

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS 



**MECANISMO CATALÍTICO DE LA ARIL-ALCOHOL
OXIDASA DE *PLEUROTUS ERYNGII***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

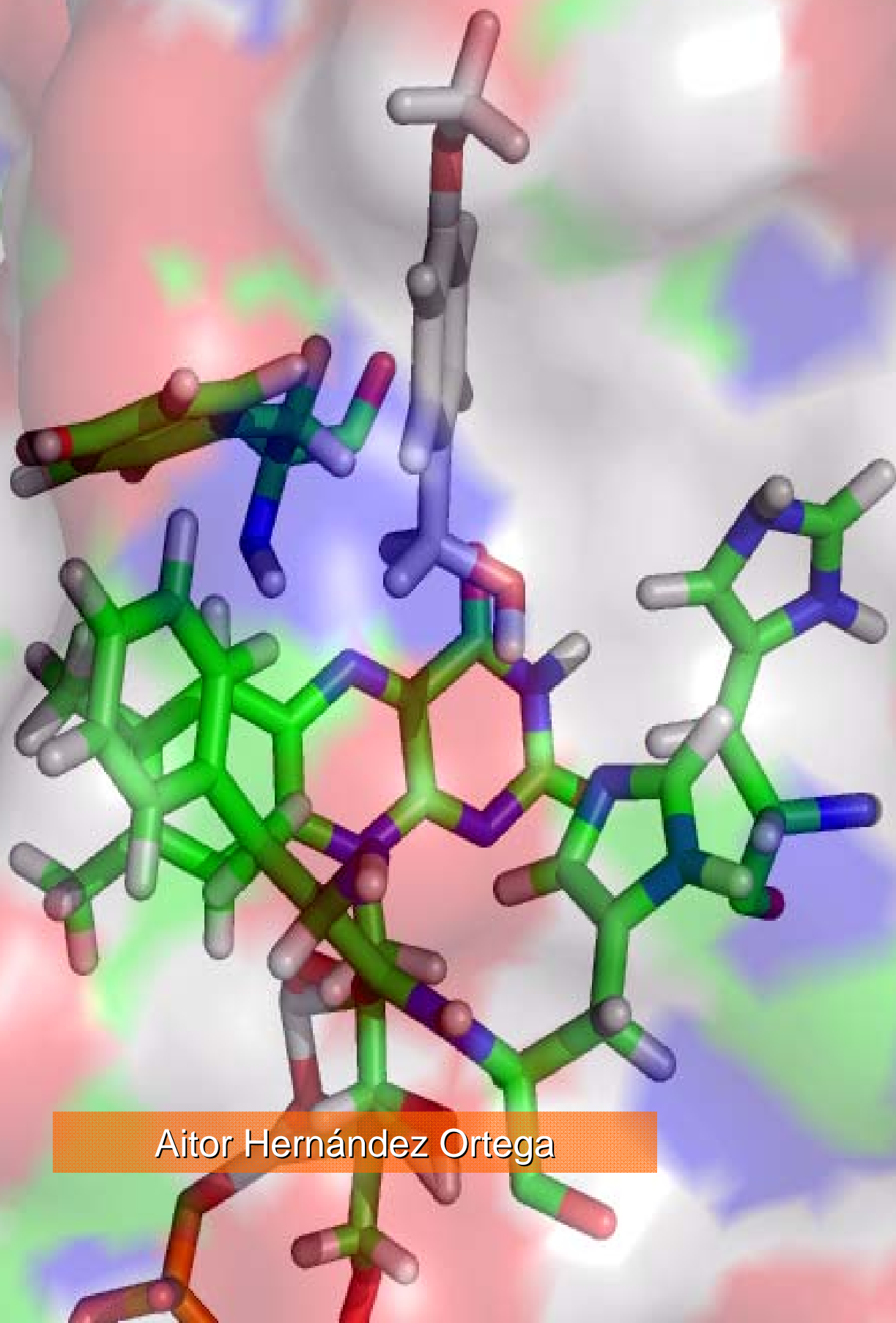
Aitor Hernández Ortega

Bajo la dirección de los doctores

Patricia Ferreira Neila
Ángel T. Martínez

Madrid, 2012

Mecanismo catalítico de la aril-alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii*



Aitor Hernández Ortega

Portada: Detalle del centro activo en la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) obtenido tras acoplamiento molecular del alcohol *p*-metoxibencílico con el programa *PELE* (disponible en <https://pele.bsc.es>). Se muestran varios residuos implicados en la catálisis y el cofactor de flavina.

MECANISMO CATALÍTICO DE LA ARIL-ALCOHOL OXIDASA DE *Pleurotus eryngii*

Aitor Hernández Ortega

TESIS DOCTORAL



Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid



Madrid, 2012

**MECANISMO CATALÍTICO DE
LA ARIL-ALCOHOL OXIDASA DE
*Pleurotus eryngii***

Tesis doctoral presentada por
Aitor Hernández Ortega para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Patricia Ferreira Neila
Profesor Ayudante Doctor
Universidad de Zaragoza

Ángel. T. Martínez
Profesor de Investigación
CIB, CSIC, Madrid

Madrid, Marzo de 2012

A mis padres
A mi hermana

A lesson learned is a lesson earned

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se ha llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid y durante una estancia predoctoral en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. Ha sido financiada a través de un Contrato de Personal Investigador de Apoyo de la Comunidad de Madrid (Ref: BOCM 3060/2006) así como por los proyectos “White biotechnology for added value products from renewable plant polymers: Design of tailor-made biocatalysts and new industrial bioprocesses” (BIORENEW; NMP2-CT-2006-026456-2) y "Novel and more robust fungal peroxidases as industrial biocatalysts" (PEROXICATS; KBBE-2010-4-265397).

Durante estos años han sido muchas las personas que han contribuido de forma directa o indirecta a la realización de esta tesis, a las cuales quisiera expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Ángel T. Martínez, director de esta tesis, por darme la oportunidad de trabajar junto a él en su grupo de investigación, aportando sus conocimientos y nuevas ideas que han permitido el desarrollo de este trabajo. Gracias por tu dedicación, paciencia y esfuerzo durante la escritura de los artículos y la tesis.

A la Dra. Patricia Ferreira, directora de esta tesis, por su esfuerzo y dedicación, y por compartir conmigo todos sus conocimientos de flavoenzimas. Gracias por tu ayuda, tanto a nivel profesional como personal a lo largo de estos años.

A la Dra. Milagros Medina por la cariñosa acogida en su grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza durante los seis meses de estancia, por su ayuda y buena disposición a la hora de diseñar nuevos experimentos y discutir los resultados.

A los Dres. Víctor Guallar, Kenneth Borrelli y Fátima Lucas del Centro de Supercomputación de Barcelona, por desarrollar todas las simulaciones computacionales que han sido fundamentales para la comprensión estructural y funcional de la AAO.

Al Dr. Pedro Merino, por sintetizar los alcoholes deuterados y realizar los análisis de HPLC quiral y polarimetría óptica.

A los Dres. Ana Gutiérrez y Jorge Rencoret por llevar a cabo los ensayos de GC-MS.

Al Dr. Jesús Jiménez Barbero por los análisis de NMR.

A las Dras. María Jesús Martínez y Alicia Prieto por su ayuda y buena disposición siempre que he requerido su ayuda.

Al Dr. Fco. Javier Ruiz Dueñas, por poner a punto los protocolos de expresión heteróloga, activación *in vitro* y purificación de la AAO, indispensables para este trabajo.

A la Dra. Covadonga Vázquez, tutora de esta tesis, por su ayuda con los trámites universitarios.

A todos mis compañeros de laboratorio por haberme escuchado y aguantado a lo largo de estos años, sobre todo durante el final de la tesis. Gracias a los Dres. Miguel Jurado y Rosario Díaz por vuestra amistad y porque a pesar de que no estamos juntos, sé que puedo contar con vosotros. A Davinia por su amistad, amor y momentos felices a lo largo de todos estos años. A Vero y Elena por ser las mejores compañeras y amigas que hubiera podido desear. A Lola por su amistad y por estar a mi lado durante el final de la tesis. A Isabel Pardo, por su amistad y por contar siempre conmigo. A Isabel Vicente porque aunque haya sido la segunda, siempre va a ser chica muy especial. A Mario Saparrat por su amistad y los inolvidables momentos compartidos en el laboratorio y en casa. A Úrsula, por contagiarme su energía y ganas de cambiar las cosas. A Mariu, porque gracias a un viaje a Finlandia descubrí que es una chica increíble. A Xiomara por tantos momentos felices en nuestra casa y en el laboratorio. A Laura por nuestras tertulias sobre música y libros. A Jesús por contagiarme su visión optimista de la vida. A Esteban por su amistad. Thanks to Yuta Miki for his friendship, scientific discussions and the funny moments that we shared, and to Craig and Deborah for their friendship and for sharing historical moments as the 2010 World Cup football final. A aquellos que fueron esenciales durante mis comienzos en el CIB: Ana, Eva, María y Elvira, gracias a todas por vuestra acogida. A las Dras. Susana, Marta y Mariela por su ayuda y apoyo. A Maria José por su ayuda. Y a muchos otros a que estáis o habéis pasado en el CIB: Celia, Pili, Gisela, Lola, Adrián, Ángeles, David, Víctor, José María, Elda, Bea, Atef, Houde, Adnen, Belén, Leandro, Rober y Raúl.

A Juan, suerte con tus futuros experimentos con la AAO, espero que esta tesis te sea de ayuda.

A mis amigos de los laboratorios vecinos: Antonio, Juan Fran, Mario, Dani, Erika, Laura, Areti, Anne y América, gracias por los buenos momentos en vuestro laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos de la Universidad de Zaragoza: Ana Sánchez, Sonia, Beatriz, Renzo, Ana Serrano, Raquel, Jorge, Patricia, José Ramón, Isaías y Laura, gracias por vuestro cariño y por tanto buenos momentos que hemos compartido fuera del laboratorio. Agradecer en especial a José Ramón Peregrina y Ana Sánchez su ayuda y paciencia con los ensayos de cinética rápida en anaerobiosis y potenciales redox. A Beatriz Herguedas por compartir tantos momentos de su tesis conmigo, repartidos entre Madrid y Zaragoza. Y de nuevo a los Dres. Carlos Gómez y Milagros Medina por acogerme en su grupo de investigación.

Y por último, a mi familia por todo su apoyo y confianza a lo largo de estos años. A mis padres Ángel y María Jesús por su amor incondicional y porque siempre han estado al otro lado del teléfono. Y a mi hermana Eva, por ofrecerme siempre su visión de las cosas y por toda su ayuda y apoyo durante mi estancia en Zaragoza.

ABREVIATURAS

AAO	aril-alcohol oxidasa
AAD	aril-alcohol deshidrogenasa
k_{app}	constante cinética aparente
CHO	colina oxidasa
δ_H	desplazamiento químico del protón
D ₂ O	agua deuterada
k^D	efecto isotópico cinético del sustrato
k^{D_2O}	efecto isotópico cinético del solvente
k^{D,D_2O}	efecto isotópico cinético simultáneo
DMS	dimetilsulfóxido
EC	número de identificación de la enzima
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ϵ	coeficiente de extinción molar
FAD	flavín-adenín-dinucleótido
FMN	flavín-mononucleótido
GC/MS	cromatografía de gases/espectroscopía de masas
GMC	familia de glucosa-metanol-colina oxidasas
GO	glucosa oxidasa
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	peroxidasa de rábano
Hid	histidina neutra protonada en δ
Hie	histidina neutra protonada en ϵ
Hip	histidina doblemente protonada
k_{cat}	constante catalítica
K_d	constante de disociación
K_i	constante de inhibición
KIE	efecto isotópico cinético
K_m	constante de Michaelis
$K_{m(Al)}$	constante de Michaelis para el alcohol
$K_{m(Ox)}$	constante de Michaelis para el oxígeno
k_{red}	constante de reducción
k_{ox}	constante de reoxidación
LiP	lignina peroxidasa
MD	dinámica molecular
MnP	manganeso peroxidasa
NAD(P)H	nicotín-adenin dinucleótido (fosfato)
NMR	resonancia magnética nuclear
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
<i>PELE</i>	programa <i>Protein Energy Landscape Exploration</i>
PDB	base de datos de proteínas
QM/MM	mecánica cuántica/mecánica molecular
rmsd	raíz cuadrada de la desviación cuadrática media
UV	ultravioleta
VP	peroxidasa versátil

RESUMEN

Durante la degradación de la lignina por *Pleurotus eryngii* la enzima extracelular aril-alcohol oxidasa (AAO) genera el H₂O₂ que actúa como sustrato oxidante de las peroxidasas ligninolíticas y para la formación del radical hidroxilo. El poder reductor para la activación del O₂ a H₂O₂ proviene de la oxidación de alcoholes aromáticos a los correspondientes aldehídos, siendo el alcohol *p*-metoxibencílico el sustrato natural de la AAO de *P. eryngii*. Esta oxidasa es una flavoenzima que contiene como cofactor una molécula de FAD unida de forma no covalente. Durante el presente trabajo se han estudiado en profundidad el mecanismo catalítico y las relaciones estructura-función de la AAO. Todo ello ha sido posible gracias a la disponibilidad de la estructura cristalográfica de esta oxidasa y de un protocolo de expresión heteróloga en *Escherichia coli* y activación *in vitro* de la enzima.

El mecanismo catalítico de la AAO se estudió empleando sustratos α -deuterados y agua deuterada como solvente de la reacción. Durante la semi-reacción de reducción tiene lugar un proceso concertado (es decir, sin formación un intermediario estable) de transferencia de hidruro, desde el carbono- α del alcohol al N5 de la flavina, y de protón, desde el hidroxilo del alcohol a la base catalítica. Este mecanismo es diferente del mecanismo secuencial (no-concertado) observado en otras oxidorreductasas de la superfamilia GMC. Empleando las formas α -monodeuteradas del alcohol *p*-metoxibencílico se encontró que la transferencia de hidruro es un proceso estereoselectivo, que viene determinado por la posición del sustrato en el centro activo de la AAO.

Debido a que se había observado previamente que la AAO es también capaz de oxidar algunos aldehídos aromáticos, se estudió en detalle la oxidación de estos compuestos combinando diferentes técnicas experimentales. Se observó que la enzima únicamente es capaz de oxidar aldehídos aromáticos en su forma *gem*-diol. Esta característica explicó por qué la presencia de sustituyentes electrofílicos en el anillo aromático (que promueven la hidratación del carbonilo) favorecía la oxidación, y así mismo, explicó la diferente especificidad de la AAO por ambos tipos de sustratos (alcohol vs aldehído). Además, se postuló que el mecanismo de oxidación de la forma *gem*-diol de los aldehídos es similar al mecanismo de oxidación de los alcoholes, donde participa una base catalítica, activando el sustrato a través de la abstracción del protón de uno de los grupos hidroxilo de la forma *gem*-diol.

Posteriormente, se combinaron técnicas experimentales y computacionales para investigar diferentes aspectos del mecanismo y las relaciones estructura-función en la AAO. En primer lugar se estudió la migración del alcohol al centro activo, escasamente accesible desde el

solvente, identificando los residuos que actúan como puerta de entrada del canal hidrofóbico de la enzima y aquellos que participan en el proceso de migración (Tyr92/Phe397/Phe501). Una vez en el centro activo, el sustrato adoptó una posición catalítica coincidente con la identificada experimentalmente usando isómeros α -monodeuterados del alcohol, es decir, con el hidrógeno que se transfiere (pro-*R*) próximo al N5 de la flavina. A través de los estudios de mutagénesis dirigida, estado de protonación y perfiles energéticos teóricos, se concluyó que la His502 actúa como la base catalítica responsable de la abstracción del protón del grupo hidroxilo del alcohol (facilitando la posterior transferencia de hidruro a la flavina) mientras que la His546 facilita el correcto posicionamiento del sustrato en el centro activo. Los perfiles energéticos de la reacción obtenidos mediante simulaciones de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) mostraron que, a pesar de que la transferencia de protón e hidruro son procesos altamente acoplados (concertados), la abstracción del protón por la His502 es previa a la transferencia de hidruro (mecanismo concertado no-sincrónico). También, se estudió la segunda semi-reacción del ciclo catalítico de la AAO. La migración del O₂ mostró que esta molécula accede al centro activo a través del mismo canal hidrofóbico empleado por los alcoholes, pero en este caso sin que se requieran reajustes significativos de las cadenas laterales de los residuos del canal. Durante esta semi-reacción el oxígeno es primero reducido a anión superóxido mediante la transferencia de un electrón desde la flavina reducida. Durante esta etapa, la His502H⁺ actúa como ácido, facilitando la formación y posterior estabilización del anión superóxido, mientras que el residuo Phe501 facilita el correcto posicionamiento del O₂ junto al *locus* C4a-N5 de la flavina. Esta semi-reacción incluye la transferencia de un segundo electrón desde la forma semiquinona de la flavina y dos protones desde el N5H y la His502 al anión superóxido dando lugar al H₂O₂ (aunque sólo la primera transferencia es parcialmente limitante en la reoxidación). Finalmente se encontró que la estereoselectividad de la AAO en la transferencia de hidruro desde la posición pro-*R* en el carbono- α del alcohol (mostrada utilizando los enantiómeros (*R*) y (*S*) del alcohol *p*-metoxibencílico α -deuterado) se mantiene durante la oxidación de alcoholes secundarios por la enzima nativa, y especialmente por la variante F501A con el centro activo ampliado. Este resultado (confirmado mediante cromatografía quiral) revela el interés biotecnológico de esta oxidasa no solo por su contribución en la degradación de la lignina y la síntesis de aromatizantes, sino también por su mecanismo de oxidación.

ÍNDICE

	pág
Introducción	1
1. Flavoenzimas	1
1.1 Características generales y clasificación	1
1.2 Mecanismos de deshidrogenación	6
1.3 Mecanismos de reoxidación	7
2. La enzima aril-alcohol oxidasa (AAO) de <i>Pleurotus eryngii</i>	9
Estructura y Objetivos	11
Lista de publicaciones	12
CAPÍTULO 1. La aril-alcohol oxidasa fúngica: una flavoenzima productora de peróxido implicada en la degradación de lignina	15
Resumen	15
1. Importancia de la lignina en el reciclado natural y el empleo industrial de la biomasa vegetal	16
2. Superando la barrera de la lignina: dos estrategias diferentes basadas en el H ₂ O ₂	17
3. AAO y otras enzimas productoras de H ₂ O ₂ implicadas en la degradación de la lignina	19
4. AAO: un miembro de la superfamilia de oxidorreductas GMC	22
5. Aspectos generales de la estructura-función de la AAO comparadas con otras flavoproteínas GMC	26
6. Respuestas recientes a algunas preguntas antiguas sobre la catálisis de la AAO	28
6.1 Naturaleza y papel de la base catalítica en la AAO (y otras oxidorreductas GMC)	30
6.2 Especificidad opuesta de la AAO frente a los alcoholes y los aldehídos aromáticos	31
7. Interés biotecnológico de la AAO: síntesis de aromatizantes y estereoselectividad enzimática	34
8. Bibliografía	38

CAPÍTULO 2. La aril-alcohol oxidasa implicada en la degradación de lignina: un estudio del mecanismo basado en cinéticas de estado estacionario y transitorio y efectos isotópicos cinéticos primarios y del solvente con dos alcoholes como sustratos 51

Resumen	51
1. INTRODUCCIÓN	52
2. MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1 Reactivos	53
2.2 Producción de la enzima recombinante	53
2.3 Espectros y parámetros cinéticos de estado transitorio	54
2.4 Estudios de inhibición	55
2.5 Medidas cinéticas en flujo detenido	56
2.6 KIE del sustrato y del solvente	57
3. RESULTADOS	58
3.1 Oxidación de alcoholes por la AAO en estado estacionario	58
3.2 Inhibición de la AAO por ácido <i>p</i> -anísico	59
3.3 Dependencia del pH para la actividad de la AAO	59
3.4 Estado redox del cofactor durante la catálisis	61
3.5 Semi-reacción de reducción	62
3.6 KIE del sustrato y del solvente	65
4. DISCUSIÓN	69
5. BIBLIOGRAFIA	74

CAPÍTULO 3. Difusión y oxidación del sustrato en oxidorreductasas GMC: un estudio experimental y computacional de la aril-alcohol oxidasa 79

Resumen	79
1. INTRODUCCIÓN	80
2. MATERIALES Y MÉTODOS	81
2.1 Enzima y variantes mutadas	81
2.2 Cinéticas de estado estacionario y transitorio	82
2.3 Adecuación de los modelos de la AAO y la CHO	84
2.4 Exploración dinámica de ligando y proteína: <i>PELE</i>	85
2.5 Predicción de protonación y cálculos MD	85
2.6 Cálculos QM/MM	86
3. RESULTADOS	87

3.1 Migración de ligandos hasta el centro activo de la AAO	87
3.2 Mutagénesis de las histidinas del centro activo: parámetros cinéticos y perfiles de pH	91
3.3 Estados de protonación de His502, His546 y otros residuos del centro activo	93
3.4 Análisis QM/MM de las reacciones enzimáticas de la AAO y la CHO	96
4. DISCUSIÓN	100
4.1 Difusión del sustrato al centro activo de la AAO	100
4.2 Mecanismo concertado no-sincrónico en la oxidación de alcoholes por la AAO	100
4.3 Mecanismo catalítico en oxidorreductasas GMC: una comparación entre la CHO y la AAO	102
5. BIBLIOGRAFIA	105

CAPÍTULO 4. Transferencia de hidruro estereoselectiva en la aril-alcohol oxidasa, un miembro de la superfamilia GMC 111

Resumen	111
1. INTRODUCCIÓN	112
2. MATERIALES Y MÉTODOS	113
2.1 Compuestos químicos	113
2.2 Síntesis de compuestos deuterados	113
2.3 Enzima nativa y variante	114
2.4 Cinéticas de estado estacionario y transitorio	114
2.5 KIE para la oxidación del alcohol <i>p</i> -metoxibencílico	115
2.6 Oxidación de alcoholes secundarios	116
2.7 HPLC quiral y rotación óptica	117
2.8 Cálculos QM/MM	117
3. RESULTADOS	117
3.1 Oxidación del alcohol <i>p</i> -metoxibencílico α -deuterado por la AAO ..	117
3.2 KIE del solvente durante la oxidación del alcohol por la AAO	122
3.3 Cálculos QM/MM y <i>stacking</i> molecular del alcohol en el centro activo	123
3.4 Oxidación de alcoholes aromáticos secundarios	125
4. DISCUSIÓN	129

