.
- Ruiz, F. M., Santillana, E., Spínola-Amilibia, M., Torreira, E., Culebras, E. & Romero, A. (2015). *PLoS One*, **10**, e0129691.
- Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., LeRoux, M., Vollmer, W. & Mougous, J. D. (2011). *Nature (London)*, **475**, 343–347.
- Schuck, P. (2000). *Biophys. J.* **78**, 1606–1619.
- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J. & Leiman, P. G. (2013). *Nature (London)*, **500**, 350–353.
- Svergun, D. I. (1999). *Biophys. J.* **76**, 2879–2886.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H. & Nomura, N. (2013). *Microb. Environ.* **28**, 13–24.
- Uchida, K., Leiman, P. G., Arisaka, F. & Kanamaru, S. (2014). *J. Biochem.* **155**, 173–182.
- Van Duynne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1993). *J. Mol. Biol.* **229**, 105–124.
- Volkov, V. V. & Svergun, D. I. (2003). *J. Appl. Cryst.* **36**, 860–864.
- Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., De Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S. & Mougous, J. D. (2014). *Mol. Microbiol.* **92**, 529–542.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.
- Zheng, J. & Leung, K. Y. (2007). *Mol. Microbiol.* **66**, 1192–1206.
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C. & Cascales, E. (2014). *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1664–1673.