4.1 Mecanismo de oxidación por la AAO, un miembro de la superfamilia GMC	129
4.2 Estereoselectividad sobre alcoholes arílicos primarios (y secundarios)	130
4.3 Bases estructurales de la catálisis y la estereoselectividad en la AAO	132
5. BIBLIOGRAFIA	134

CAPÍTULO 5. Caracterización cinética y química de la oxidación de aldehídos por la aril-alcohol oxidasa fúngica 139

Resumen	139
1. INTRODUCCIÓN	140
2. MATERIALES Y MÉTODOS	142
2.1 Reactivos y enzimas comerciales	142
2.2 Producción de la AAO	142
2.3 Caracterización cinética en estado estacionario	143
2.4 Estudios de GC-MS	143
2.5 Espectroscopía de NMR	144
2.6 Caracterización cinética de estado transitorio	144
2.7 Caracterización espectrofotométrica de los complejos AAO-ácido ..	145
3. RESULTADOS	146
3.1 Actividad aldehído oxidasa durante la oxidación de alcoholes	146
3.2 Oxidación de los aldehídos por la AAO en estado estacionario	148
3.3 Identificación de los productos de oxidación de los aldehídos mediante GC-MS	150
3.4 Análisis de las formas <i>gem</i> -diol de los aldehídos mediante NMR	150
3.5 Oxidación de aldehídos bencílicos por la aldehído deshidrogenasa de levadura	154
3.6 Estudios mediante la técnica de flujo detenido	155
3.7 Caracterización espectrofotométrica de los complejos de la AAO con ácidos aromáticos	158
4. DISCUSIÓN	160
4.1 Actividad aldehído oxidasa de la AAO: hidratación de aldehídos y oxidación enzimática	160
4.2 Mecanismo de oxidación de aldehídos por la AAO	161

4.3 La AAO es una oxidasa versátil que proporciona peróxido para la biodegradación de la lignina	163
5. BIBLIOGRAFIA	164

CAPÍTULO 6. Modulación de la reactividad del O₂ en una flavoenzima fúngica: implicación de la Phe501 de la aril-alcohol oxidasa contigua a la histidina catalítica

Resumen	169
1. INTRODUCCIÓN	170
2. MATERIALES Y MÉTODOS	172
2.1 Enzima nativa y variantes mutadas	172
2.2 Cinéticas de estado estacionario	172
2.3 Medidas de estado transitorio	173
2.4 Exploración dinámica de proteína y ligando	174
3. RESULTADOS	175
3.1 Difusión del sustrato al centro activo de la AAO	175
3.2 Cinéticas de estado estacionario de las variantes mutadas en la Phe501	178
3.3 Cinéticas de estado transitorio de las variantes mutadas en la Phe501	180
3.4 Mutaciones de la Phe501 y difusión del O ₂ dentro del centro activo	185
4. DISCUSIÓN	185
4.1 Difusión del O ₂ hasta el centro activo de la AAO	185
4.2 Implicación de la Phe501 en la reoxidación de la flavina	188
5. BIBLIOGRAFIA	191

CAPÍTULO 7. Discriminando la función de dos residuos de histidina del centro activo en la catálisis de la AAO: un estudio mediante mutagénesis dirigida, efectos isotópicos y cálculos QM/MM

Resumen	197
1. INTRODUCCIÓN	198
2. MATERIALES Y MÉTODOS	200
2.1 Enzima y variantes mutadas	200
2.2 Cinéticas de estado estacionario y dependencia del pH	201
2.3 Cálculo del KIE para las constantes cinéticas de estado estacionario	202
2.4 Cinéticas de estado transitorio y estado redox durante el <i>turnover</i>	203

2.5 Configuración del sistema para los estudios computacionales	204
2.6 Simulaciones QM	204
2.7 Simulaciones QM/MM	205
3. RESULTADOS	206
3.1 Producción y características espectrales de las variantes de histidina	206
3.2 Constantes de estado estacionario para el alcohol y el oxígeno	206
3.3 Dependencia de la actividad respecto al pH	208
3.4 Cambios en el estado redox del cofactor durante el <i>turnover</i>	209
3.5 Semi-reacción de reducción	212
3.6 Semi-reacción de oxidación	213
3.7 Estudios de KIE	214
3.8 Cálculos QM	220
3.9 Cálculos QM/MM	221
4. DISCUSIÓN	225
4.1 Residuos conservados en el centro activo de las oxidorreductasas GMC	225
4.2 Posición de los sustratos (alcohol y O ₂) y los residuos de histidina en el centro activo de la AAO	226
4.3 Mecanismo de oxidación del alcohol	226
4.4 Mecanismo de reducción del O ₂	229
5. BIBLIOGRAFÍA	237
CAPÍTULO 9. Discusión general	239
Acceso de los sustratos al centro activo de la AAO	239
Reducción concertada no sincrónica	239
Residuos de histidina conservados y semi-reacción de reducción	240
Transferencia de hidruro estereoselectiva	240
Oxidación de aldehídos por la AAO	241
Mecanismo de la semi-reacción de oxidación y residuos implicados	241
Desracemización de alcoholes quirales	242
CONCLUSIONES	243
BIBLIOGRAFÍA	245
MATERIAL SUPLEMENTARIO	269

Introducción

1. Flavoenzimas

1.1 Características generales y clasificación

Las flavoenzimas están implicadas en una variedad de procesos redox, tales como deshidrogenación de diferentes compuestos, procesos de transferencia de uno o dos electrones, emisión de luz, y reducción del oxígeno en reacciones de oxidación o hidroxilación. El cofactor puede estar en forma de mononucleótido de flavina (FMN) o bien como dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (**Figura 1**). En ambos casos, la parte reactiva del cofactor corresponde al anillo de 7,8-dimetilisolaxacina (flavina). Los lados *re* y *si* de la flavina son dos términos utilizados para referirse a cada una de las dos caras del anillo. El lado-*re* es aquel en el que el anillo de benceno queda a la izquierda de la molécula de forma que el N(10) queda en la parte inferior (**Figura 2**).

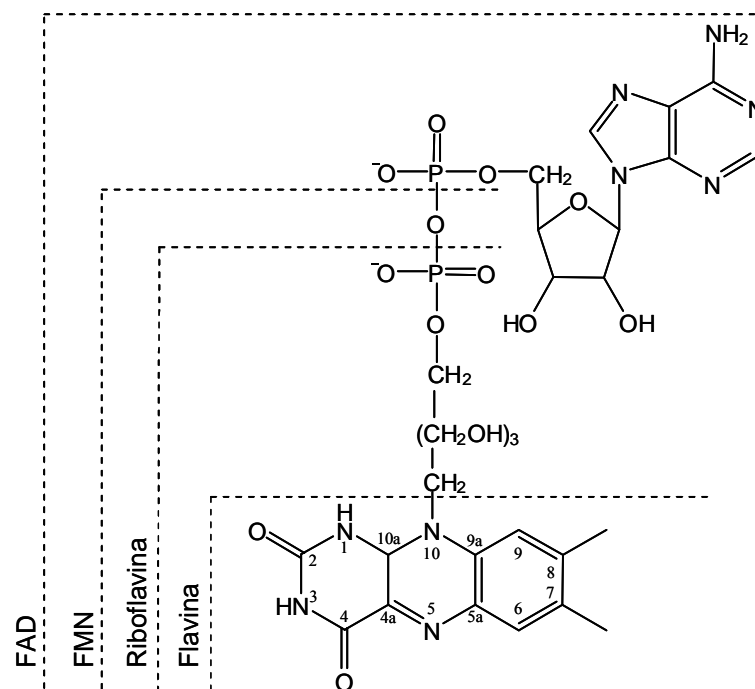


Figura 1. Estructura química del cofactor de flavina.

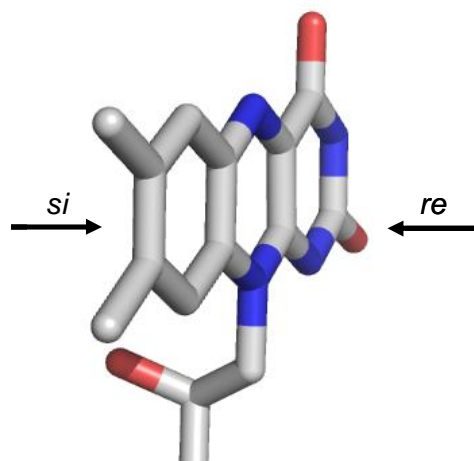


Figura 2. Lados *re* y *si* del anillo de isoaloxazina.

Las propiedades químicas del cofactor dependen exclusivamente de la 7,8-dimetilisoaloxazina, mientras que el resto de la molécula actúa normalmente como anclaje a la proteína (Ghisla y Massey, 1989). Este anillo de isoaloxazina puede encontrarse en tres estados de óxido-reducción – totalmente oxidado (quinona), semiquinona y totalmente reducido (hidroquinona) – cada uno de los cuales puede encontrarse a su vez en tres estados de ionización. Aunque las apoenzimas unen preferentemente ciertos estados de óxido-reducción y de ionización, los equilibrios que se pueden encontrar en el intervalo de pH fisiológico son los mostrados en la **Figura 3A**.

El proceso de óxido-reducción de la flavina tiene lugar de forma reversible, bien a través de la transferencia conjunta de dos electrones o bien por dos transferencias sucesivas de un solo electrón, mediante una serie de cambios químicos que afectan a los átomos N1, C4a y N5 del anillo de isoaloxazina (Ghisla y Massey, 1989). Si bien los estados completamente oxidado y completamente reducido son generalmente intermediarios catalíticos obligados, la forma semiquinona (que se puede encontrar durante la fotorreducción en presencia de EDTA) es raramente detectable durante el ciclo catalítico de la mayoría de las flavooxidasas. El descenso de absorbancia de la banda-I de la flavina (450-470 nm) durante la reducción del cofactor, así como las diferencias en el espectro de absorción de los diferentes estados redox o de ionización de la flavina (**Figura 3B**) son una propiedad esencial para la caracterización de las flavoproteínas.

El potencial de la reducción de dos electrones de la flavina libre es de -200 mV, sin embargo, este valor puede variar significativamente entre distintas flavoenzimas, en un rango de -400 mV a +60 mV. En general, la proximidad de cargas positivas incrementa el potencial redox, mientras que las cargas negativas o un entorno hidrofóbico producen un efecto opuesto (Fraaije y Mattevi, 2000).

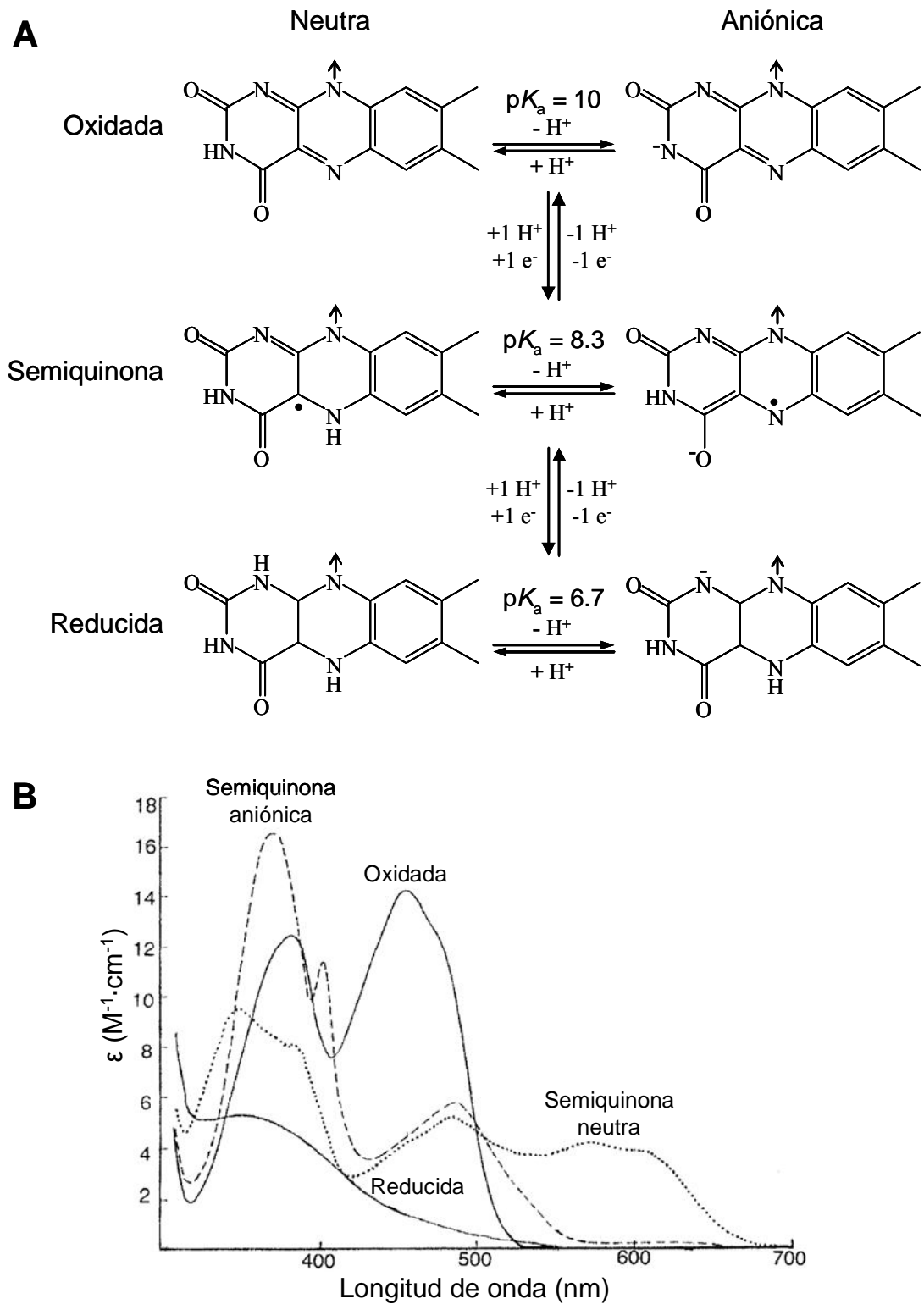


Figura 3. **Estados redox y de ionización del cofactor de flavina.** (A) Estructuras de la flavina en función de su estado redox o de ionización. Adaptado de Mayhew (1999). (B) Espectros de absorción los diferentes estados redox/ionización del cofactor. Adaptado de Massey (2000).

Las reacciones catalizadas por flavoenzimas implican siempre una primera semi-reacción de reducción donde un sustrato o donador de electrones produce la reducción del cofactor, y una segunda semi-reacción de oxidación, donde un segundo sustrato o aceptor de electrones reoxida la flavina (**Figura 4**). En la mayoría de los casos, ambas semi-reacciones pueden estudiarse por separado, una característica que ha permitido el estudio detallado del ciclo catalítico de distintas flavoenzimas (Ghisla y Massey, 1989; Fraaije y Mattevi, 2000). Tal y como se muestra en la **Figura 4**, la reoxidación de la enzima puede ocurrir cuando el primer producto de la reacción se encuentra aún unido al centro activo (mecanismo cinético con formación de un complejo ternario) o bien tras su liberación (mecanismo cinético ping-pong). El primer mecanismo es característico de la colina oxidasa (EC. 1.1.3.17) (Gadda, 2003) mientras que el segundo es típico de la glucosa oxidasa (EC. 1.1.3.4) (Gibson *et al.*, 1964). El mecanismo cinético de ambas se ha caracterizado combinando estudios cinéticos de estado estacionario (permite obtener las constantes cinéticas macroscópicas) y estado transitorio (permite estudiar las semi-reacciones por separado y establecer las constantes microscópicas de cada semi-reacción).

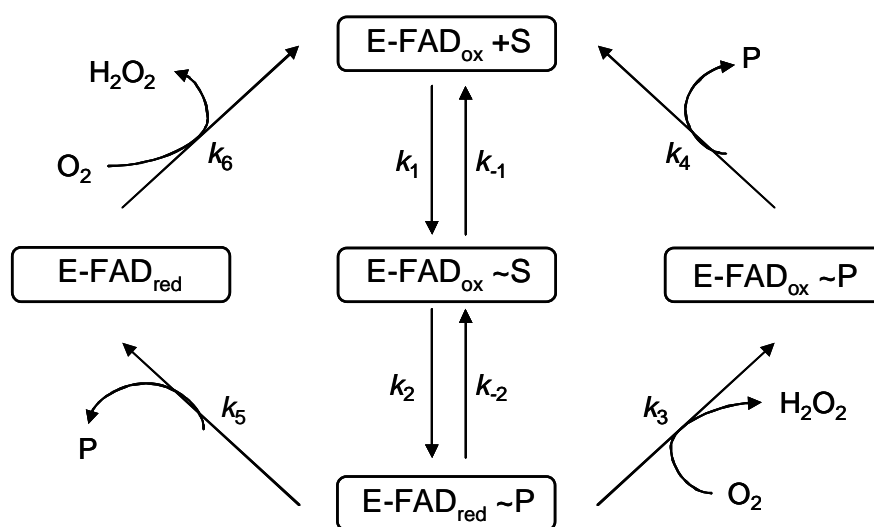


Figura 4. **Esquema general del mecanismo cinético en flavooxidasas.** Se muestran las constantes microscópicas asociadas a las semi-reacciones de reducción (centro) y oxidación para un mecanismo cinético ping-pong (izquierda) o ternario (derecha). Flavoenzima oxidada ($E-FAD_{ox}$) flavoenzima reducida ($E-FAD_{red}$) sustrato (S) y producto (P). Adaptado de Fraaije y van Berkel (1997).

Tradicionalmente las flavoenzimas se han clasificado en función de las reacciones que catalizan, su reactividad frente al oxígeno, la existencia de formas intermedias de reducción de la flavina y la forma en que se transfieren los electrones (Massey y Hemmerich, 1980):

Clase 1: Transhidrogenasas

Catalizan la transferencia de dos electrones entre diferentes átomos de sustratos orgánicos, concretamente entre: carbono-carbono (por ejemplo, piridina transhidrogenasa, EC 1.6.1.2), carbono-azufre (por ejemplo, glutatión reductasa 1.8.1-), carbono-nitrógeno y nitrógeno-nitrógeno.

Clase 2: Deshidrogenasas/oxidasas

Las enzimas de esta clase combinan la deshidrogenación de un sustrato con la reducción del oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno, transfiriendo dos electrones durante la reacción. También se conocen como oxidasas clásicas, entre las que se encuentran la glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.3) o la colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6).

Clase 3: Deshidrogenasas/monooxigenasas

A diferencia de la clase anterior, tras la reducción de la enzima por NAD(P)H, se forma un intermediario estable de tipo hidroperóxido en el C4a de la flavina. Posteriormente, uno de los átomos de oxígeno se incorpora al sustrato orgánico y el otro se reduce para dar H₂O. Un típico ejemplo de esta clase es la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (EC 1.14.13.2).

Clase 4: Deshidrogenasas/electrón-transferasas

Las enzimas de esta clase llevan a cabo la deshidrogenación y transferencia de dos electrones al cofactor, para posteriormente transferir ambos electrones de forma secuencial (originando intermediarios de tipo semiquinona) a aceptores de un solo electrón como citocromos o proteínas hierro-azufre. Son características de esta clase las enzimas que participan en cadenas de transporte de electrones, como por ejemplo la succinato deshidrogenasa (1.3.5.1).

Clase 5: Reductasas/electrón-transferasas

Las proteínas de esta clase pueden recibir los electrones de uno en uno y, una vez reducidas, transferir simultáneamente ambos electrones al aceptor, o bien, aceptar ambos electrones simultáneamente para transferirlos posteriormente de uno en uno. El mejor ejemplo de esta clase es la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (EC 1.18.1.2).

Clase 6: Electrón-transferasas puras

En las proteínas de esta clase la flavina se reduce u oxida mediante la transferencia de un solo electrón, dando lugar al intermediario semiquinona. Los mejores ejemplos de esta clase son las flavodoxinas o la DNA fotoliasa (EC 4.1.99.3) que participa en la reparación de los dímeros de pirimidina del DNA.

1.2 Mecanismos de deshidrogenación

Las flavoenzimas son responsables de la deshidrogenación de una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran: ditiolos, nucleótidos de nicotinamida, alcoholes, α -hidroxiácidos, aminas y α -aminoácidos (Massey y Hemmerich, 1980). El mecanismo de oxidación conlleva la ruptura de un enlace C-H (de ahí el nombre de deshidrogenaciones), la transferencia de dos electrones del sustrato a la flavina y la formación de un doble enlace en el producto oxidado. Se ha observado, generalmente, que el enlace C-H susceptible de ser atacado se orienta hacia a los átomos N5-C4a de la flavina, así como la existencia de un grupo activante adyacente que facilita la reacción (Fraaije y Mattevi, 2000).

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la reacción de deshidrogenación (Ghisla y Massey, 1989; Fraaije y Mattevi, 2000) (**Figura 5**):

- *Transferencia de hidruro*: La reacción implica la transferencia simultánea de dos electrones y un protón (anión hidruro) desde el grupo C-H al N5 de la flavina. Este mecanismo ha sido estudiado en la colina oxidasa (1.1.3.17) (Gadda, 2008).

- *Mecanismo radicalario*: La ruptura del enlace C-H tiene lugar mediante la liberación de un átomo de hidrógeno (un protón y un electrón), lo que da lugar a la formación del radical del sustrato y el radical semiquinona de la flavina. Posteriormente se forma la flavina reducida y el producto de oxidación, a través de la transferencia de un segundo electrón. Se ha postulado este mecanismo para la monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4) (Silverman *et al.*, 1980).

- *Mecanismo carbaniónico*: Requiere la existencia de una base catalítica responsable de abstraer un protón del grupo C-H del sustrato, originándose una forma carbaniónica del sustrato. Este carbanión transfiere dos electrones directamente a la flavina o, alternativamente, a través de la formación de un aducto. Este mecanismo lo presentan enzimas que catalizan la deshidrogenación de α -hidroxiácidos como por ejemplo la glicolato oxidasa (EC 1.1.3.15) (Massey, 2000).

Para muchas de las flavoenzimas se ha propuesto el mecanismo de transferencia de hidruro, sin embargo no existe un mecanismo consenso para algunas de ellas, como por ejemplo para el flavocitocromo b2 o la D-aminoácido oxidasa (Ghisla y Massey, 1989; Lederer *et al.*, 1996).

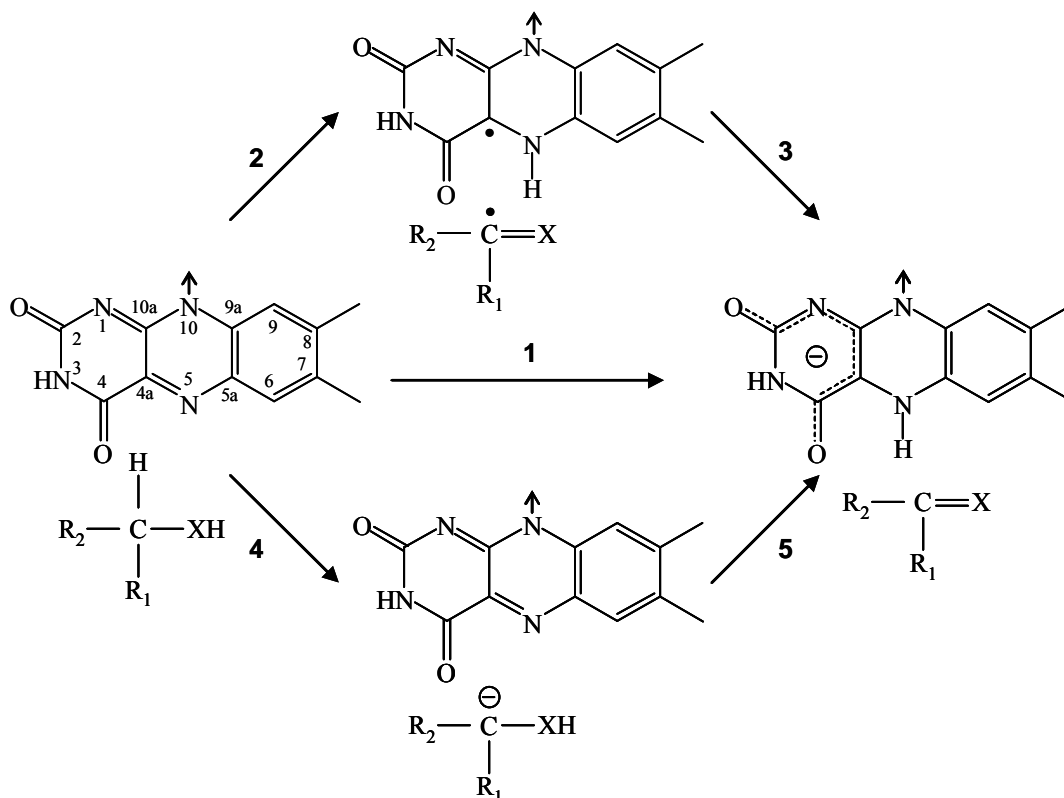


Figura 5. Posibles mecanismos de las reacciones de deshidrogenación catalizadas por flavoenzimas. Se incluye transferencia de hidruro (1), mecanismo radicalario (2 y 3), y mecanismo carbaniónico (4 y 5). La molécula del sustrato incluye un carbono (C) como centro de ataque oxidativo, un grupo activante (XH) y dos sustituyentes genéricos (R_1 y R_2). Adaptado de Fraaije y Mattevi (2000).

1.3 Mecanismos de reoxidación

El oxígeno molecular reacciona con la forma hidroquinona de la flavina (tras su reducción de dos electrones). Esta reacción está restringida por la diferencia en el *spin* de ambas moléculas, ya que el oxígeno se encuentra en estado triplete mientras que la flavina reducida se encuentra en forma singlete, y por tanto no es posible la reoxidación directa de la flavina mediante la transferencia de dos electrones al oxígeno. Como consecuencia, la reoxidación tiene lugar mediante dos transferencias de un solo electrón a través de diferentes mecanismos (Massey, 1994; Mattevi, 2006). Los más representativos se ilustran en la **Figura 6**. La transferencia del primer electrón desde la flavina reducida al oxígeno da lugar a la formación del radical superóxido y del radical semiquinona de la flavina (forma semi-reducida aniónica de un solo electrón). A continuación, la reacción puede seguir diferentes vías: (i) la liberación del radical superóxido; (ii) la transferencia directa de un segundo electrón (y dos hidrógenos) dando lugar al peróxido de hidrógeno y la flavina oxidada; (iii) la formación de un aducto covalente entre el superóxido y la flavina (C4a-

hidroperóxido). Posteriormente el aducto hidroperóxido de flavina puede disociarse para formar peróxido de hidrógeno o bien transferir un átomo de oxígeno a otro sustrato (y liberar una molécula de agua) como en el caso de las enzimas de la clase deshidrogenasa/monooxigenasa.

El primer paso de la reacción de oxidación, la formación de los radicales semiquinona/superoxido, es el paso limitante. Se ha observado que la presencia de cargas positivas y la polarización del centro activo contribuyen a la formación y estabilización del par de radicales (Su y Klinman, 1999; Roth y Klinman, 2003; Roth *et al.*, 2004). Existen varios ejemplos de enzimas cuyas cargas positivas en el centro activo están contribuyendo a incrementar la reactividad frente al oxígeno: (i) la protonación de la His516 de la glucosa oxidasa (Roth y Klinman, 2003); (ii) la unión del producto cargado en el centro activo de la colina oxidasa (Finnegan *et al.*, 2010); o (iii) la presencia de un residuo de lisina en la sarcosina oxidasa (Zhao *et al.*, 2008).

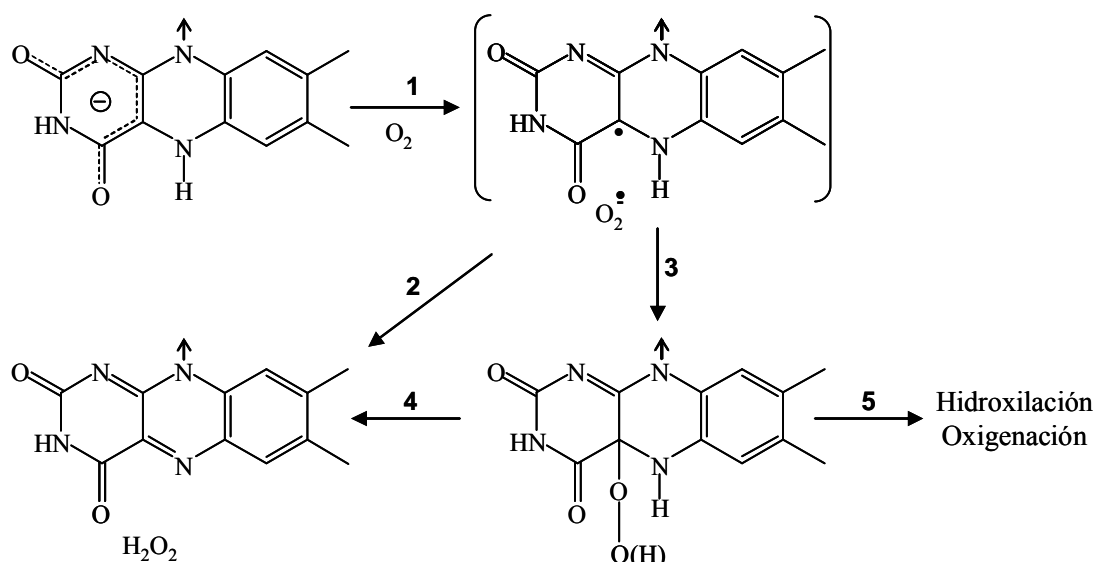


Figura 6. **Diferentes vías de reoxidación de la flavina.** La reacción comienza con la transferencia de un electrón dando lugar al par de radicales semiquinona y superóxido (1). La reacción puede continuar con una segunda transferencia de un electrón (2) o mediante la formación de un aducto hidroperóxido con la flavina (3) que posteriormente se rompe dando lugar al H_2O_2 y a la flavina oxidada (4) o bien dar lugar a la hidroxilación/oxigenación de un sustrato como en las monooxigenasas (5). Adaptado de Mattevi (2006)

Las formas intermedias de la flavina de esta reacción (semiquinona y C4a-hidroperóxido) han sido recientemente descritas en diferentes oxidasas. El radical semiquinona ha sido detectado en la glicolato oxidasa (Pennati y Gadda 2011) gracias a la baja reactividad de esta oxidasa frente al oxígeno. El C4a-hidroperóxido de flavina típico de las monooxigenasas, ha sido descrito recientemente en la piranosa oxidasa, la

única oxidasa descrita hasta el momento capaz de estabilizar esta forma de la flavina (Sucharitakul *et al.*, 2008), aunque también ha sido detectado en la estructura cristalográfica de la colina oxidasa como resultado de la exposición a los rayos-X (Orville *et al.*, 2009).

2. La enzima aril-alcohol oxidasa (AAO) de *Pleurotus eryngii*

La actividad AAO productora de peróxido de *P. eryngii* fue detectada por primera vez en 1988 (Guillén *et al.*, 1988). Durante los primeros estudios se purificó la AAO producida por el hongo a partir de cultivo líquido (Guillén *et al.*, 1992a) y se detectó en fermentación en estado sólido empleando sustratos lignocelulósicos (Barrasa *et al.*, 1998; Camarero *et al.*, 1997). La AAO producida por el hongo es una glicoproteína monomérica que posee un peso molecular de 72.6 kDa y un porcentaje de glicosilación del 11% (estimado por electroforesis en gel de acrilamida) (Guillén *et al.*, 1992b). La clonación y secuenciación del gen de la AAO (Varela *et al.*, 1999) permitió su expresión heteróloga en *Emericella nidulans* (Varela *et al.*, 2001) y posteriormente en *Escherichia coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006).

La AAO de *P. eryngii* es capaz de oxidar una amplia variedad de compuestos aromáticos. Los primeros estudios de especificidad llevados a cabo por Guillén *et al.* (1992b) mostraron que la AAO puede oxidar alcoholes primarios con estructuras muy diferentes, desde los alcoholes aromáticos sencillos como el bencílico a aquellos con estructuras más complejas como el *p*-metoxibencílico, 2,4-hexadien-1-ol o naftilmetanol. Posteriormente, se caracterizó la AAO tras su expresión heteróloga en *E. nidulans*, a través de estudios cinéticos y espectrofotométricos, encontrando que la enzima no es capaz de estabilizar aductos con sulfito ni radicales semiquinona de flavina (Ferreira *et al.*, 2005).

Los primeros estudios estructura-función de la AAO se desarrollaron tras la obtención del modelo estructural por homología (Varela *et al.*, 2000), el acoplamiento molecular de los sustratos en el centro activo y la caracterización de las variantes obtenidas heterológamente en *E. nidulans* (Ferreira *et al.*, 2006). Estos estudios iniciales revelaron la importancia de los residuos His502, His546, Tyr92 y Phe501 en la catálisis pero no fue posible determinar definitivamente su papel en el mecanismo catalítico de la enzima. El posterior protocolo de expresión heteróloga de la enzima en *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006) ha permitido abordar en mayor detalle la caracterización de las variantes diseñadas mediante mutagénesis dirigida.

La resolución de la estructura cristalográfica de esta enzima (Fernández *et al.*, 2009) ha sido fundamental para abordar los estudios del presente trabajo, permitiendo relacionar el efecto de las mutaciones con la posición de los residuos en el centro activo, así como el desarrollo de una serie de

simulaciones computacionales que han permitido estudiar el mecanismo catalítico en detalle.

Estructura y Objetivos

Los capítulos de esta tesis se corresponden con una serie de trabajos ya publicados (y uno en preparación) cuyo contenido se ha conservado excepto por su traducción al español y la homogeneización del formato de las abreviaturas, figuras y tablas. Además, el material suplementario de los artículos ha sido incorporado al texto principal. Por consiguiente, cada capítulo contiene su propia sección de resumen, materiales y métodos, resultados y discusión. Con el objetivo de facilitar la comprensión del contenido del trabajo, se incluye, además de la presente **Introducción**, una **Discusión** general de los capítulos y una lista de **Conclusiones** al final de la tesis.

El presente trabajo continúa con el **Capítulo 1** que constituye una revisión actualizada del papel de la AAO en la degradación de la lignina, su posición en la superfamilia GMC a la luz de los nuevos genomas de basidiomicetos, los aspectos más relevantes de la catálisis (algunos de ellos aclarados en la presente tesis) y su interés biotecnológico. El estudio del mecanismo catalítico se inició investigando los aspectos fundamentales del mismo, empleando dos sustratos deuterados y agua deuterada como solvente de la reacción, dando lugar al **Capítulo 2**. Más adelante, la combinación de técnicas experimentales y computacionales, permitió investigar aspectos relevantes del mecanismo y del papel de los residuos catalíticos, tal y como se detalla en el **Capítulo 3**. En el **Capítulo 4**, se describe la naturaleza estereoselectiva del mecanismo catalítico, y las imposiciones estructurales de la enzima que definen la especificidad de sustrato. Posteriormente, se investigó en detalle la oxidación de los aldehídos por esta oxidasa, desentrañando también el mecanismo enzimático de la oxidación de estos compuestos en el **Capítulo 5**. El **Capítulo 6** indaga los aspectos estructurales de la enzima que son importantes para modular su reactividad frente al oxígeno. Finalmente, en el **Capítulo 7** se describe en profundidad el papel de los residuos catalíticos His502 e His546 durante ambas semi-reacciones del ciclo catalítico de la AAO.

Los **Objetivos** de este trabajo de investigación fueron: **(i)** Determinar el mecanismo catalítico durante la semi-reacción de reducción de la enzima por alcoholes y aldehídos y de reoxidación por el O₂; **(ii)** Comprender el papel de los residuos conservados del centro activo que participan en ambas semi-reacciones del ciclo catalítico; **(iii)** Estudiar la dinámica de migración y oxidación/reducción de sustratos en el centro activo; y **(iv)**

Determinar la relación entre la estructura del centro activo y el mecanismo catalítico de la enzima.

Lista de publicaciones

A continuación se muestra la relación de las publicaciones obtenidas a lo largo del presente trabajo de investigación y su correspondencia con los Capítulos de la tesis. Dichas publicaciones en su formato original publicado en las diferentes revistas se incluyen en el CD adjunto junto con la versión pdf de la tesis.

Capítulo 1

Hernández-Ortega A., Ferreira P., Martínez A.T. (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1395–1410.

Capítulo 2

Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 2480-2487.

Capítulo 3

Hernández-Ortega, A., Borreli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.

Capítulo 4

Hernández-Ortega A., Ferreira P., Merino P., Medina M., Guallar V., y Martínez A.T. (2012) Stereoselective hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. *ChemBioChem.* 13: 427-435.

Capítulo 5

Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.

Capítulo 6

Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V., y Martínez, A.T. (2011) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-41114.

Capítulo 7

Hernández-Ortega A., Lucas F., Ferreira P., Medina M., Guallar V., y Martínez A.T. Discriminating the role of two active site histidines in aryl-alcohol oxidase catalysis: a mutagenesis, isotope effect and QM/MM study. *Biochemistry*. En preparación.

CAPÍTULO 1

La aril-alcohol oxidasa fúngica: una flavoenzima productora de peróxido implicada en la degradación de lignina*

Resumen. La aril-alcohol oxidasa (AAO) es una flavoenzima extracelular que produce el H₂O₂ requerido por las peroxidases ligninolíticas durante la degradación fúngica de la lignina, un paso clave para el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres. La activación del O₂ por la AAO de *Pleurotus eryngii* tiene lugar durante el reciclado redox de metabolitos bencílicos *p*-metoxilados secretados por el hongo. Las únicas secuencias de la AAO que estaban disponibles hasta hace poco tiempo correspondían al género *Pleurotus*. Sin embargo su número se han incrementado considerablemente durante los últimos años gracias a los proyectos de secuenciación de genomas de distintos basidiomicetos. En la presente revisión se incluye una comparación de 112 secuencias de la familia de las oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas) incluyendo 40 secuencias de AAOs. Tal y como se ha demostrado mediante la determinación de efectos isotópicos cinéticos, la oxidación de alcoholes por la AAO se produce mediante transferencia de hidruro a la flavina y de un protón a una base catalítica. Además, estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que la His502 activa el sustrato reductor mediante la abstracción del protón del grupo hidroxilo. Este resultado ha sido extendido a otras oxidorreductasas GMC donde la naturaleza de la base catalítica seguía siendo objeto de discusión. En contraste a lo propuesto para otras oxidorreductasas GMC, en la AAO las dos transferencias (de protón e hidruro) no son asincrónicas sino concertadas. El acoplamiento (*docking*) molecular del alcohol en el centro activo de la enzima dio lugar a una única posición catalítica del sustrato compatible con una transferencia concertada, con el hidrógeno en posición pro-*R* a una distancia favorable para la transferencia de hidruro. Mediante la utilización de las formas enantioméricas (*R*) y (*S*) del alcohol *p*-metoxibencílico α -deuterado, se demostró la estéreselectividad durante la transferencia de hidruro, por primera vez para una oxidorreductasa GMC. Otros aspectos no resueltos de la catálisis de la AAO (como la inesperada especificidad por algunos aldehídos) pueden explicarse gracias a los resultados recientes. Finalmente, el interés biotecnológico de la AAO (en la producción de aromas) se ha ampliado por su posible aplicación durante la producción de compuestos quirales gracias a la estéreselectividad de la enzima.

*Hernández-Ortega A., Ferreira P., Martínez A.T. (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93:1395-1410.

1. Importancia de la lignina en el reciclado natural y el empleo industrial de la biomasa vegetal

La lignina es un constituyente esencial de la pared celular de las plantas vasculares, y constituye el segundo biopolímero más abundante en el planeta (tras la celulosa) representando alrededor del 20% del carbono total fijado mediante fotosíntesis en los ecosistemas terrestres. El papel principal de la lignina es proteger a los polisacáridos de la pared celular vegetal, celulosa y hemicelulosas (las últimas formadas por diferentes pentosanos y hexosanos), frente al ataque hidrolítico de microorganismos saprofitos y patógenos. Además, la lignina provee a la planta de la rigidez necesaria para crecer sobre la tierra, e impermeabiliza los tejidos vasculares para permitir la circulación de la savia. La naturaleza recalcitrante de la lignina frente a su biodegradación se debe a su estructura compacta y a su naturaleza aromática que limita la accesibilidad de las enzimas microbianas y disminuye su biodegradabilidad, respectivamente. La lignina es un polímero complejo y heterogéneo formado por tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos principales y sus formas aciladas, conocidos comúnmente como monolignoles (Ralph *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2008). Aunque los precursores de la lignina son compuestos fenólicos, el polímero resultante no lo es. Durante la biosíntesis, los monolignoles son oxidados por peroxidasas vegetales a sus radicales fenoxilo (Higuchi, 1997). Debido a la prevalencia de ciertas formas radicales resonantes, y a la diferente estabilidad de los productos derivados de la unión, son predominantes los enlaces éter entre la posición fenólica y el carbono- β de la cadena lateral de los precursores *p*-hidroxifenilpropanoides en el polímero en crecimiento, dando lugar a su naturaleza no-fenólica.

La degradación microbiológica de la lignina representa un paso esencial en el reciclado del carbono en ecosistemas terrestres debido a que la eliminación de la barrera de lignina incrementa la accesibilidad a los carbohidratos vegetales para su empleo por los microorganismos (Martínez *et al.*, 2005; Kersten y Cullen, 2007). La eliminación de la lignina es además una etapa central para la utilización industrial de la biomasa vegetal como fuente renovable de sustancias químicas, materiales y combustibles en las futuras biorefinerías de la lignocelulosa (Ragauskas *et al.*, 2006; Himmel *et al.*, 2007). La creciente demanda de combustibles fósiles ha incrementado recientemente el interés en fuentes de energías alternativas y renovables. En este contexto, se ha considerado a la biomasa vegetal como una fuente renovable para el desarrollo de una sociedad industrial sostenible, contribuyendo simultáneamente a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero derivadas de fuentes petroquímicas. La barrera de lignina limita la accesibilidad a los azúcares fermentables (derivados de la celulosa y hemicelulosas) durante la producción de

bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica. La eliminación de esta barrera puede llevarse a cabo mediante métodos tradicionales, que incluyen alta temperatura y fuertes tratamientos químicos, o mediante métodos sostenibles y respetuosos con el medio ambiente como el biopretratamiento (Salvachúa *et al.*, 2011). En el futuro, los procesos de las biorefinerías, en primer lugar, extraerán los compuestos químicos con alto valor comercial presentes en la biomasa, como fragancias, saborizantes, productos alimentarios, y otros compuestos químicos de interés; y en segundo lugar, los polisacáridos vegetales y la lignina serán procesados para la obtención de materiales bioderivados, productos químicos y combustibles (Ragauskas *et al.*, 2006).

2. Superando la barrera de la lignina: dos estrategias diferentes basadas en el H₂O₂

Los hongos basidiomicetos de podredumbre de la madera son los más eficientes degradadores de la lignocelulosa. Atendiendo al patrón de degradación (desde un punto de vista macroscópico y químico) estos hongos se clasifican en hongos de podredumbre blanca o podredumbre parda (Zabel y Morrell, 1992; Schwarze *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2005). Los hongos más comunes de podredumbre blanca son capaces de degradar la lignina y las hemicelulosas. En estos hongos se han descrito dos patrones de degradación, de acuerdo con su habilidad para degradar la lignina selectivamente o simultáneamente con la celulosa, siendo el primero de ellos el que posee un mayor interés para las aplicaciones biotecnológicas (Otjen y Blanchette, 1986). Un grupo diferente de basidiomicetos, denominados de podredumbre parda, pueden degradar los polisacáridos tras la modificación parcial de la lignina, dando lugar a un material de coloración parda que consiste en lignina modificada (Martínez *et al.*, 2011; Yelle *et al.*, 2011).

Dos de los hongos de podredumbre blanca más estudiados, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus eryngii*, han desarrollado diferentes sistemas enzimáticos extracelulares para degradar la lignina. *P. chrysosporium* secreta dos peroxidases, denominadas lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) (Hammel y Cullen, 2008), además de glioxal oxidasa cobre-radical (EC 1.1.3.-) (Kersten, 1990); mientras que *P. eryngii* produce manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16) en lugar de lignina peroxidasa (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009), junto a lacasa (EC 1.10.3.2) (Muñoz *et al.*, 1997) y aril-alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7) (Guillén *et al.*, 1990). Los hongos de podredumbre blanca secretan además diferentes metabolitos arílicos que están implicados en la degradación de lignina (Gutiérrez *et al.*, 1994; de Jong *et al.*, 1994b). Las enzimas anteriores no pueden penetrar a través de

la compactada estructura de la pared celular vegetal debido a su gran tamaño molecular y en consecuencia, los agentes oxidantes de pequeño tamaño, incluyendo especies reactivas de oxígeno, cationes metálicos y radicales aromáticos, estarían implicados en las etapas iniciales del ataque fúngico a la madera (Evans *et al.*, 1994). Aún no se conoce en detalle el mecanismo de degradación de la madera por los hongos de podredumbre parda. Estos hongos son capaces de acceder y degradar los polisacáridos de la madera sin eliminar la lignina. Se cree que generan Fe^{2+} y H_2O_2 extracelulares, que son lo suficientemente pequeños para atacar la pared celular vegetal mediante una reacción Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}\cdot$) generando radicales libres hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que oxidativamente rompen los polímeros de celulosa y hemicelulosas. Los hongos de podredumbre parda producen quinonas extracelulares (Hammel *et al.*, 2002) que reducen el Fe^{3+} y el O_2 para dar lugar a las reacciones Fenton (Kerem *et al.*, 1999). La comparación de los transcriptomas y secretomas de los hongos modelo *P. chrysosporium* (podredumbre blanca) y *Postia placenta* (podredumbre parda) reflejan las diferencias en los patrones de degradación de lignocelulosa descritos anteriormente (Martínez *et al.*, 2009; Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009). La comparación de ambos genomas (**Tabla 1**) indica que durante la evolución de los hongos de podredumbre parda se concentraron o perdieron familias de genes que son importantes en los típicos hongos de podredumbre blanca, como las oxidasas cobre-radical, por un lado, y las LiPs, MnPs y piranosa oxidasas (EC 1.1.3.10) por otro.

Tabla 1

Comparación de los genes de enzimas potencialmente implicadas en la degradación de lignina encontrados en los genomas de hongos de podredumbre blanca (*P. chrysosporium*) y parda (*P. placenta*)^a

	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. placenta</i>
<i>Producción de peróxido</i>		
Metanol (alcohol) oxidasas	1	1
Aril-alcohol oxidasas	4	3
Glucosa oxidasas	1	5
Piranosa oxidasas	1	0
Glioxal oxidasa y otras oxidasas cobre-radical	7	3
<i>Modificación de lignina</i>		
Lignina peroxidasas	10	0
Manganeso peroxidasas	5	0
Peroxidasas de bajo potencial redox	1	1
Lacasas	0	3
<i>Reductasas de hierro</i>		
Quinona reductasas	4	1
Celobiosa deshidrogenasas	1	0

^aAdaptado de Martínez et al. (2009)

Además, el origen del H₂O₂ implicado en la degradación oxidativa de la lignina y la celulosa difiere en hongos basidiomicetos de podredumbre blanca y parda. En los primeros, el H₂O₂, necesario para la acción de las peroxidasas extracelulares es generado por oxidasas secretadas, donde la flavina o el cobre actúan como cofactores en la AAO de *P. eryngii* y la glioxal oxidasa de *P. chrysosporium*, respectivamente (Kersten, 1990; Guillén *et al.*, 1992). Durante la degradación de la madera por los hongos de podredumbre parda se ha propuesto que el metanol derivado del ataque a la lignina (demetoxilación), sirve como sustrato de la metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) generando el H₂O₂ necesario para la producción del radical hidroxilo durante las reacciones Fenton (Martínez *et al.*, 2009).

3. AAO y otras enzimas productoras de H₂O₂ implicadas en la degradación de la lignina

El H₂O₂ juega un papel central durante el ataque a la madera por los hongos de podredumbre blanca, actuando como sustrato de las peroxidasas ligninolíticas (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). Además, se postuló primero en *P. chrysosporium* (Forney *et al.*, 1982; Faison y Kirk, 1983) y posteriormente en *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 2000; Gómez-Toribio *et al.*, 2009), que el H₂O₂ puede actuar como precursor del altamente reactivo OH• en hongos de podredumbre blanca, siendo capaz de depolimerizar la lignina (y los polisacáridos). Previamente se demostró que el H₂O₂ se sintetizaba de forma simultánea a las enzimas del sistema ligninolítico y, cuando se eliminaba mediante adición de catalasa al medio de cultivo del hongo, la capacidad de degradar la lignina se veía reducida (Faison y Kirk, 1983). Se han postulado diferentes enzimas extracelulares como responsables de la producción de peróxido en hongos de podredumbre blanca incluyendo, entre otras, las anteriormente mencionadas glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987) y la AAO (Guillén *et al.*, 1990), además de la piranosa oxidasa (Daniel *et al.*, 1994). El H₂O₂ generado por enzimas intracelulares - como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) (Eriksson *et al.*, 1986) o la acil-CoA oxidasa (EC 1.3.3.6) (Greene y Gould, 1984) - requiere un sistema de exportación del H₂O₂ que aún no ha sido descrito. Curiosamente, se ha observado que la metanol (alcohol) oxidasa (EC 1.1.1.1), descrita también en hongos de podredumbre blanca (Nishida y Eriksson, 1987), es secretada por el hongo de podredumbre parda *Gloeophyllum trabeum* aunque su secuencia no incluye un típico péptido señal (Daniel *et al.*, 2007). Se ha descrito otra enzima extracelular, la oxalato oxidasa (EC 1.2.3.4), como responsable de la producción inicial de H₂O₂ en *Ceriporiopsis subvermispora*, un degradador selectivo de lignina (Aguilar *et al.*, 1999).

En *P. chrysosporium* se han descrito, en condiciones ligninolíticas de cultivo, tanto glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987) como piranosa oxidasa (Daniel *et al.*, 1994). Respecto a la glioxal oxidasa se ha observado en los cultivos una correlación temporal entre la actividad, la producción del glioxal-metilglioxal, y la actividad de la lignina peroxidasa, que apoya su implicación en la degradación de lignina como productora de H₂O₂. De forma paralela, la piranosa oxidasa muestra una distribución (en la hifa y el espacio periplásmico) similar a la descrita para las peroxidases ligninolíticas de *P. chrysosporium* (Daniel *et al.*, 1994). Se ha descrito actividad AAO en diferentes hongos, incluyendo las especies de *Pleurotus* (Sannia *et al.*, 1991; Guillén *et al.*, 1992), *Trametes versicolor* (Farmer *et al.*, 1960), *Fusarium solani* (Iwahara *et al.*, 1980), *Rigidoporus microporus* (sinónimo de *Fomes lignosus*) (Waldner *et al.*, 1988), *Bjerkandera adusta* (Kimura *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 2009; 2010) y *Botrytis cinerea* (Goetghebeur *et al.*, 1993). La producción simultánea de AAO y lignina peroxidasa en *B. adusta* (Muheim *et al.*, 1990), así como AAO y peroxidasa versátil en *Pleurotus* (Camarero *et al.*, 1996), apoyan la implicación de la AAO en la degradación de la lignina. Además, se estudió la localización de la AAO durante la degradación de la paja de trigo por *P. eryngii* en condiciones de fermentación en estado sólido, simulando la degradación natural de la lignocelulosa por el hongo (Barrasa *et al.*, 1998). La enzima se localizó en la matriz extracelular de la hifa (constituida por polisacáridos secretados) (**Figura 1**), paralelamente a lo descrito para la lignina peroxidasa y la lacasa en otros basidiomicetos (Gallagher *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1992). Sin embargo, a pesar de esta ubicación inicial sobre la superficie de la hifa, la AAO es capaz de penetrar a través de la pared celular del floema y el parénquima en degradación, así como de los tejidos más lignificados del esclerénquima, tal y como se ha observado mediante microscopía electrónica y óptica tras marcaje con inmuno-oro e inmuno-fluorescencia, respectivamente (**Figura 1**).

Los sustratos de la AAO durante la degradación de la lignocelulosa incluyen tanto compuestos derivados de la lignina como metabolitos aromáticos producidos por el hongo. Los primeros incluyen aldehídos y ácidos aromáticos de tipo fenólico (Kirk y Farrell, 1987; Shimada y Higuchi, 1991) que serían reducidos a los correspondientes alcoholes por las aril-alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.90) (Muheim *et al.*, 1991) y aril-aldehído deshidrogenasas (E.C.1.2.1.29) (Lundell *et al.*, 1990) asociadas al micelio, respectivamente. Teniendo en cuenta la especificidad de sustrato de la AAO de *Pleurotus* (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2005), los metabolitos aromáticos no-fenólicos serían los sustratos preferentes en estos hongos, sin embargo en especies de *Bjerkandera*, la AAO también oxida eficientemente alcoholes bencílicos de naturaleza fenólica (Romero *et al.*, 2009) que podrían derivar de la lignina. Los estudios de Guillén y

colaboradores (1994; 1994) empleando diferentes compuestos aromáticos (de tipo bencílico, *p*-metoxibencílico, veratrílico y vainillílico) demostraron que la AAO de *P. eryngii* genera el H₂O₂ de forma continua mediante un ciclo redox de los compuestos anteriores, en colaboración con deshidrogenasas miceliarias. Este ciclo redox fue establecido tras observar un equilibrio entre las reacciones de oxidación y reducción de los alcoholes, aldehídos y ácidos bencílicos involucrados en la continua producción de peróxido a expensas del poder reductor intracelular (Guillén *et al.*, 1994). Al menos tres actividades enzimáticas están implicadas en este proceso: la AAO extracelular, oxidando los alcoholes arílicos a los correspondientes aldehídos y eventualmente a ácidos (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2010), y las aril-alcohol y aril-aldehído deshidrogenasas intracelulares, reduciendo los aldehídos y ácidos, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 1994). Curiosamente, el *p*-metoxibenzaldehído (*p*-anisaldehído) es el metabolito extracelular más abundante en especies de *Pleurotus* (Gutiérrez *et al.*, 1994) y su forma reducida, el alcohol *p*-metoxibencílico, es uno de los mejores sustratos de la AAO de este hongo (Tabla 2) (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2005). Por tanto, el papel fisiológico más probable de este metabolito es mantener el ciclo redox para producir el H₂O₂ a través de la acción de la aril-alcohol deshidrogenasa y la AAO (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994). La misma función se ha sugerido para los alcoholes arílicos clorados en la especie *B. adusta* productora de AAO (de Jong *et al.*, 1994a).

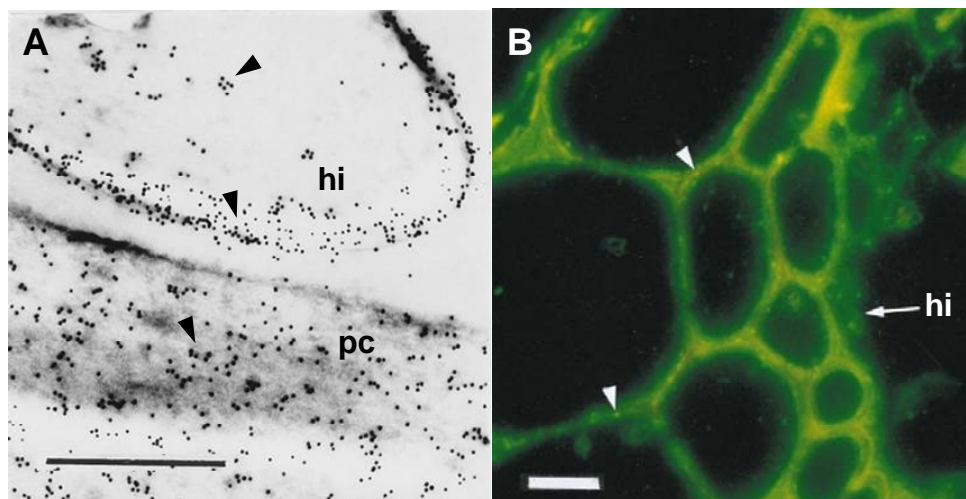


Figura 1. **Inmunolocalización de la AAO durante la degradación de paja de trigo por *P. eryngii*.** (A) Microscopía electrónica de transmisión de la AAO mediante marcaje con inmuno-oro (esferas negras, puntas de flecha) en la hifa fúngica (hi) y en la pared celular parcialmente degradada de la paja de trigo (pc). (B) Microscopía de fluorescencia de la AAO marcada mediante inmuno-fluorescencia (puntos verde-amarillo, puntas de flecha) en la pared celular del esclerénquima y la hifa fúngica (hi). Adaptado de Barrasa *et al.* (1998) (las barras representan 1 μ m en A y 10 μ m en B).

En la **Figura 2** se representa un esquema simplificado de la degradación de la lignina por hongos de podredumbre blanca, basado en los estudios con *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). Las peroxidasas ligninolíticas (peroxidasa versátil en este caso) oxida el polímero de lignina, generando radicales aromáticos que evolucionan a través de diferentes reacciones no-enzimáticas incluyendo rupturas de los enlaces C α -C β (y C4-C β eter). Tal y como se ha descrito anteriormente, los aldehídos aromáticos derivados de la reacción anterior o bien sintetizados *de novo* por el hongo (esta segunda opción sería preferente en el caso de *Pleurotus*) actúan como sustratos para la generación de H₂O₂ por la AAO a través de un ciclo redox implicando también las deshidrogenasas miceliares. Los radicales fenoxilo derivados de la ruptura C4-eter y la oxidación de los fenoles pueden repolimerizar si no son reducidos, proceso en el que se ha sugerido la contribución de la AAO (Marzullo *et al.*, 1995).

4. AAO: un miembro de la superfamilia de oxidorreductasas GMC

La AAO, una enzima monomérica secretada, es un miembro de la superfamilia de oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas), que se compone de una variedad de enzimas procariotas y eucariotas que contienen FAD como cofactor. Esta superfamilia fue creada por Cavener (1992) quien incluyó la glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.2) de *Drosophila melanogaster*, la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, la metanol (alcohol) oxidasa de *Hansenula polymorpha* y la colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1) de *Escherichia coli*. Posteriormente se han descrito nuevas flavoenzimas que contienen las secuencias típicas de las oxidorreductasas GMC. Su número se ha incrementado recientemente de forma notable debido a los numerosos proyectos de secuenciación de genomas, si bien es cierto que se han descrito muchos marcos abiertos de lectura (ORF) de GMCs teóricas que codifican para proteínas de función desconocida. Las secuencias conservadas en todos los miembros de la superfamilia GMC incluyen (del N-terminal al C-terminal) (Kiess *et al.*, 1998): **i**) el dominio de unión de FAD compuesto por cuatro sub-regiones, incluyendo el motivo $\beta\alpha\beta$ que se conserva en muchas de las proteínas que unen FAD (Wierenga *et al.*, 1983), y la secuencia GMC patrón-2 (PROSITE PS00624) que estaría implicada en la unión del motivo de adenina del FAD; **ii**) la secuencia GMC patrón-1 (PROSITE PS00623), implicada tanto en la estabilización del motivo de cierre como en la formación del *loop* de anclaje del FAD; y **iii**) la región C-terminal, incluyendo el dominio de unión al sustrato y la región catalítica, que es la más variable tanto en la secuencia como en el número de elementos que la componen.

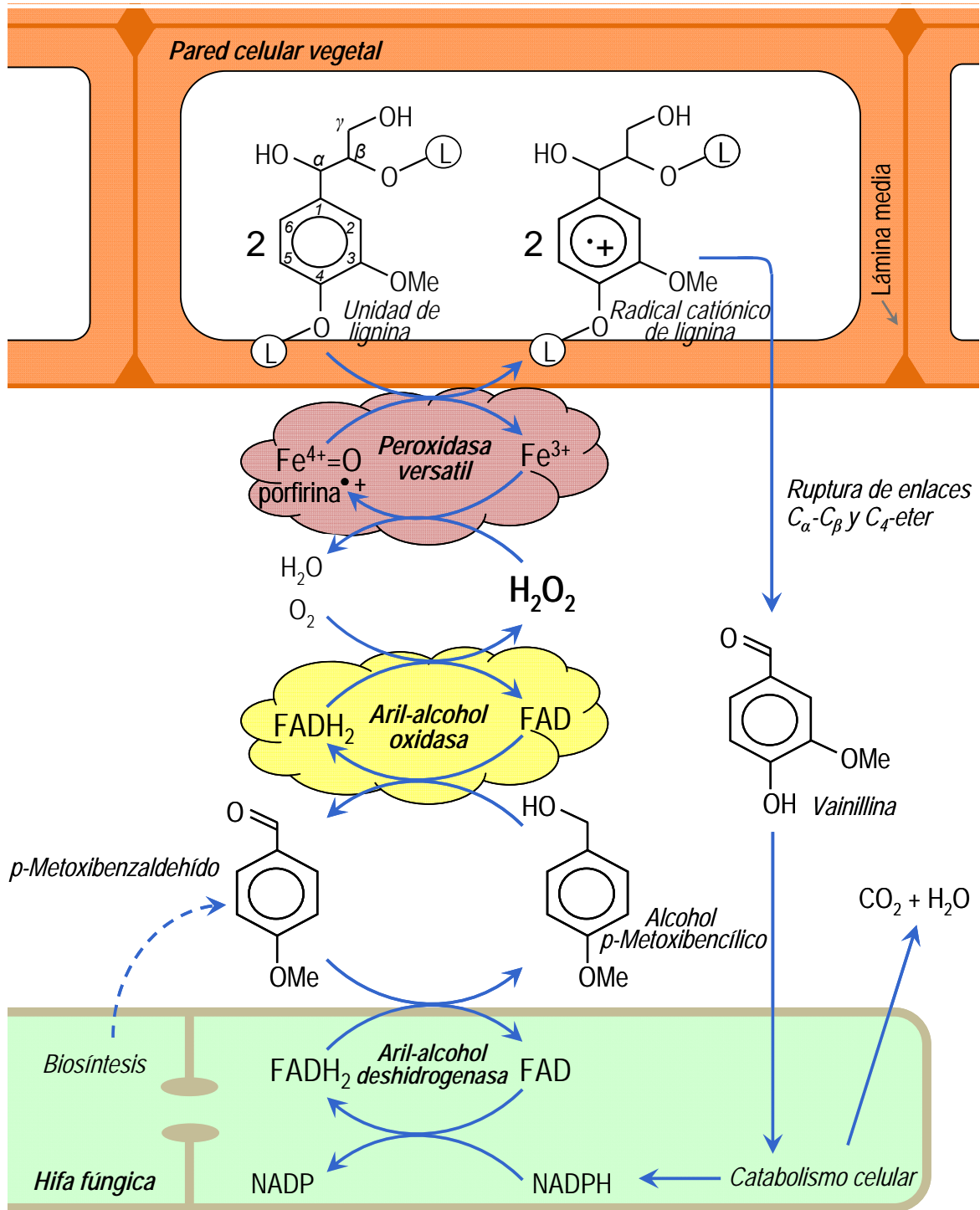


Figura 2. Esquema de la degradación enzimática de la lignina por las especies del género *Pleurotus*. La peroxidasa versátil ataca las subestructuras de la lignina de la pared celular vegetal (en el esquema los círculos que contienen la L representan el polímero de lignina remanente, de tipo guayacilo) con la participación de la AAO extracelular que genera el H₂O₂ durante el reciclado redox de aldehídos aromáticos en el que también participan aril-alcohol deshidrogenasas intracelulares (la estequiometría de la reacción es: 1 molécula de NADPH reduce una molécula de p-metoxibenzaldehído, que genera 1 molécula de peróxido, y finalmente se oxidan dos subunidades de lignina). Consultar texto para los detalles. Adaptado de Ruiz-Dueñas y Martínez (2009).

Las únicas secuencias de AAO disponibles durante años fueron las de *P. eryngii* y *Pleurotus pulmonarius* descritas por Varela et al. (1999; 2000a) con una identidad de secuencia de aminoácidos del ~33% respecto a la glucosa oxidasa de *A. niger* (Varela et al., 2000b). Debido al interés por los hongos de podredumbre blanca para su posible aplicación en las biorefinerías de lignocelulosa recientemente se ha incrementado de forma significativa el número de secuencias de genomas de basidiomicetos obtenidas en el DOE *Join Genome Institute*, incluyendo alrededor de 50 secuencias anotadas como posibles AAO. Las secuencias de las AAO de los genomas de *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Fomitiporia mediterranea*, *Fomitopsis pinicola*, *Gloeophyllum trabeum*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *P. placenta*, *Punctularia strigosozonata*, *Stereum hirsutum* y *Trametes versicolor* se han incluido en el dendograma mostrado en la **Figura 3**, tras su anotación manual, junto a las dos secuencias de *Pleurotus* citadas anteriormente, y la secuencia de la AAO de *B. adusta* (Romero et al., 2010). El dendograma incluye también las secuencias de los otros miembros de la superfamilia GMC que se han descrito actualmente en basidiomicetos (hasta un total de 112 secuencias de las especies anteriores junto con *Agaricus xanthodermus*, *Athelia rolfsii*, *Auricularia delicata*, *Coniophora puteana*, *Dacryopinax* sp, *Grifola frondosa*, *Irpex lacteus*, *Leucoagaricus meleagris*, *Lyophyllum shimeji*, *Myriococcum thermophilum*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phlebiopsis gigantea*, *Schizophyllum commune*, *Trametes ochracea*, *Trametes pubescens*, *Tricholoma matsutake* y *Wolfiporia cocos*). En el dendograma, se delimitan claramente cinco grupos correspondientes a los diferentes tipos de oxidorreductasas GMC más frecuentemente descritas en basidiomicetos, incluyendo: AAO, celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18), metanol oxidasa, piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29) y piranosa oxidasa. Los grupos de la AAO y la metanol oxidasa son los más extensos, mientras que sólo está disponible un número pequeño de secuencias de piranosa deshidrogenasa (de cuatro especies diferentes). Los grupos anteriores son completamente homogéneos en el sentido de que cada uno de ellos incluye exclusivamente secuencias de un solo tipo de GMC, revelando una distancia filogenética y una clara delimitación entre los diferentes tipos de enzimas de la superfamilia. En el grupo de la AAO, se observa un primer subgrupo incluyendo, por un lado, secuencias del género *Pleurotus* y, por otro lado, secuencias de *P. strigosozonata* (junto a una secuencia de *G. trabeum*), junto a un segundo gran subgrupo que incluye secuencias de AAO de una variedad de especies de basidiomicetos. En el dendograma mostrado las piranosas deshidrogenasas son el grupo más próximo al de las AAOs, y las metanol oxidasas son el grupo más próximo al conjunto de los grupos anteriores, seguido del grupo de las celobiosa deshidrogenasas (dominio de flavina) y

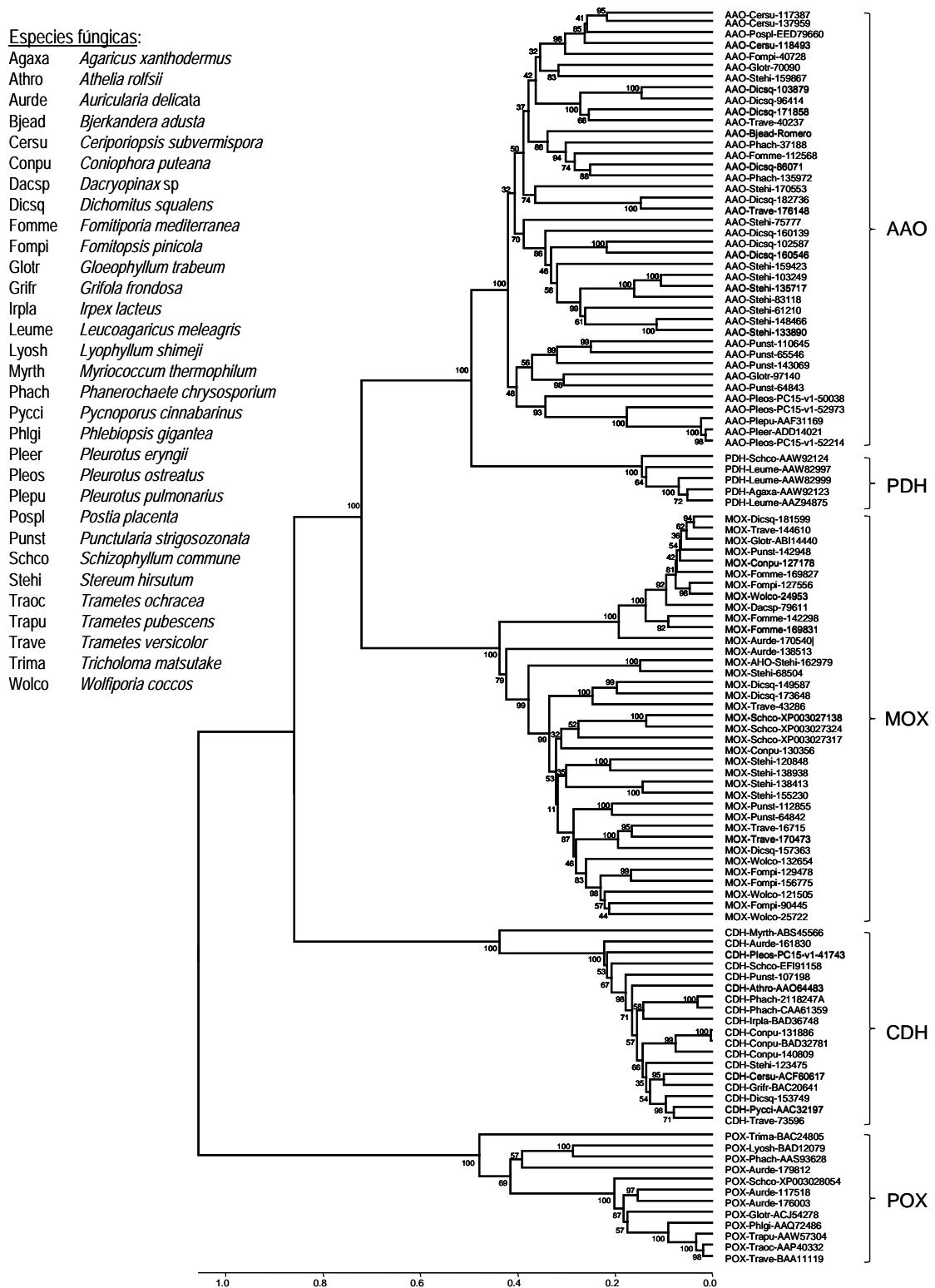


Figura 3. Comparación de 112 oxi dorreductas GMC de 31 especies de basidiomicetos. La comparación incluye: 40 secuencias de AAOs, 5 secuencias de piranosa deshidrogenasas (PDH), 37 secuencias de metanol oxidasas (MOX), 18 secuencias del dominio de flavina de celobiosa deshidrogenasas (CDH), y 12 secuencias de piranosa oxidasas (POX). Secuencias tomadas de GenBank y JGI. El dendograma fue obtenido mediante MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) empleando distancias *Poisson* y agrupamientos UPGMA (con delección *pairwise*). Los números en las ramas representan los valores de *bootstrap* tras 1000 replicas.

de las piranosa oxidasas (que forman el grupo más distante), en concordancia con otros análisis filogenéticos de oxidorreductasas GMC (Zámocký *et al.*, 2004; Kittl *et al.*, 2008). Debido a que han sido raramente descritos en basidiomicetos, en esta comparación no se incluyen tres tipos bien conocidos de oxidorreductasas GMC, como son las glucosa oxidasas, colesterol oxidasas (EC 1.1.3.6) y colina oxidasas (EC 1.1.3.17) (los dos últimos son característicos de bacterias).

5. Aspectos generales de la estructura-función de la AAO comparadas con otras flavoproteínas GMC

La estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* recientemente resuelta (Fernández *et al.*, 2009), tras la expresión de la enzima en *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006), muestra una gran similitud estructural con las estructuras cristalográficas de la colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis* (Quaye *et al.*, 2008) y la glucosa oxidasa de *A. niger* (Hecht *et al.*, 1993), la primera oxidorreductasa GMC cuya estructura fue resuelta. Sin embargo, no se han encontrado similitudes estructurales significativas con otras oxidorreductasas GMC, como la piranosa oxidasa fúngica (Bannwarth *et al.*, 2004), el domino de flavina de la celobiosa deshidrogenasa (Yoshida *et al.*, 2001), y la colesterol oxidasa bacteriana (Lario *et al.*, 2003). De acuerdo con la topología general y la función, se pueden definir dos dominios principales en la estructura de la AAO: el dominio de unión a FAD y el dominio de unión a sustrato (**Figura 4A**). El primero es una variación del plegamiento de la glutatión-disulfido reductasa (EC 1.8.1.7) (Dym y Eisenberg, 2001; Fernández *et al.*, 2009). La molécula de FAD interacciona de forma no covalente con la proteína a través de una serie de enlaces de hidrógeno que implica a los grupos NH y CO de los residuos localizados en el dominio N-terminal. Además, la estructura de la región N-terminal, cuya secuencia primaria se corresponde con una de las secuencias conservadas dentro de la superfamilia GMC, adopta el plegamiento $\beta\alpha\beta$ donde se localizan los residuos más importantes implicados en la unión del cofactor. En el dominio de unión al sustrato, la estructura cristalográfica de la AAO reveló un canal con forma de embudo que conecta el solvente con el cofactor FAD, de forma opuesta a lo observado en la glucosa oxidasa (Hecht *et al.*, 1993) y la piranosa oxidasa (Bannwarth *et al.*, 2004), donde el centro activo de la forma monomérica queda expuesta al solvente. La difusión del sustrato en la AAO está limitada por tres residuos aromáticos - Tyr92, Phe397 y Phe501 (**Figura 4B**) – que forman un cuello de botella que limita el acceso a la cavidad del centro activo (Fernández *et al.*, 2009). Empleando el programa *PELE* para la predicción de difusión de ligandos en proteínas (Borrelli *et al.*, 2005), se ha observado que estos residuos experimentan reorganizaciones y

establecen interacciones con el sustrato durante su acceso al centro activo de la AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a), donde adopta su posición final con el carbono- α próximo al anillo de la flavina y a las cadenas laterales de los residuos His502 e His546 (**Figura 4B**).

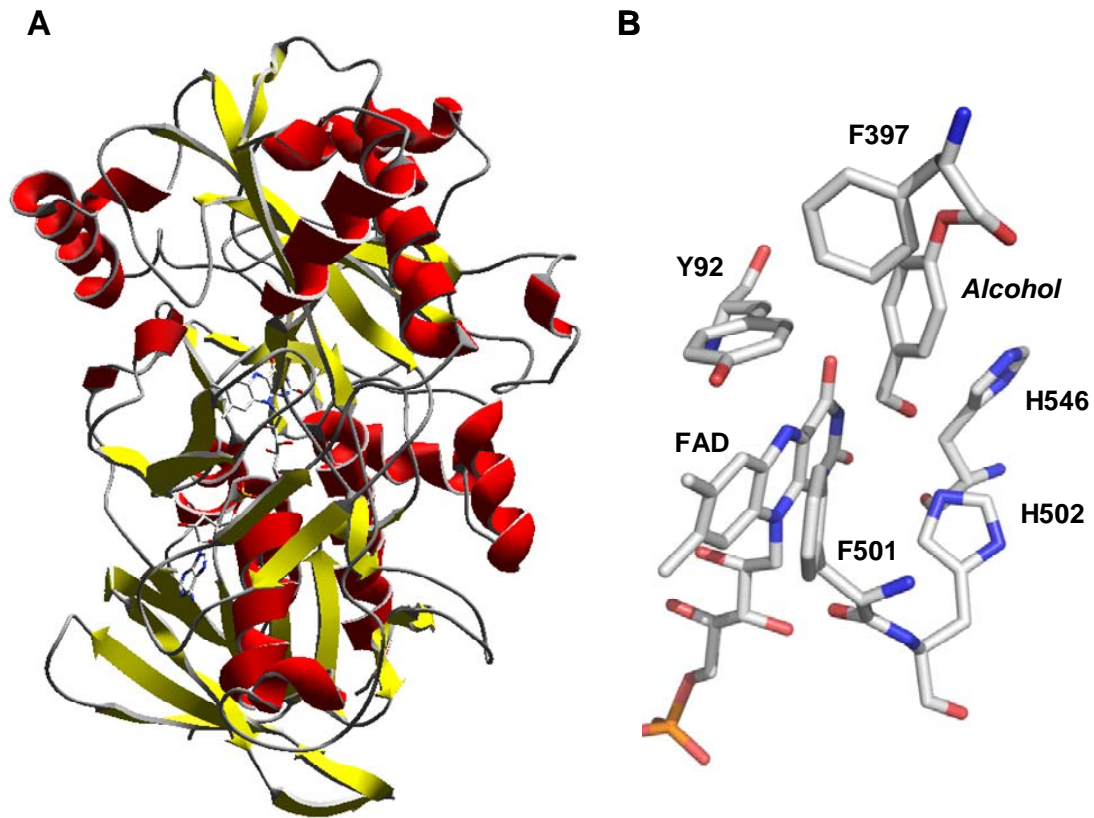


Figura 4. **Estructura cristalográfica de la AAO.** (A) Estructura general incluyendo: hélices- α en rojo, láminas- β en amarillo, y el FAD como barras en colores CPK (basada en el PDB 3FIM). (B) Detalle del centro activo mostrando cinco residuos (Tyr92, Phe397, Phe501, His502 e His546), el anillo del FAD y el sustrato (alcohol *p*-metoxibencílico) tras *docking* molecular con *PELE*, en colores CPK.

Las estructuras cristalográficas de la AAO, la glucosa oxidasa (Wohlfahrt *et al.*, 1999), la colesterol oxidasa (Lario *et al.*, 2003), la colina oxidasa (Quaye *et al.*, 2008), y el dominio de flavina de la celobiosa deshidrogenasa (Hallberg *et al.*, 2002) muestra que todas ellas poseen un centro activo altamente conservado, lo que sugiere un mecanismo similar de oxidación de sustrato (**Figura 5A, B, D, E y F**). La hidroxinitrilo liasa (EC 4.1.2.10), una enzima con una actividad completamente diferente, muestra también un plegamiento general y una arquitectura del bolsillo de unión de flavina similar a la AAO (**Figura 5C**) aunque dicho bolsillo no está directamente implicado en la catálisis (Dreveny *et al.*, 2009). El mecanismo de oxidación propuesto para las oxidorreductas GMC es una transferencia de hidruro asistida por una base catalítica que activa el sustrato alcohólico. Se ha

discutido ampliamente la naturaleza de la base catalítica responsable de la abstracción del protón del grupo hidroxilo del sustrato, en estas oxidorreductas. Tal y como se describe en detalle en la siguiente sección, se estudiaron dos posibles bases catalíticas en la AAO: **i)** la His502, un residuo completamente conservado entre las proteínas de la superfamilia GMC; y **ii)** la His546, conservada en la AAO y la glucosa oxidasa (así como en la hidroxinitrilo liasa) y que se corresponde con un residuo de asparagina en la colina oxidasa, la colesterol oxidasa y la celobiosa deshidrogenasa (**Figura 5**). Diferentes estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que ambos residuos están implicados en la catálisis y/o en la unión del sustrato en la AAO (Ferreira et al., 2006; Hernández-Ortega et al., 2011a), la glucosa oxidasa (Witt *et al.*, 2000), la colina oxidasa (Ghanem y Gadda, 2005; Rungsruriyachai y Gadda, 2008), la celobiosa deshidrogenasa (Rotsaert *et al.*, 2003), y la colesterol oxidasa (Yue *et al.*, 1999). La histidina completamente conservada ha sido propuesta como base catalítica en la glucosa oxidasa de *A. niger* (Wohlfahrt *et al.*, 2004), la celobiosa deshidrogenasa (Rotsaert *et al.*, 2003) y la piranosa oxidasa (Kujawa *et al.*, 2006). Sin embargo, la estructura cristalográfica de la colesterol oxidasa a resolución atómica, mostró que la histidina homóloga (His477) está protonada sugiriendo un papel diferente para este residuo (quizás asistiendo a la catálisis como dador de un enlace de hidrógeno) (Lyubimov *et al.*, 2006). Otros estudios han cuestionado el papel de la His466 como base catalítica en la colina oxidasa (Ghanem y Gadda, 2005). El papel de estos residuos conservados, en la catálisis de las oxidorreductas GMC, se discute más adelante basándonos en los resultados recientes con la AAO.

6. Respuestas recientes a algunas preguntas antiguas sobre la catálisis de la AAO

Estudios recientes sobre la relación estructura-función en la AAO de *P. eryngii* y sus propiedades catalíticas (mediante la combinación de estudios cinéticos, de marcaje isotópico, cristalográficos, de mutagénesis dirigida, cromatográficos, espectroscópicos y empleando técnicas computacionales) han contribuido a resolver algunas preguntas sobre el mecanismo catalítico de la AAO, que no habían sido resueltas durante años, tales como: **1)** la naturaleza final de la base catalítica que contribuye a la oxidación del sustrato; y **2)** la aparente inversión de la especificidad de sustrato de la AAO cuando oxida aldehídos aromáticos sustituidos, con respecto a los alcoholes aromáticos.

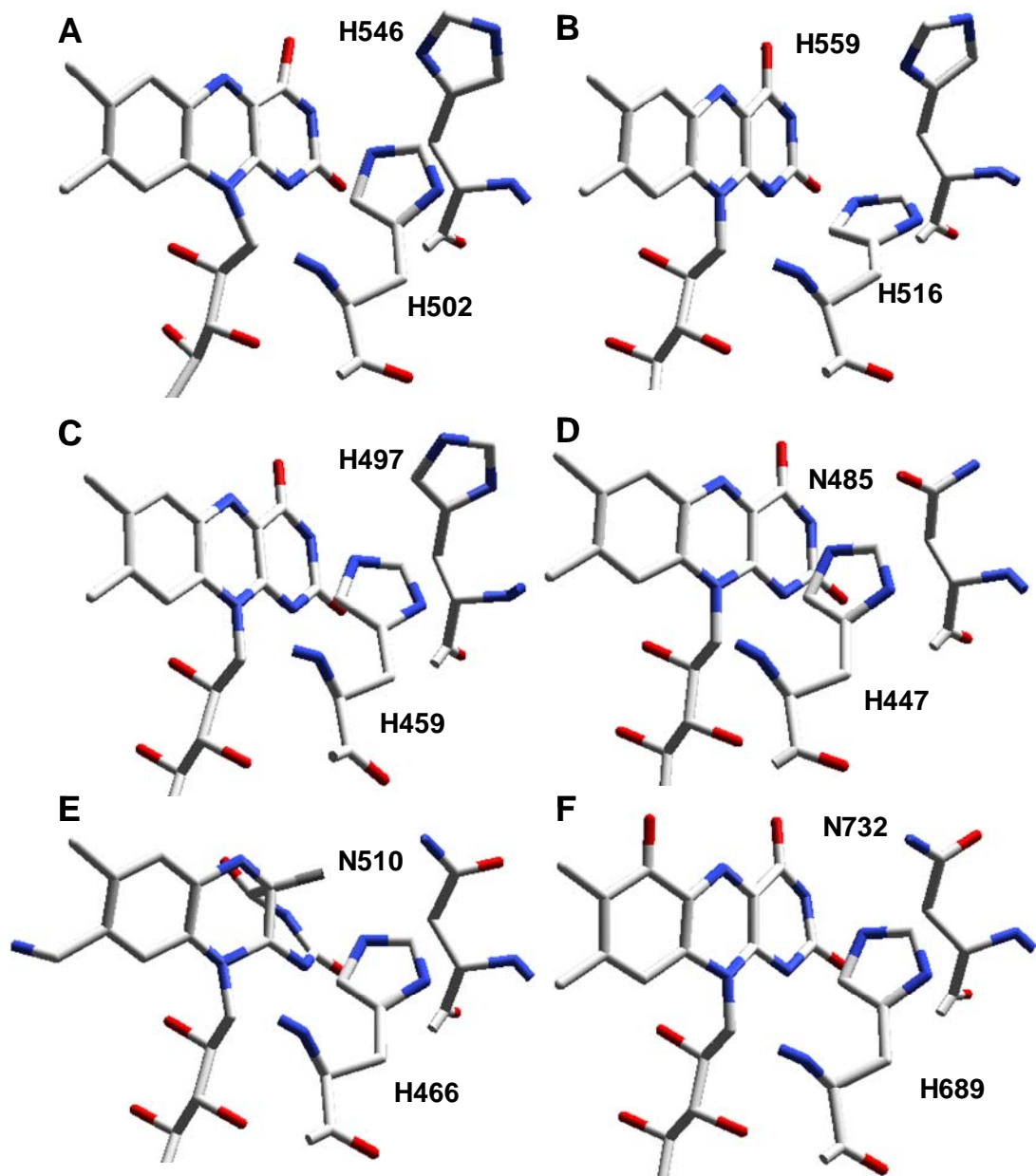


Figura 5. **Residuos conservados en el centro activo de los miembros de la superfamilia GMC:** (A) AAO de *P. eryngii*, (B) glucosa oxidasa de *A. niger*, (C) hidroxinitrilo liasa de *Prunus amygdalus*, (D) colesterol oxidasa de *Brevibacterium sterolicum*, (E) colina oxidasa de *A. globiformis* y (F) celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium*. Referencias PDB: 3FIM, 1CF3, 1JU2 1COY, 2JBV y 1KDG, respectivamente.

6.1 Naturaleza y papel de la base catalítica en la AAO (y otras oxidoreductasas GMC)

La estructura cristalográfica de la AAO (Fernández *et al.*, 2009) sugirió mecanismos catalíticos en común con la glucosa oxidasa. Se han sugerido dos posibles mecanismos para la oxidación de la glucosa por esta oxidasa: **i)** la transferencia directa de hidruro desde el C1 de la glucosa a la flavina, ayudada por la eliminación del protón del hidroxilo en C1 por un grupo básico de la enzima (Bright y Appleby, 1969); y **ii)** la adición nucleofílica del hidroxilo C1 de la glucosa al C4a de la flavina, seguida de la abstracción del protón desde el C1 (Weibel y Bright, 1971). Ambos mecanismos se espera que estén asistidos por una base catalítica general, con la His516 o la His559 como potenciales aceptores de protones (Witt *et al.*, 2000). Sin embargo, el mecanismo de adición nucleofílica parece ser menos probable, ya que nunca se ha detectado un intermedio covalente enzima-glucosa (Leskovac *et al.*, 2005).

De forma paralela, el mecanismo catalítico de la AAO ha sido estudiado durante los años recientes (Guillén *et al.*, 1992; Varela *et al.*, 2000b; Ferreira *et al.*, 2005; 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Primero, los alineamientos de secuencia y el modelado por homología (empleando la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa como molde) mostraron que los residuos His502 e His546 de la AAO se corresponden, respectivamente, con la His516 y la His559 de la glucosa oxidasa (**Figura 5A y B**), y que podrían jugar un papel similar en ambas enzimas (Varela *et al.*, 2000b). Después, se estableció el mecanismo de la oxidación de los alcoholes por la AAO (semi-reacción reductiva) mediante estudios cinéticos incluyendo efectos isotópicos (KIE) del sustrato y del solvente. Se describió un mecanismo de transferencia de hidruro desde el C α del sustrato (al N5 de la flavina) concertada con la abstracción del protón del grupo hidroxilo por una base catalítica (Ferreira *et al.*, 2009). Este mecanismo fue confirmado mediante estudios de QM/MM, que corroboraron la ausencia de un intermedio estable de reacción, de acuerdo con los resultados experimentales (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Al comparar los perfiles de energía QM/MM de las reacciones de la AAO y la colina oxidasa se encontró un intermedio estable de reacción tras la abstracción del protón por la última enzima, de acuerdo con el mecanismo de dos etapas y con la ausencia de un KIE del solvente descritos previamente para la oxidación de la colina (Gadda, 2003; Fan y Gadda, 2005).

Simultáneamente, los estudios computacionales y de mutagénesis dirigida han resuelto definitivamente la naturaleza de la base catalítica en la AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). La His546 participa en la unión del alcohol, mientras que la His502 es la base catalítica tal y como revelan la disminución de 3000 veces y 1800 veces en los valores de la k_{cat} y la k_{red} , respectivamente, en la variante H502A (la His502 también participa en la unión del alcohol tal y como muestran los incrementos de K_m y la K_d en esta variante). Cuando se investigó mediante QM/MM la naturaleza de la base catalítica en la colina oxidasa, los resultados apuntaron a la His466 como base. La His502 de la AAO y la His466 de la colina oxidasa son residuos conservados en los miembros de la superfamilia de oxidorreductasas GMC, y ocupan posiciones estructuralmente homólogas frente al lado-*re* de la flavina, tal y como se observa en la estructura cristalográfica de ambas enzimas (**Figura 5A** y **5E**, respectivamente). Aunque los estudios de Gadda y colaboradores (Ghanem y Gadda, 2005; Rungrsuriyachai y Gadda, 2008) no han establecido definitivamente la naturaleza de la base catalítica en la colina oxidasa, han descrito que la mutación del residuo His466 produce el mayor efecto sobre la k_{cat} . Por tanto, el residuo de histidina conservado en todas las flavoenzimas GMC (incluyendo la His466 de la colina oxidasa y la His516 de la glucosa oxidasa) actuaría como base catalítica durante la oxidación del sustrato, tal y como se ha mostrado para la His502 de la AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). En la **Figura 6 (arriba)** se muestra un esquema de la semi-reacción de reducción durante la oxidación de alcoholes arílicos por la AAO, incluyendo la transferencia de hidruro al N5 de la flavina y la abstracción del protón por la His502 actuando como base catalítica. La **Figura 6 (abajo)** muestra la segunda semi-reacción (de oxidación) que cierra el ciclo catalítico de la AAO, donde el oxígeno es reducido a H_2O_2 con la contribución de la Phe501, que fuerza al O_2 a alcanzar una posición catalítica frente al C4a de la flavina (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b) y la misma His502 implicada en la semi-reacción previa, que contribuye a la reacción de formación del peróxido (Hernández-Ortega *et al.*, 2008).

6.2 Especificidad opuesta de la AAO frente a los alcoholes y los aldehídos aromáticos

A lo largo de los años, se ha estudiado en detalle la especificidad de sustrato de la AAO de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2005). En la **Tabla 2** se muestran las tasas de oxidación de los diferentes sustratos (alcoholes) por la AAO, como porcentajes de actividad observada frente al alcohol bencílico. El β -naftilmetanol es el sustrato que se oxida más eficientemente, lo que indica que la extensión del sistema aromático

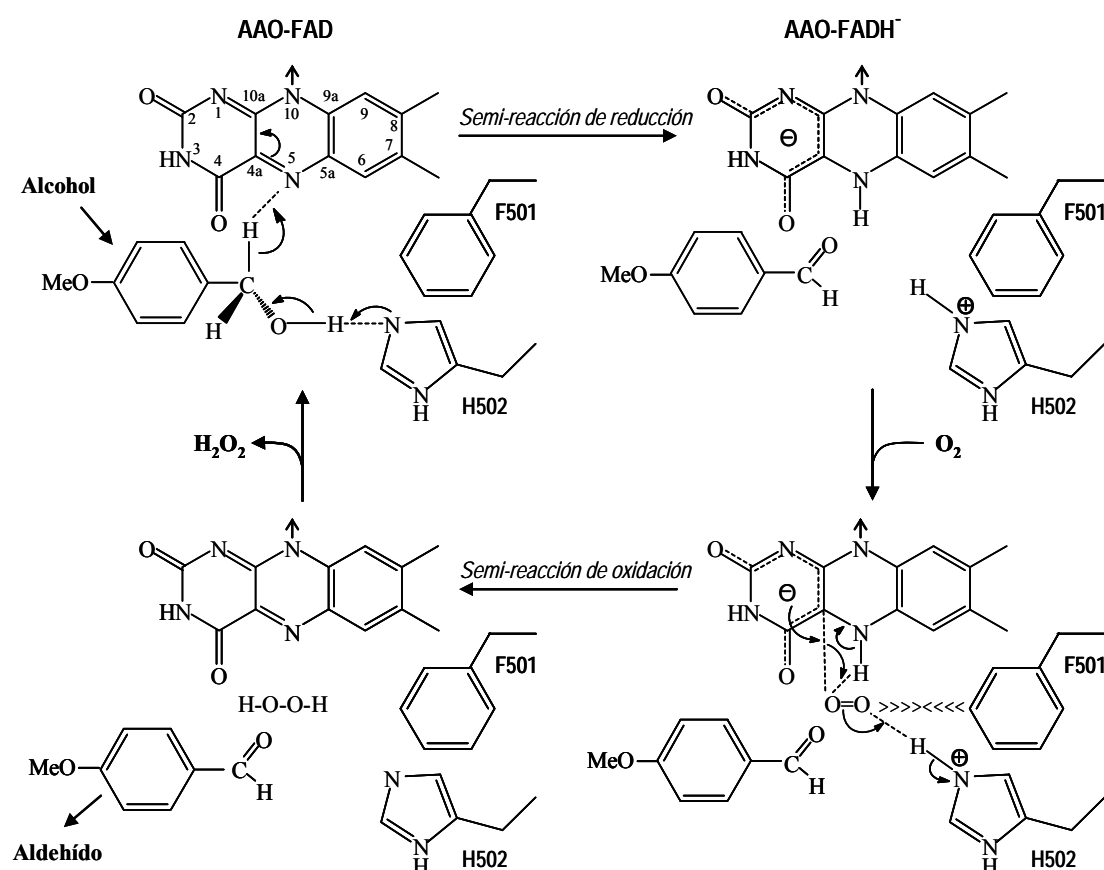


Figura 6. Esquema del ciclo catalítico de la AAO incluyendo ambas semi-reacciones. Durante la semi-reacción de reducción (**arriba**) el protón del grupo hidroxilo del sustrato (alcohol *p*-metoxibencílico en este caso) es abstraído por la His502 que actúa como base, y de forma concertada se transfiere uno de los hidrógenos del carbono- α del alcohol (como un hidruro), dando lugar a la reducción del cofactor y al producto de la reacción (aldehído). Durante la semi-reacción de oxidación (**abajo**) el oxígeno es reducido mediante transferencia de dos electrones de la flavina (C4a) con la contribución de la Phe501 que fuerza al oxígeno a aproximarse al C4a y a la His502, dando lugar a la reoxidación de la flavina y a la formación de H₂O₂.

favorece la acción de la enzima. Las tasas de oxidación de los diferentes alcoholes bencílicos están notablemente afectadas por la naturaleza, posición y número de sustituyentes del anillo aromático. En general, los sustituyentes donadores de electrones (como los grupos metoxilo) promueven la oxidación de los alcoholes por la AAO, como se esperaba, mientras que los sustituyentes aceptores de electrones (como los grupos nitro) producen el efecto opuesto.

Tal y como fue descrito por primera vez por Guillén et al. (1992), la AAO es capaz de oxidar algunos aldehídos aromáticos, aunque la máxima actividad de la enzima (obtenida para el 4-nitrobenzaldehído) es únicamente un ~5% respecto a la oxidación del alcohol bencílico (**Tabla 2**). Curiosamente, los sustituyentes aceptores de electrones promueven la oxidación de los aldehídos por la AAO, mientras que los donadores de electrones producen el efecto opuesto, en contraste con lo observado durante la oxidación de los alcoholes. Sin embargo, en el reciente trabajo de Ferreira et al. (2010) se observó que la actividad de la AAO se correlaciona con el grado de hidratación de los diferentes aldehídos en medio acuoso (dando lugar a las correspondientes formas *gem*-diol), estimado mediante ¹H-NMR. Esta circunstancia, junto con el hecho de que en el centro activo de la AAO no hay ningún residuo capaz activar el aldehído, sugirió que la molécula de agua actúa como activante durante la oxidación de aldehídos por la AAO. Por el contrario, en la aldehído deshidrogenasa un residuo de cisteína es responsable de la formación de un aducto tiohemiacetal con el sustrato (Marchal y Branlant, 1999). Sin embargo, la AAO no es una excepción ya que también se ha descrito la oxidación de aldehídos hidratados en la alcohol oxidasa de *D. melanogaster* (Eisses, 1989) y en la colina oxidasa bacteriana (Fan *et al.*, 2006).

Tabla 2

Actividades de la AAO frente a diferentes alcoholes arílicos (izquierda) y los correspondientes aldehídos (derecha), relativas al alcohol bencílico^a

Alcoholes		Aldehídos	
Bencílico	100	Benzaldehído	0.86
3-Metoxibencílico	100	3-Metoxibenzaldehído	0.85
4-Metoxibencílico	571	4-Metoxibenzaldehído	0.03
2,4-Dimetoxibencílico	178	2,4-Dimetoxibenzaldehído	nd
Veratrílico	326	Veratraldehído	0.01
4-Hidroxibencílico	< 5	4-Hidroxibenzaldehído	nd
4-Hidroxi-3-metoxibencílico	< 5	4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído	nd
4-Nitrobencílico	9	4-Nitrobenzaldehído	4.77
β-Naftilmetanol	746	β-Naftaldehído	nd
Cinamílico	451	Cinamaldehído	0.38
4-Metoxicinamílico	< 5	4-Metoxicinamaldehído	0.01

^aAdaptado de Guillén et al. (1992) (estimado como consumo de oxígeno); nd, no detectado

La oxidación de los aldehídos por la AAO tiene lugar tal y como se describe en la **Figura 7B**. En primer lugar ocurre la hidratación del aldehído dando lugar a la forma *gem*-diol, que posteriormente es oxidada a través de un mecanismo análogo al descrito para la oxidación de los alcoholes (**Figura 7A**). Los estudios de mutagénesis dirigida y KIE del

solvente empleando el *p*-nitrobenzaldehído como sustrato, sugieren que tiene lugar una transferencia de protón de uno de los hidroxilos del *gem*-diol a la His502 (el mismo residuo que actúa como base catalítica activando los alcoholes) de forma concertada con la transferencia de hidruro a la flavina (con un valor de KIE del solvente similar al observado durante la oxidación de ambos tipos de sustratos) (Ferreira *et al.*, 2010). Por tanto, podemos concluir que el mecanismo catalítico durante la oxidación de aldehídos aromáticos (en su forma *gem*-diol) es el mismo que tiene lugar durante la oxidación de los alcoholes. Las diferencias de especificidad observadas (en términos de la actividad de la AAO frente a aldehídos con sustituyentes dadores o aceptores de electrones) no están relacionadas con la oxidación por la enzima, sino con el paso previo de hidratación, favorecido por la presencia de sustituyentes aceptores de electrones en el anillo aromático que promueven la incorporación del hidroxilo del agua al carbono- α del aldehído.

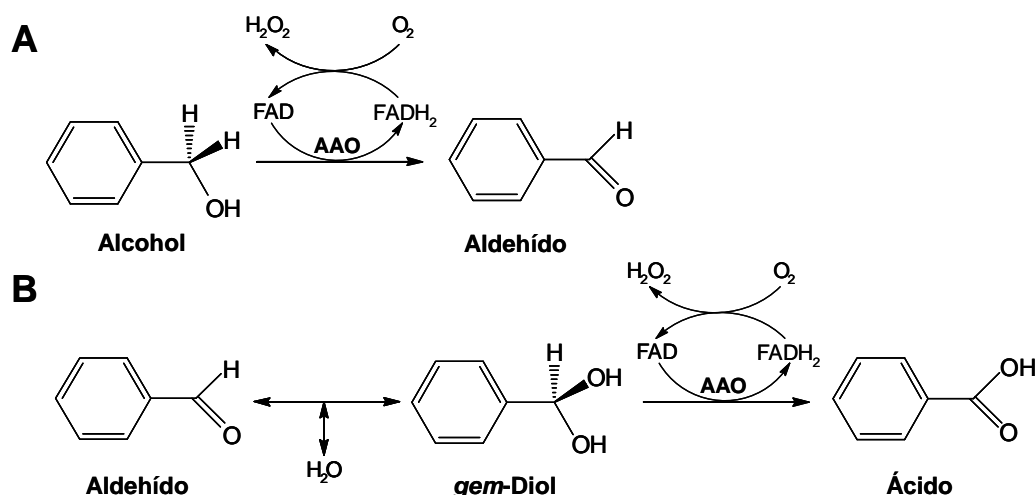


Figura 7. Esquema de las reacciones catalizadas por la AAO. La AAO oxida típicamente alcoholes aromáticos a sus correspondientes aldehídos (A), pero también puede oxidar aldehídos aromáticos a sus correspondientes ácidos (B). Esta última reacción ocurre a través de la forma *gem*-diol originada por la hidratación de los aldehídos. Durante la oxidación del alcohol (o *gem*-diol) por el FAD oxidado, se genera H₂O₂ por la reducción del O₂ (durante la reoxidación del FAD) tanto en A como en B.

7. Interés biotecnológico de la AAO : síntesis de aromáticos y estereoselectividad enzimática

La demanda de productos de origen natural por parte de los consumidores ha generado un nuevo interés en la producción biotecnológica de aromatizantes naturales (Krings y Berger, 1998). Entre los productores potenciales de aromatizantes, los hongos de podredumbre

blanca podrían considerarse como los microorganismos más versátiles (Lapadatescu *et al.*, 2000; Fraatz y Zorn, 2011). Estos hongos son capaces de producir dos de los aromatizantes químicos más importantes: la vainillina y el benzaldehído. Otro saborizante aromático, el *p*-anisaldehído (junto a sus derivados halogenados) es también sintetizado por especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*, donde participa en la producción H_2O_2 para la biodegradación de lignina (**Figura 2**) a través de la acción concertada de la AAO y deshidrogenasas aromáticas asociadas al micelio (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994; de Jong *et al.*, 1994a).

En la actualidad, la vainillina es producida mayoritariamente mediante síntesis química a partir de precursores petroquímicos, ya que su producción a partir de la depolimerización alcalina de los lignosulfonatos (Wünning, 2001) está disminuyendo debido a motivos medioambientales (que han dado lugar al uso generalizado del método *kraft* para la obtención de pasta de papel a nivel mundial) y a que la vainillina natural de la planta *Vanilla planifolia* sólo es capaz de generar un pequeño porcentaje del consumo mundial. Sin embargo, existen alternativas medioambientales disponibles (Priefert *et al.*, 2001) que incluyen la posibilidad de emplear hongos de podredumbre blanca y sus enzimas. Tal y como se ilustra en la **Figura 2**, la vainillina es el primer producto generado a partir de la ruptura enzimática ($C\alpha$ - $C\beta$) de las subunidades (tipo guayacilo) de la lignina de gimnospermas, a través de la acción sinérgica de las enzimas oxidantes de lignina (lignina peroxidasa y peroxidasa versátil) y las enzimas productoras de peróxido de hidrógeno (AAO y otras oxidasas) (mientras que la lignina de angiospermas daría lugar a vainillina y siringaldehído) (Kirk y Farrell, 1987). Se han depositado diversas patentes relacionadas con estas biotransformaciones (Gross *et al.*, 1993), aunque los procesos aún no han sido optimizados.

Por otro lado, se han sugerido otros compuestos precursores de la vainillina, de origen renovable y bajo coste, tales como el ácido ferúlico y especialmente el eugenol (Priefert *et al.*, 2001). Recientemente se han sugerido dos estrategias diferentes para la producción biotecnológica de vainillina a partir de los compuestos anteriores, empleando organismos modificados o sus enzimas. La primera estrategia implica la modificación genética de cepas de *Rhodococcus* mediante la introducción de los genes del metabolismo del ácido ferúlico, para que sean capaces de iniciar la transformación del eugenol (Plaggenborg *et al.*, 2006) o la modificación de *Pseudomonas fluorescens* mediante la inactivación de los genes implicados en la oxidación de la vainillina (Di Gioia *et al.*, 2011). La segunda estrategia consiste en el empleo de la enzima nativa o las variantes evolucionadas de la vainillil-alcohol oxidasa, una enzima que comparte propiedades catalíticas con la AAO aunque pertenece a una familia diferente. Esta enzima se ha mejorado para que sea capaz de oxidar dos

precursores baratos de la vainillina, el creosol y la vanillilamina, derivados de precursores petroquímicos y de origen renovable, respectivamente (van den Heuvel *et al.*, 2001; 2004). Curiosamente, la AAO de *B. adusta* puede oxidar el alcohol vainillílico a vainillina de forma tan eficiente como la vainillil-alcohol oxidasa, aunque la actividad de ambas enzimas sobre otros sustratos es diferente (Fraaije *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 2009). Una ventaja adicional de la producción de vainillina a partir de los algunos de los procesos anteriores es que puede ser considerada como una vainillina “casi natural”, obtenida a partir de una materia prima de original natural (lignocelulosa) mediante un proceso biológico (en lugar de químico).

Por otro lado, la transformación fúngica de la L-fenilalanina da lugar al benzaldehído anteriormente mencionado, junto a un amplio espectro de metabolitos arílicos fenólicos y no-fenólicos de interés industrial, tal y como se observado en el hongo *B. adusta* (Lapadatescu *et al.*, 2000). Tras la formación del ácido trans-cinámico a partir de la L-fenilalanina por la acción de la amonio-liasa, existen dos posibles rutas metabólicas para los compuestos bencílicos que implican (1) una α -oxidación en la que el benzaldehído y el alcohol bencílico son los metabolitos bencílicos mayoritarios, y (2) una β -oxidación que da lugar a ácido benzoico. Posteriormente, el ácido benzoico, el benzaldehído y el alcohol bencílico pueden ser hidroxilados y metilados dando lugar a los diferentes metabolitos metoxibencílicos, cuyo estado redox queda finalmente determinado por el nivel de actividad de la AAO. Las transformaciones anteriores de la L-fenilalanina pueden emplearse para la producción de aromatizantes, siendo los alcoholes arílicos los principales metabolitos aromáticos producidos en esta ruta, tal y como se ha descrito para *B. adusta* (alcohol bencílico) (Lapadatescu *et al.*, 2000) y *P. chrysosporium* (alcohol veratrílico) (Jensen *et al.*, 1994) entre otros hongos. Por tanto, estas transformaciones microbiológicas pueden combinarse con diferentes tratamientos con AAO para obtener el benzaldehído, y otros aldehídos aromáticos. De forma alternativa, pueden modificarse las condiciones del cultivo del hongo para incrementar los niveles de producción de aldehído, tal y como se ha descrito durante el crecimiento de *B. adusta* en presencia de L-fenilalanina y lecitina, compuestos que promueven la producción simultánea de la AAO y el benzaldehído por el hongo (Lapadatescu *et al.*, 1999). Curiosamente, la AAO de *B. adusta* posee actividad sobre alcoholes (*para*) bencílicos tanto fenólicos como no fenólicos (Romero *et al.*, 2009) y por tanto, puede ser interesante para la producción ambos tipos de aldehídos aromáticos, fenólicos (vainillina) y no fenólicos (benzaldehído).

Se han investigado activamente las transformaciones enantioselectivas, que incluyen la utilización de enzimas oxidativas, para su empleo en una variedad de reacciones asimétricas de alto interés comercial (por ejemplo, más de la mitad de las sustancias con un potencial interés farmacéutico

poseen centro quirales) (Carey *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2009). Los alcoholes secundarios quirales (incluyendo alcoholes bencílicos) son ampliamente empleados como intermediarios sintéticos, auxiliares quirales y reactivos analíticos.

Estudios recientes en los que se han utilizado las formas α -monodeuteradas (enantiómeros *R* y *S*) del alcohol *p*-metoxibencílico, han mostrado que la abstracción del hidruro del alcohol por la AAO es estereoselectiva (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Este resultado está relacionado con el mecanismo de transferencia concertada de hidruro y protón encontrado para la AAO (Ferreira *et al.*, 2009) en contraste con el mecanismo secuencial descrito para otras oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008), así como la posición del alcohol *p*-metoxibencílico tras el *docking* molecular en el centro activo de la AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Las reacciones redox asimétricas han sido descritas en otras flavoenzimas, como la vainillil-alcohol oxidasa (van den Heuvel *et al.*, 1998; 2000) pero por lo que sabemos, esta es la primera vez que se describe la oxidación enantioselectiva de un alcohol por un miembro de la superfamilia GMC.

Recientemente (Hernández-Ortega *et al.*, 2012) se ha encontrado que la estereoselectividad de la AAO, durante la abstracción de hidruro de los alcoholes aromáticos primarios (no quirales), se mantiene cuando se emplean alcoholes aromáticos secundarios (quirales), aunque la actividad de la AAO sobre estos últimos es varios ordenes de magnitud más baja. El *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico sobre la estructura cristalográfica de la enzima muestra porque la AAO es incapaz de unir alcoholes secundarios eficientemente. El pequeño espacio disponible en la cavidad del centro activo de la AAO restringe la presencia de sustituyentes en la posición pro-*S* del carbono- α . De esta forma, para mejorar la unión de alcoholes secundarios por la AAO es necesario incrementar el tamaño del centro activo. Por tanto, se podría emplear una variante de la AAO mejorada en este sentido para la desracemización de mezclas de alcoholes secundarios (permitiendo la purificación del único enantiómero que no ha sido oxidado por la enzima). La galactosa oxidasa (Minasian *et al.*, 2004) ha sido también estudiada para la desracemización de alcoholes quirales debido a su estereoselectividad, obteniéndose una variante mejorada tras diversas rondas de evolución dirigida (Escalettes y Turner, 2008). La AAO es altamente estereoselectiva frente a los alcoholes primarios y, por tanto, su utilización para la desracemización enzimática no requeriría la introducción de estereoselectividad, tal y como se ha intentado frecuentemente con otros catalizadores industriales, sino extender su actividad a alcoholes secundarios mediante el diseño racional a través de mutagénesis dirigida.

8. Bibliografía

- Aguilar, C., Urzúa, U., Koenig, C. y Vicuña, R. (1999) Oxalate oxidase from *Ceriporiopsis subvermispora*: Biochemical and cytochemical studies. Arch. Biochem. Biophys. 366: 275-282.
- Bannwarth, M., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D., Giffhorn, F. y Schulz, G.E. (2004) Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. Biochemistry 43: 11683-11690.
- Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1998) Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 325-332.
- Borrelli, K.W., Vitalis, A., Alcantara, R. y Guallar, V. (2005) PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. J. Chem. Theory Comput 1: 1304-1311.
- Bright, H.J. y Appleby, M. (1969) The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. J. Biol. Chem. 244: 3625-3634.
- Camarero, S., Böckle, B., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1996) Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1070-1072.
- Carey, J.S., Laffan, D., Thomson, C. y Williams, M.T. (2006) Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. Org. Biomol. Chem. 4: 2337-2347.
- Cavener, D.R. (1992) GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. J. Mol. Biol. 223: 811-814.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubátová, E. y Halada, P. (2007) Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6241-6253.
- Daniel, G., Volc, J. y Kubátová, E. (1994) Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2524-2532.
- de Jong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994a) Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. Appl. Environ. Microbiol. 60: 271-277.

- de Jong, E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994b) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 153-188.
- Di Gioia, D., Luziatelli, F., Negroni, A., Ficca, A.G., Fava, F. y Ruzzi, M. (2011) Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *J. Biotechnol.* Online DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.014
- Dreveny, I., Andryushkova, A.S., Glieder, A., Gruber, K. y Kratky, C. (2009) Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. *Biochemistry* 48: 3370-3377.
- Dym, O. y Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10: 1712-1728.
- Eisses, K.T. (1989) On the oxidation of aldehydes by alcohol-dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* - Evidence for the gem-diol as the reacting substrate. *Bioorg. Chem.* 17: 268-274.
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., Volc, J. y Musílek, V. (1986) Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 257-262.
- Escalettes, F. y Turner, N.J. (2008) Directed evolution of galactose oxidase: Generation of enantioselective secondary alcohol oxidases. *ChemBioChem* 9: 857-860.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 235-240.
- Faison, B.D. y Kirk, T.K. (1983) Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1140-1145.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005) On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fan, F., Germann, M.W. y Gadda, G. (2006) Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* 45: 1979-1986.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. y Russell, J.D. (1960) Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem. J.* 74: 257-262.

- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Forney, L.J., Reddy, C.A., Tien, M. y Aust, S.D. (1982) The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 257: 11455-11462.
- Fraaije, M.W., Veeger, C. y van Berkel, W.J.H. (1995) Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from allylphenols. *Eur. J. Biochem.* 234: 271-277.
- Fraatz, M.A. y Zorn, H. (2011) Fungal flavours. En: *The Mycota. X Industrial applications.* (Ed.: Hofrichter, M.), Springer, Berlin, pp. 249-268.
- Gadda, G. (2003) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Gallagher, I.M., Fraser, M.A., Evans, C.S. y Atkey, P.T. (1989) Ultrastructural localization of lignocellulose-degrading enzymes. En: *ACS Symposium*

"Plant Cell-Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation", Vol 399. (Eds.: Lewis, N.G. y Paice, M.G.), Amer.Chem.Soc.,pp. 426-442.

- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Goetghebeur, M., Brun, S., Galzy, P. y Nicolas, M. (1993) Benzyl Alcohol Oxidase and Laccase Synthesis in *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1380-1381.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F. (2009) Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3944-3953.
- Green, F., Clausen, C.A., Larsen, M.J. y Highley, T.L. (1992) Immuno-scanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Can. J. Microbiol.* 38: 898-904.
- Greene, R.V. y Gould, J.M. (1984) Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 437-443.
- Gross, B., Asther, M., Corrieu, G. y Brunerie, P. (1993) Production of vanillin by bioconversion of benzenoid precursors by *Pycnoporus*. Patent (USA) 5262315:
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 142-147.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 465-469.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209: 603-611.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 465-470.

- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Hallberg, B.M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434.
- Hammel, K.E. y Cullen, D. (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 349-355.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A.Jr. y Ryan, Z.C. (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 445-453.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011a) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, M.J., Romero, A. y Martínez, A.T. (2008) Discriminating the role of His502 and His546 in the catalysis of aryl-alcohol oxidase. En: *Flavins and flavoproteins 2008*. (Eds.: Frago, S., Gómez-Moreno, C. y Medina, M.), Prensas Universitarias, Zaragoza, pp. 303-308.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Merino, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2012) Stereoselective hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. *ChemBioChem* 13: 427-435.
- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2011b) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-41114.
- Higuchi, T. (1997) *Biochemistry and molecular biology of wood*. Springer Verlag, London.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. y Foust, T.D. (2007) Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804-807.

- Iwahara, S., Nishihira, T., Jomori, T., Kuwahara, M. y Higuchi, T. (1980) Enzymic oxidation of α,β -unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. *J. Ferment. Technol.* 58: 183-188.
- Jensen, K.A.Jr., Evans, K.M.C., Kirk, T.K. y Hammel, K.E. (1994) Biosynthetic pathway for veratryl alcohol in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 709-714.
- Kerem, Z., Jensen, K.A. y Hammel, K.E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Lett.* 446: 49-54.
- Kersten, P. y Cullen, D. (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 44: 77-87.
- Kersten, P.J. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2936-2940.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.
- Kiess, M., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* 252: 90-99.
- Kimura, Y., Asada, Y. y Kuwahara, M. (1990) Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 436-442.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kittl, R., Sygmund, C., Halada, P., Volc, J., Divne, C., Haltrich, D. y Peterbauer, C.K. (2008) Molecular cloning of three pyranose dehydrogenase-encoding genes from *Agaricus meleagris* and analysis of their expression by real-time RT-PCR. *Curr. Genetics* 53: 117-127.
- Krings, U. y Berger, R.G. (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 1-8.
- Kujawa, M., Ebner, H., Leitner, C., Hallberg, B.M., Prongjit, M., Sucharitakul, J., Ludwig, R., Rudsander, U., Peterbauer, C., Chaiyen, P., Haltrich, D. y Divne, C. (2006) Structural basis for substrate binding and regioselective

- oxidation of monosaccharides at C3 by pyranose 2-oxidase. *J. Biol. Chem.* 281: 35104-35115.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Djian, A., Spinnler, H.E., Le Quéré, J.-L. y Bonnarme, P. (1999) Regulation of the synthesis of aryl metabolites by phospholipid sources in the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Arch. Microbiol.* 171: 151-158.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quéré, J.-L. y Bonnarme, P. (2000) Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1517-1522.
- Lario, P.I., Sampson, N. y Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J. Mol. Biol.* 326: 1635-1650.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J. y Pericin, D. (2005) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 731-750.
- Lundell, T.K., Leonowicz, A., Mohammadi, O.K. y Hatakka, A.I. (1990) Metabolism of veratric acid by lignin-degrading white-rot fungi. En: *Biotechnology in pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations.* (Eds.: Kirk, T.K. y Chang, H.), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 401-409.
- Lyubimov, A.Y., Lario, P.I., Moustafa, I. y Vrielink, A. (2006) Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. *Nat. Chem. Biol.* 2: 259-264.
- Marchal, S. y Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38: 12950-12958.
- Martínez, A.T., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Jiménez-Barbero, J. y del Río, J.C. (2008) Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D NMR study. *Phytochemistry* 69: 2831-2843.
- Martínez, A.T., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2011) Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by *in situ* structural analyses. *Environ. Microbiol.* 13: 96-107.

- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D.S., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuña, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R. y Cullen, D. (2009) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T. y Sannia, G. (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270: 3823-3827.
- Matsuda, T., Yamanaka, R. y Nakamura, K. (2009) Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron-Asymmetry* 20: 513-557.
- Minasian, S.G., Whittaker, M.M. y Whittaker, J.W. (2004) Stereoselective hydrogen abstraction by galactose oxidase. *Biochemistry* 43: 13683-13693.
- Muheim, A., Leisola, M.S.A. y Schoemaker, H.E. (1990) Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *J. Biotechnol.* 13: 159-167.
- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J., Schoemaker, H.E. y Leisola, M.S.A. (1991) Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 195: 369-375.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2166-2174.

- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9: 325-338.
- Otjen, L. y Blanchette, R.A. (1986) A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 64: 905-911.
- Plaggenborg, R., Overhage, J., Loos, A., Archer, J.A.C., Lessard, P., Sinskey, A.J., Steinbüchel, A. y Priefert, H. (2006) Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 745-755.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. y Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 296-314.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. y Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. y Tschaplinski, T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H. y Boerjan, W. (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* 3: 29-60.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.
- Romero, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2010) Molecular characterization of a new flavooxidase from a *Bjerkandera adusta* anamorph. *Proc. OESIB, Santiago de Compostela, 14-15 September*(Eds, G. Feijoo and M.T. Moreira; ISBN-13: 978-84-614-2824-3) pp 86-91.
- Rotsaert, F.A.J., Renganathan, V. y Gold, M.H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 42: 4049-4056.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.

- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* 60: 441-452.
- Rungsririyachai, K. y Gadda, G. (2008) On the role of histidine 351 in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 47: 6762-6769.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Lú-Chau, T., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technol.* 102: 7500-7506.
- Sannia, G., Limongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. y Giardina, P. (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073: 114-119.
- Schwarze, F.W.M.R., Engels, J. y Mattheck, C. (2000) Fungal strategies of decay in trees. Springer, Berlin.
- Shimada, M. y Higuchi, T. (1991) Microbial, enzymatic and biomimetic degradation of lignin. En: *Wood and cellulosic chemistry*. (Eds.: Hon, D.N.S. y Shiraishi, N.), Marcel Dekker, N.Y., pp. 557-619.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- van den Heuvel, R.H., Fraaije, M.W., Ferrer, M., Mattevi, A. y van Berkel, W.J. (2000) Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9455-9460.
- van den Heuvel, R.H., Fraaije, M.W., Laane, C. y van Berkel, W.J. (2001) Enzymatic synthesis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2954-2958.
- van den Heuvel, R.H.H., Fraaije, M.W., Laane, C. y van Berkel, W.J.H. (1998) Regio- and stereospecific conversion of 4-alkylphenols by the covalent flavoprotein vanillyl-alcohol oxidase. *J. Bacteriol.* 180: 5646-5651.
- van den Heuvel, R.H.H., van den Berg, W.A.M., Rovida, S. y van Berkel, W.J.H. (2004) Laboratory-evolved vanillyl-alcohol oxidase produces natural vanillin. *J. Biol. Chem.* 279: 33492-33500.

- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martínez, D. y Cullen, D. (2009) Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4058-4068.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2000a) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim. Biophys. Acta* 1476: 129-138.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000b) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1988) Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 400-407.
- Weibel, M.K. y Bright, H.J. (1971) The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.* 246: 2734-2744.
- Wierenga, R.K., Drenth, J. y Schulz, G.E. (1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD - as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 167: 725-739.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (2000) Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.
- Wohlfahrt, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, D. y Leskovac, V. (2004) The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell Biochem.* 260: 69-83.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. y Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D* 55: 969-977.
- Wünning, P. (2001) Applications and use of lignin as raw material. En: *Biopolymers. Lignin, humic substances and coal.* (Eds.: Hofrichter, M. y Steinbüchel, A.), Wiley -VCH, Weinheim, pp. 117-127.

- Yelle, D.J., Wei, D.S., Ralph, J. y Hammel, K.E. (2011) Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in wood decayed by the brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.* 13: 1091-1100.
- Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B.M., Divne, C., Nishino, T. y Samejima, M. (2001) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2050-2057.
- Yue, Q.K., Kass, I.J., Sampson, N.S. y Vrielink, A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry* 38: 4277-4286.
- Zabel, R. y Morrell, J. (1992) *Wood microbiology: Decay and its prevention*. Academic Press, London.
- Zámocký, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C. y Haltrich, D. (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* 338: 1-14.

CAPÍTULO 2

La aril-alcohol oxidasa implicada en la degradación de lignina: un estudio del mecanismo basado en cinéticas de estado estacionario y transitorio y efectos isotópicos cinéticos primarios y del solvente con dos alcoholes como sustratos*

Resumen. La aril-alcohol oxidasa (AAO) es una flavoproteína miembro de la familia de oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas). La AAO está implicada en la degradación fúngica de la lignina, un proceso de alta relevancia ecológica y biotecnológica, a través de la generación del peróxido de hidrógeno requerido por las peroxidasas ligninolíticas. En las especies de *Pleurotus*, este peróxido es generado a través de un ciclo redox mediado por el *p*-anisaldehído, un metabolito fúngico extracelular. Además del alcohol *p*-anisílico (*p*-metoxibencílico), la AAO es capaz de oxidar otros alcoholes primarios poliinsaturados. En este estudio, se investigó el mecanismo de reacción de la AAO empleando los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol como sustratos modelo. Las constantes cinéticas de estado estacionario y el *turnover* son consistentes con un mecanismo ternario, donde el oxígeno reacciona con la enzima reducida, antes del liberar el producto (aldehído). Los análisis cinéticos de estado transitorio mostraron que la semi-reacción de reducción es la etapa limitante e irreversible en las reacciones catalizadas con estos sustratos. Los efectos isotópicos cinéticos del sustrato y del solvente determinados tanto para el estado estacionario como el transitorio (este último mostrando una reducción 9 veces más lenta al emplear alcoholes α -dideuterados como sustratos y 13 veces más lenta cuando se evaluaron simultáneamente los efectos isotópicos del sustrato y el solvente) revelaron un mecanismo concertado en donde la transferencia del hidruro desde el carbono- α del sustrato al FAD y la abstracción del protón del grupo hidroxilo ocurren de forma simultánea. Este resultado difiere significativamente del mecanismo general propuesto para otros miembros de la familia de oxidorreductasas GMC, que implica una transferencia de hidruro no concertada desde un radical alcóxido previamente estabilizado.

*Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 2480-2487.

1. INTRODUCCIÓN

La madera y otras materias primas lignocelulósicas son la mayor fuente de materiales renovables del planeta. Los basidiomicetos de la podredumbre blanca son esenciales en el ciclo del carbono en bosques y otros ecosistemas terrestres debido a su capacidad de degradar la lignina a dióxido de carbono y agua. Esta capacidad confiere a estos hongos y a sus enzimas ligninolíticas un gran interés para su aplicación en procesos industriales, tales como, la producción de bioetanol o pasta de papel, donde la eliminación de la lignina es un paso previo esencial para el empleo de los materiales lignocelulósicos en las biorefinerías como fuente de energías renovables, productos químicos y materiales (Martínez *et al.*, 2005).

La enzima aril-alcohol oxidasa (AAO) es una flavoproteína extracelular (Guillén *et al.*, 1992) que, en colaboración con aril-alcohol deshidrogenasas asociadas a micelio, participa en la degradación de la lignina llevada a cabo por basidiomicetos de la podredumbre blanca, tales como especies de *Pleurotus* (o *Bejerkandera*), mediante la producción de peróxido de hidrogeno a través de un ciclo redox de metabolitos fúngicos aromáticos, como el *p*-anisaldehido (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994). El peróxido de hidrógeno es utilizado como sustrato por las peroxidasas fúngicas de alto potencial redox responsables de la degradación oxidativa de la lignina (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009).

La primera AAO clonada fue la de *Pleurotus eryngii* (Varela *et al.*, 1999), un hongo de alto interés biotecnológico por su capacidad de degradar la lignina selectivamente (Martínez *et al.*, 1994). Su secuencia de aminoácidos, reveló una homología moderada con respecto a la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Frederick *et al.*, 1990), una flavoenzima que pertenece también a la familia de oxidorreductasas GMC. El modelo molecular de la AAO (Varela *et al.*, 2000), basado en la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa (Hecht *et al.*, 1993), presenta una topología similar a la de otros miembros de la familia GMC como la colina oxidasa bacteriana, la hidroxinitrilo liasa de almendra (una liasa con estructura de oxidorreductasa), y otras flavoenzimas extracelulares presentes en hongos de podredumbre blanca como la piranosa-2 oxidasa y la celobiosa deshidrogenasa (Dreveny *et al.*, 2001; Hallberg *et al.*, 2002; Lario *et al.*, 2003; Bannwarth *et al.*, 2004; Quaye *et al.*, 2008). Todas las proteínas de la familia de oxidorreductasas GMC presentan dos residuos de histidina altamente conservados, His502 e His546 en la AAO de *P. eryngii* (el segundo residuo es una asparagina en algunas de estas proteínas), implicados en la actividad catalítica de estas enzimas (Varela *et al.*, 2000).

Para los estudios de caracterización realizados en este trabajo se ha utilizado una AAO recombinante de *P.eryngii* expresada heterológamente en *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006). La AAO presenta una amplia

especificidad de sustrato, catalizando reacciones de deshidrogenación oxidativa de alcoholes insaturados con un hidroxilo en el carbono- α . Además de alcoholes bencílicos, su centro activo es capaz de unir y oxidar alcoholes alifáticos poliinsaturados primarios (como el 2,4-hexadien-1-ol), alcoholes naftílicos y cinamílicos. La AAO también presenta una actividad aldehído oxidasa. (Ferreira *et al.*, 2005). Sin embargo, alcoholes saturados como el metanol no son sustratos de esta enzima que además cataliza una lenta reacción de oxidación de alcoholes alílicos monoinsaturados.

Se ha sugerido que el mecanismo catalítico de la AAO tiene lugar mediante un ataque electrofílico y transferencia directa de un hidruro a la flavina (Ferreira *et al.*, 2005). Estudios recientes de mutagénesis dirigida han confirmado el estricto requerimiento durante la catálisis de los residuos His502 y His546, próximos al anillo del isoaloxazina del FAD, así como la implicación de dos residuos aromáticos (Ferreira *et al.*, 2006). A continuación se muestra el primer estudio del mecanismo de reacción de la AAO, en donde los análisis del efecto isotópico cinético (KIE) del sustrato y del solvente en estado estacionario y transitorio, han permitido describir el mecanismo catalítico de esta flavoenzima. Para ello se han empleado dos sustratos modelo, el alcohol *p*-metoxibencílico, sustrato natural de AAO, y el alcohol alifático 2,4-hexadien-1-ol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Los alcoholes *p*-metoxibencílico, *m*-fluorobencílico y 2,4-hexadien-1-ol fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. También fueron suministrados por Sigma-Aldrich el hidróxido de sodio deuterado, y el agua deuterada (99.9%). Los alcoholes deuterados *p*-[α - $^2\text{H}_2$]-metoxibencílico ([1,1- $^2\text{H}_2$]1-(4'-metoxifenil)-metanol), y el [α - $^2\text{H}_2$]-2,4-hexadien-1-ol ([1,1- $^2\text{H}_2$]2,4-hexadien-1-ol) fueron sintetizados en el Instituto de Ciencias de los Materiales de Aragón (CSIC, Universidad de Zaragoza).

2.2 Producción de la enzima recombinante

La AAO recombinante de *P. eryngii* fue obtenida mediante expresión heteróloga del cDNA que codifica para la proteína madura en la cepa W3110 de *E. coli* (GenBankTM AF064069). La proteína producida en forma insoluble, tras un proceso de plegado *in vitro* en presencia del cofactor, se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico según el protocolo descrito por Ruiz-Dueñas *et al.* (2006).

2.3 Espectros y parámetros cinéticos de estado transitorio

Los espectros de absorción y las cinéticas de estado estacionario fueron determinados en un espectrofotómetro Cary 100 Bio. La concentración de enzima utilizada fue calculada usando el coeficiente de extinción molar de la AAO-FAD previamente calculado ($\epsilon_{463} = 11050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006).

Las medidas de actividad enzimática en estado estacionario se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación de los alcoholes utilizados como sustratos (alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol) a sus correspondientes aldehídos (Ferreira *et al.*, 2005). Las cinéticas bisustrato se determinaron variando las concentraciones de ambos sustratos, alcohol y oxígeno. Los ensayos se realizaron en cubetas selladas con un septo de silicona donde se equilibra la mezcla de reacción a la concentración de oxígeno deseada (0.15, 0.32, 0.67 y 1.52 mM) mediante burbujeo de la correspondiente mezcla comercial de O₂/N₂ durante 10-15 min. La reacción enzimática se iniciaba mediante la adición del sustrato a la concentración deseada (5-10 μL) y 0.03 μM de enzima (concentración final), para un volumen final de 1.5 mL en tampón fosfato 0.1 M (pH 6) a 12 °C. Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el ajuste de las velocidades iniciales (a distintas concentraciones de alcohol) a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1), utilizando el programa SigmaPlot versión 11 (Systat. Software. Inc. Richmond, CA, USA). En las cinéticas bisustrato los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste las velocidades iniciales a la ecuación 2, que describe un mecanismo ternario:

$$\frac{v}{e} = \frac{{}^{app}k_{cat}S}{{}^{app}K_{m(Al)} + S} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}SB}{K_{m(Ox)}S + K_{m(Al)}B + SB + K_d K_{m(Ox)}} \quad \text{Ec. 2}$$

donde, e representa la concentración de enzima, k_{cat} es la tasa de recambio máxima (constante catalítica aparente, ${}^{app}k_{cat}$, si no se emplean concentraciones saturantes de ambos sustratos), S es la concentración del alcohol, B es la concentración de oxígeno, $K_{m(Al)}$ y $K_{m(Ox)}$ son las constantes de Michaelis para el alcohol y el O₂, respectivamente, y K_d es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

La dependencia de la actividad en función del pH (4-9) fue estudiada a 25°C empleando alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato bajo distintas concentraciones de oxígeno (0.13, 0.27, 0.56 y 1.3 mM). Las medidas de

actividad se realizaron en tampón citrato fosfato 0.1 M para el rango de pH 4-7 y pirofosfato 0.1 M para el rango de pH 8-9. La dependencia de la $^{app}k_{cat}$ del pH se determinó mediante el ajuste de las velocidades iniciales a la ecuación 3, que describe un perfil de pH con una pendiente negativa y una meseta a valores bajos de pH:

$$\log ^{app} k_{cat} = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH}}} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

donde C es el valor independiente de pH del parámetro cinético de interés, y pK_a es el valor de pK_a del residuo cuya protonación favorece la reacción.

2.4 Estudios de inhibición

La constante de disociación (K_d) para la formación del complejo AAO-ácido *p*-anísico fue determinada mediante técnicas de espectroscopia diferencial siguiendo los cambios en el espectro de absorción de la proteína (16 μ M) tras sucesivas titulaciones con diferentes concentraciones de ácido *p*-anísico (0-1.24 mM) en tampón fosfato 0.1 M a 25°C. Los cambios en el espectro de absorción de la AAO debido a la formación del complejo fueron ajustados a la ecuación 4:

$$\alpha = \frac{AI}{K_d + AI} \quad \text{Ec. 4}$$

donde α y A son, respectivamente, los cambios de absorbancia observado y máximo y I es la concentración del inhibidor.

Los estudios de inhibición se realizaron con ácido *p*-anísico a 25°C, en tampón fosfato 0.1 M en aerobiosis, utilizando como sustrato alcohol veratrílico. Las medidas se llevaron a cabo a diferentes valores de pH, empleando los mismos tampones indicados en el apartado anterior de esta sección. Con los datos obtenidos se realizaron gráficas de dobles recíprocos para determinar el tipo de inhibición. La constante de inhibición (K_i) fue determinada mediante ajuste no lineal de la actividad de la AAO a la ecuación 5, que describe un proceso de inhibición competitiva:

$$\frac{v}{e} = \frac{{}^{app}k_{cat}S}{{}^{app}K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad \text{Ec. 5}$$

La dependencia de la K_i respecto al pH fue ajustada a la ecuación 6.

$$\log K_i = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_a}}} \right) \quad \text{Ec. 6}$$

Esta ecuación describe una curva con una pendiente positiva y una meseta a valores altos de pH, donde el pK_a corresponde al residuo cuyo protonación favorece la unión del inhibidor.

2.5 Medidas cinéticas en flujo detenido

Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX17.MV (Applied Photophysics) usando un detector de longitud de onda fija y de diodos (350-900 nm) y los programas SX18.MV y Xscan respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6 a 12 °C.

Para los ensayos de *turnover* (Gibson *et al.*, 1964), se mezclaron volúmenes idénticos de enzima y sustrato a concentración saturante en condiciones aeróbicas y se siguió la evolución del estado redox del cofactor en función del tiempo.

La semi-reacción de reducción se estudió bajo condiciones de anaerobiosis. Las soluciones del sustrato y la enzima se prepararon por separado en tonómetros de vidrio, eliminando el oxígeno mediante ciclos sucesivos de vacío y argón. Para garantizar las condiciones de anaerobiosis durante las medidas, antes de conectar los tonómetros a las jeringas del sistema se les adicionó una solución de glucosa oxidasa ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) y glucosa (10 mM). La anaerobiosis del equipo de mezcla rápida con flujo detenido se realizó con una solución anaeróbica saturada en ditionito y posteriores lavados del sistema con el tampón anterior libre de oxígeno (Fraaije y van Berkel, 1997).

El estudio cinético de la evolución espectral del proceso de reducción de la enzima se realizó mediante análisis global y ajustes a modelos cinéticos $A \rightarrow B$ y $A \rightarrow B \rightarrow C$, siendo A, B y C las especies espectrales cuantificables macroscópicamente utilizando el programa de análisis *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd.). Estos modelos son equivalentes a las ecuaciones monoexponenciales y biexponenciales utilizadas para realizar el

análisis cinético de la evolución de la reacción a una longitud de onda (462 nm, máximo espectral de AAO en estado oxidado) y poder obtener así las constantes observadas (k_{obs}) para la reacción de reducción. Los valores de k_{obs} a diferentes concentraciones de sustrato se ajustan la ecuación 7 o 8,

$$k_{obs} = \frac{k_{red}S}{K_d + S} \quad \text{Ec. 7}$$

$$k_{obs} = \frac{k_{red}S}{K_d + S} + k_{rev} \quad \text{Ec. 8}$$

donde k_{red} y k_{rev} son las velocidades de reducción de la flavina y la reacción reversa, respectivamente y la K_d es la constante de disociación.

2.6 KIE del sustrato y del solvente

Los ensayos de KIE de estado estacionario fueron realizados en tampón fosfato 0.1 M y concentración atmosférica de oxígeno (0.273 mM de oxígeno a 25°C) tal y como se describe anteriormente, pero empleando sustratos dideuterados (alcohol *p*-[α -²H₂]-metoxibencílico y [α -²H₂]2,4-hexadien-1-ol) y/o solvente deuterado. Los perfiles de pH para la ^{app} k_{cat} y la ^{app} k_{cat}/K_m fueron estimados en un rango de pH 4-9. Para los ensayos en solvente deuterado, los componentes de la reacción fueron disueltos en tampón fosfato 0.1 M deuterado, pD 6. La AAO fue exhaustivamente dializada frente este tampón con objeto de eliminar los protones intercambiables. Los KIE del sustrato y del solvente en la semi-reacción de reducción fueron analizados a 12°C en anaerobiosis, tal y como se ha descrito anteriormente.

La ^D(k_{cat}/K_m) observada (en el mecanismo ternario descrito para la AAO) se calcula mediante la ecuación 9,

$${}^D\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right) = \frac{{}^Dk_2 + C_f + {}^DE_qC_r}{1 + C_f + C_r} \quad \text{Ec. 9}$$

donde ^D k_2 es el efecto isotópico intrínseco en la ruptura del enlace C-H del alcohol, C_f y C_r son los cocientes k_2/k_{-1} y k_3/k_{-2} (**Esquema 1**) respectivamente, y ^D E_q es efecto isotópico del equilibrio con un valor de 1.24 para la conversión del alcohol a aldehído (Cleland, 1980).

El efecto de la viscosidad del solvente se determinó utilizando diferentes concentraciones de glicerol para incrementar la viscosidad, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6 a 25°C. El efecto de la viscosidad durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico fue determinado a partir de la relación entre los valores de la ^{app} k_{cat} y la ^{app} k_{cat}/K_m obtenidos en ausencia y presencia de glicerol.

3. RESULTADOS

3.1 Oxidación de alcoholes por la AAO en estado estacionario

Las representaciones de dobles recíprocos de la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol frente a distintas concentraciones de oxígeno mostraron una serie de líneas convergentes a la izquierda del eje de ordenadas (**Figura 1**). Esto sugirió un mecanismo cinético con formación de un complejo ternario en donde el oxígeno reacciona con la enzima reducida antes de que tenga lugar la liberación del producto de la primera reacción. De acuerdo a este patrón cinético, los datos se ajustaron a una ecuación que describe un mecanismo de tipo ternario (Ec. 2). Las constantes cinéticas de estado estacionario se resumen en la **Tabla 1**.

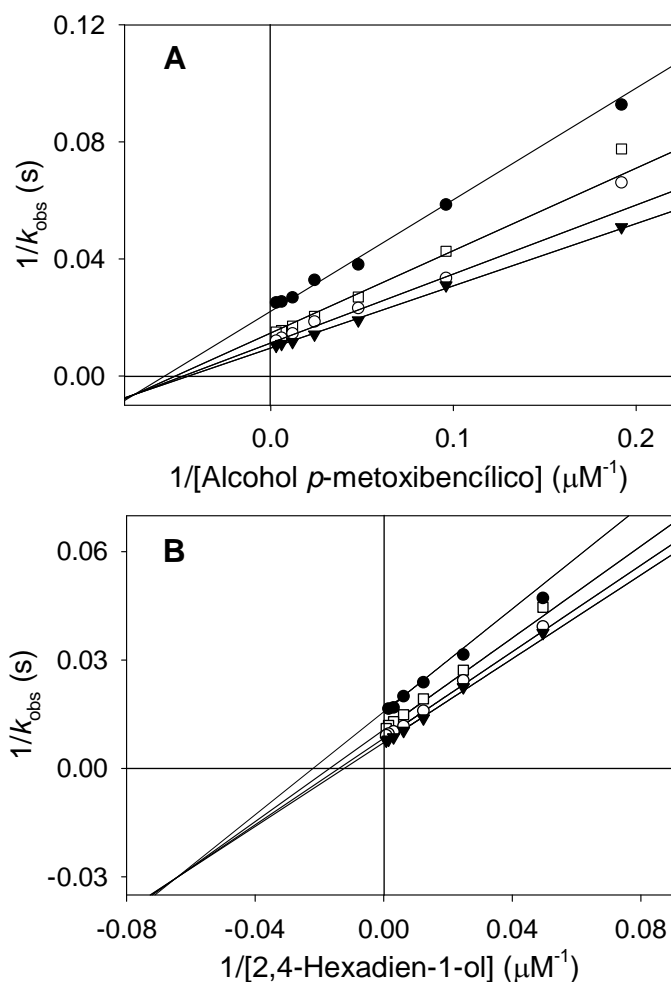


Figura 1. Representación de dobles recíprocos para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (A) y el 2,4-hexadien-1-ol (B). Las constantes observadas (k_{obs}) (μmoles de 2,4.-hexadienal y *p*-anisaldehído formados por μmol de enzima en un segundo), fueron determinadas en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C, empleando diferentes concentraciones de oxígeno: 0.15 mM (●), 0.32 mM (□), 0.67 mM (○) y 1.52 mM (▼). Las líneas se corresponden con el ajuste de los datos a la Ec. 2.

Tabla 1**Parámetros cinéticos (de estado estacionario y transitorio) durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol**

Alcohol	Estado estacionario ^a			Estado transitorio ^b	
	k_{cat} (s ⁻¹)	$K_{\text{m(Al)}}$ (μM)	$K_{\text{m(O}_2)}$ (μM)	k_{red} (s ⁻¹)	K_{d} (μM)
<i>p</i> -Metoxibencílico	129 ± 5	25 ± 3	348 ± 36	139 ± 16	26 ± 5
2,4-Hexadien-1-ol	161 ± 3	91 ± 5	232 ± 13	144 ± 2	62 ± 4

Ensayos realizados en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12°C. ^aLos parámetros de estado estacionario fueron determinados variando las concentraciones de sustrato reductor y oxígeno. Los datos fueron ajustados a la Ec. 2 que describe un mecanismo ternario. ^bLa reducción de la flavina fue ajustada a la Ec. 7.

3.2 Inhibición de la AAO por ácido *p*-anísico

La afinidad de la AAO por el ácido *p*-anísico fue determinada a partir de los cambios del espectro de absorción de la AAO durante su titulación con este inhibidor a pH 6 (inserto en **Figura 2**). La constante de disociación determinada para este compuesto fue $94 \pm 3 \mu\text{M}$, similar al valor de K_i ($80 \pm 2 \mu\text{M}$) obtenido previamente (Ferreira *et al.*, 2005). Por otro lado, se determinó la dependencia de pH de la constante de inhibición del ácido *p*-anísico empleando alcohol veratrílico como sustrato (**Figura 2**). El ajuste de los datos (Ec. 6) indicó que la unión del inhibidor está favorecida por la protonación de un grupo con pK_a de 7.5 ± 0.1 .

3.3 Dependencia del pH para la actividad de la AAO

En primer lugar, se determinó la dependencia del pH para los parámetros cinéticos de oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol en tampón 0.1 M a concentraciones de oxígeno atmosféricas. Como se muestra en la **Figura 3A**, los valores de $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ (círculos) no cambian en el rango de pH 4-7, sin embargo, disminuyen a valores de pH más altos. Debido a la inestabilidad de la AAO recombinante a valores superiores a pH 9, en el perfil para la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$, solo se pudo determinar un valor de $pK_a \geq 8.5$ que sugiere la existencia de un grupo protonado durante la catálisis. Sin embargo, la eficiencia catalítica (triángulos) fue independiente del pH, sugiriendo una disminución en el valor de la $K_{\text{m(Al)}}$ (**Figura 3A**).

En una segunda aproximación, se variaron simultáneamente las concentraciones de alcohol *p*-metoxibencílico y O₂. La k_{cat} , $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$ y $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(O}_2)}$ (obtenidas ajustando los datos a la ecuación 2) fueron independientes del pH a concentración saturante de ambos sustratos (alcohol y O₂), tal y como se muestra en la **Figura 3B** (símbolos en negro) para la oxidación de este sustrato.

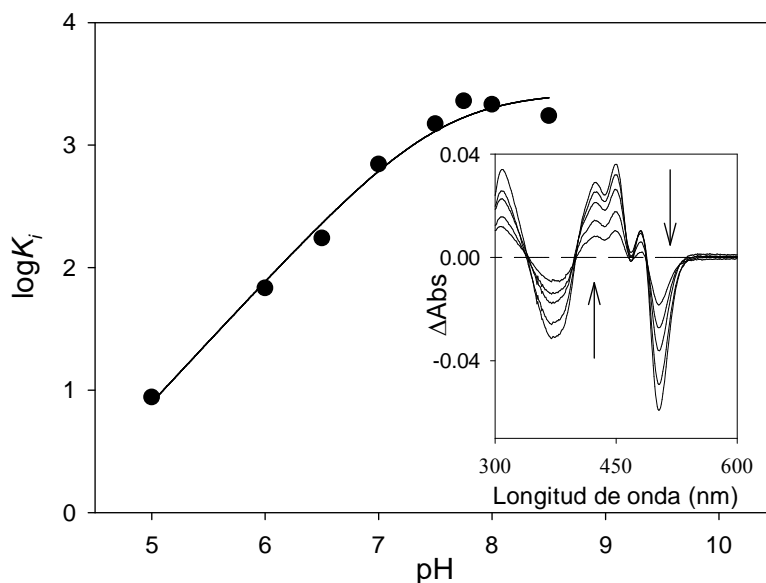


Figura 2. **Inhibición de la AAO por ácido *p*-anísico.** Dependencia del pH para la constante de inhibición de la AAO por ácido *p*-anísico. La inhibición de la actividad fue determinada empleando alcohol veratrílico como sustrato en presencia de ácido *p*-anísico a concentraciones atmosféricas de oxígeno y 25°C. El inserto muestra el espectro diferencial de la AAO tras la unión del inhibidor. La titulación fue realizada a 25°C en tampón fosfato 0.1 M, pH 6. Las curvas mostradas son los espectros diferenciales tras las adiciones de 18, 48, 106, 278 y 698 μM de ácido *p*-anísico (en el orden indicado por las flechas).

Dado que en los ensayos anteriores no se observaba una clara dependencia de pH, se estudió también el efecto del pH en la oxidación del alcohol 3-fluorobencílico, sustrato con el que AAO presenta una reactividad considerablemente menor. (Ferreira *et al.*, 2005). Se esperaba que en este caso que la reducción (en lugar de la unión del sustrato o disociación del producto), fuese el proceso limitante en la catálisis, permitiendo así determinar el valor real de pK_a para la reducción. Los ensayos con este sustrato se realizaron a concentración atmosférica de oxígeno ya que la $K_{m(\text{Ox})}$ calculada fue de 17 μM , encontrándose la reacción enzimática totalmente saturada bajo estas condiciones. Tal y como se muestra en la **Figura 3B**, no se observó dependencia de la oxidación del alcohol 3-fluorobencílico respecto al pH (símbolos en blanco). Por tanto bajo condiciones saturantes de oxígeno, ni la k_{cat} ni la eficiencia catalítica muestran una dependencia del pH con los sustratos ensayados.

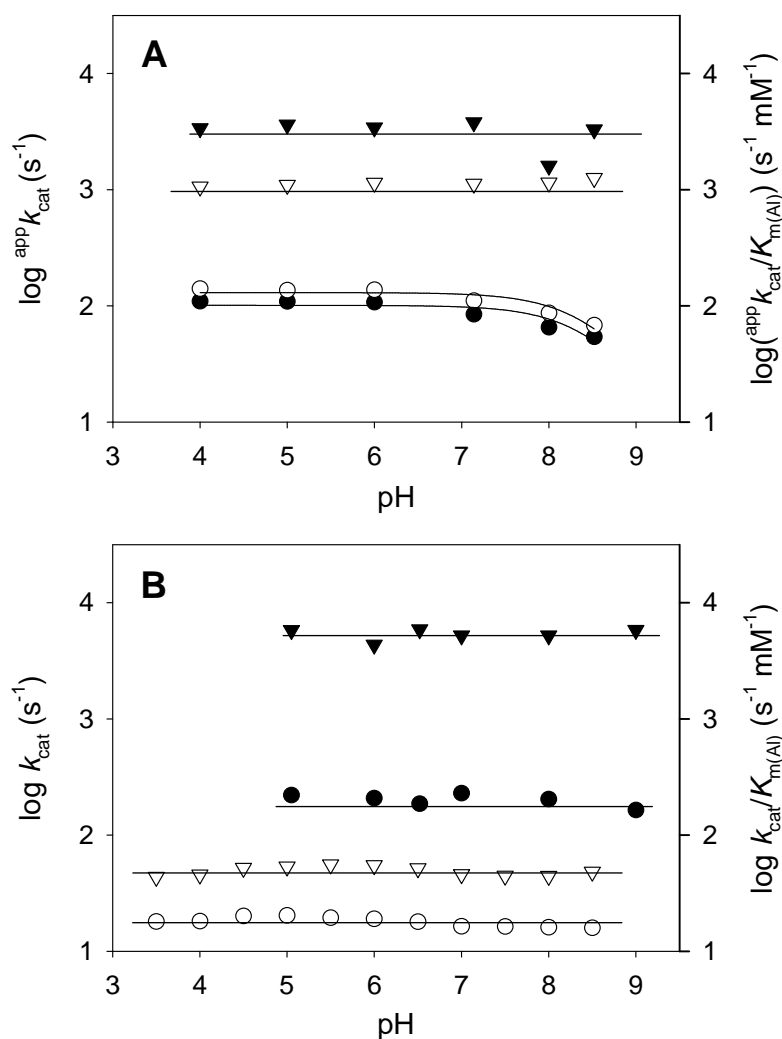


Figura 3. Dependencia del pH para los parámetros cinéticos de la AAO con varios sustratos. (A) Dependencia del pH para la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ y la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m(AI)}}$ con los alcoholes p -metoxibencílico (● y ▼, respectivamente) y 2,4-hexadien-1-ol (○ y ▽, respectivamente) en atmosfera. (B) dependencia del pH para la k_{cat} y la $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(AI)}}$ con los alcoholes p -metoxibencílico (● y ▼, respectivamente) y 3-fluorobencílico (○ y ▽, respectivamente), en tampón a concentración atmosférica (alcohol 3-fluorobencílico) y saturante de oxígeno (p -metoxibencílico). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C.

3.4 Estado redox del cofactor durante la catálisis

Para determinar el estado redox del cofactor durante la catálisis, se mezcló la AAO en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido a concentraciones saturantes de alcohol p -metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, y concentración atmosférica de oxígeno (Figura 4). En los primeros milisegundos tras la mezcla (tiempo muerto del aparato) se produjo una rápida disminución de la absorbancia hasta

alcanzarse una fase de equilibrio donde la AAO está en estado estacionario. Durante esta fase el porcentaje de enzima oxidada fue mayoritario (70-75%) indicando que la reacción de reducción era la etapa limitante en la catálisis. Tras el agotamiento del oxígeno se observó la reducción completa de la flavina a su forma hidroquinona.

El primer espectro de absorción registrado mostró la formación del complejo enzima-sustrato, caracterizado por el desplazamiento del pico de absorción de 463 a 458 nm y la resolución del hombro a 474 nm. Estos cambios espectrales fueron similares a los observados durante la titulación de la AAO con ácido *p*-anisico (**Figura 2**).

3.5 Semi-reacción de reducción

La reducción de la AAO por el alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol se determinó en condiciones anaerobias (**Figura 5**). Los espectros de absorción obtenidos mostraron la reducción completa de la flavina con ambos alcoholes, sin la estabilización de intermediarios de flavina de tipo semiquinona. El ajuste global de los datos sugiere un modelo en dos etapas. La primera etapa (A→B) fue rápida (mayor de 100 s^{-1} para ambos sustratos) y represento un 80% de la amplitud de la reacción. La segunda etapa (B→C) fue muy lenta ($3\text{-}5 \text{ s}^{-1}$) e independiente de la concentración de sustrato. Esta última etapa no parece tener relevancia catalítica dado que su velocidad es inferior a la tasa de recambio y no se observó en presencia de oxígeno (**Figura 4**), pudiendo estar relacionada con una lenta liberación del producto en ausencia de oxígeno. Por otro lado, la ausencia de oxígeno elimina el desplazamiento del pico a 463 nm, así como la formación de complejos de transferencia de carga.

Los valores de las k_{obs} a distintas concentraciones de sustrato se obtuvieron mediante ajuste global de los cambios espectrales acontecidos durante el proceso de reducción de la flavina por el alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol (**Figura 5A-B**). Las constantes observadas en la etapa rápida (k_{obs1}) obedecen a la ecuación de Michaelis-Menten. El ajuste de los datos a un proceso reversible (Ec. 7 y 8) mostró un valor de k_{rev} insignificante, sugiriendo un mecanismo de reducción de la flavina esencialmente irreversible para ambos sustratos. Los valores obtenidos para la constante de disociación de (K_{d}) y la constante de reducción (k_{red}) se muestran en la **Tabla 1**. Estos valores están en concordancia con los obtenidos para las constantes de estado estacionario (k_{cat} y $K_{\text{m(Al)}}$), indicando que la reducción es la etapa limitante en la catálisis de la AAO.

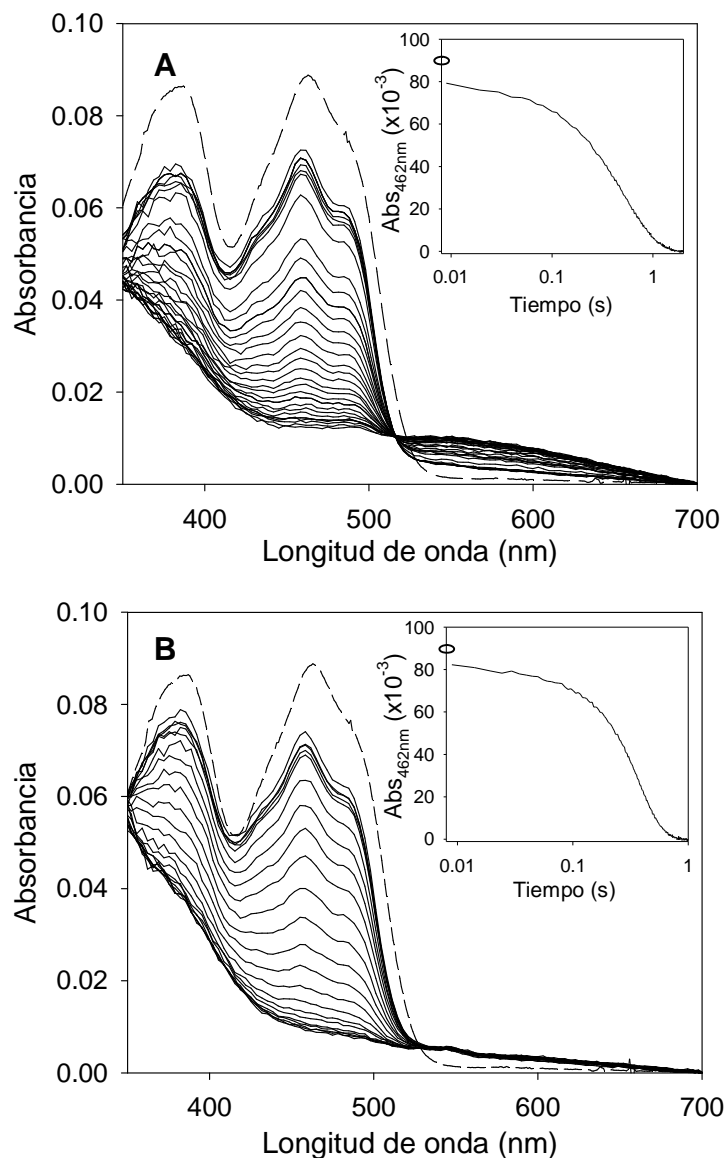


Figura 4. **Evolución del espectro de absorción de la AAO durante el *turnover* con alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol.** Se hizo reaccionar una solución aeróbica de AAO (9 μ M) con 1 mM de alcohol *p*-metoxibencílico (A) y 2 mM de 2,4-hexadien-1-ol (B), en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido. Se muestran el espectro de absorción de la AAO oxidada antes de la reacción (línea discontinua) y los espectros de absorción (línea continua) cada 10 ms (rango 9-500 ms) y posteriormente (rango 500-2000 ms) cada 50 ms. Los insertos muestran el curso de la reacción monitorizada a 462 nm (en escala de tiempo logarítmica). Las medidas fueran llevadas a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 20 °C.

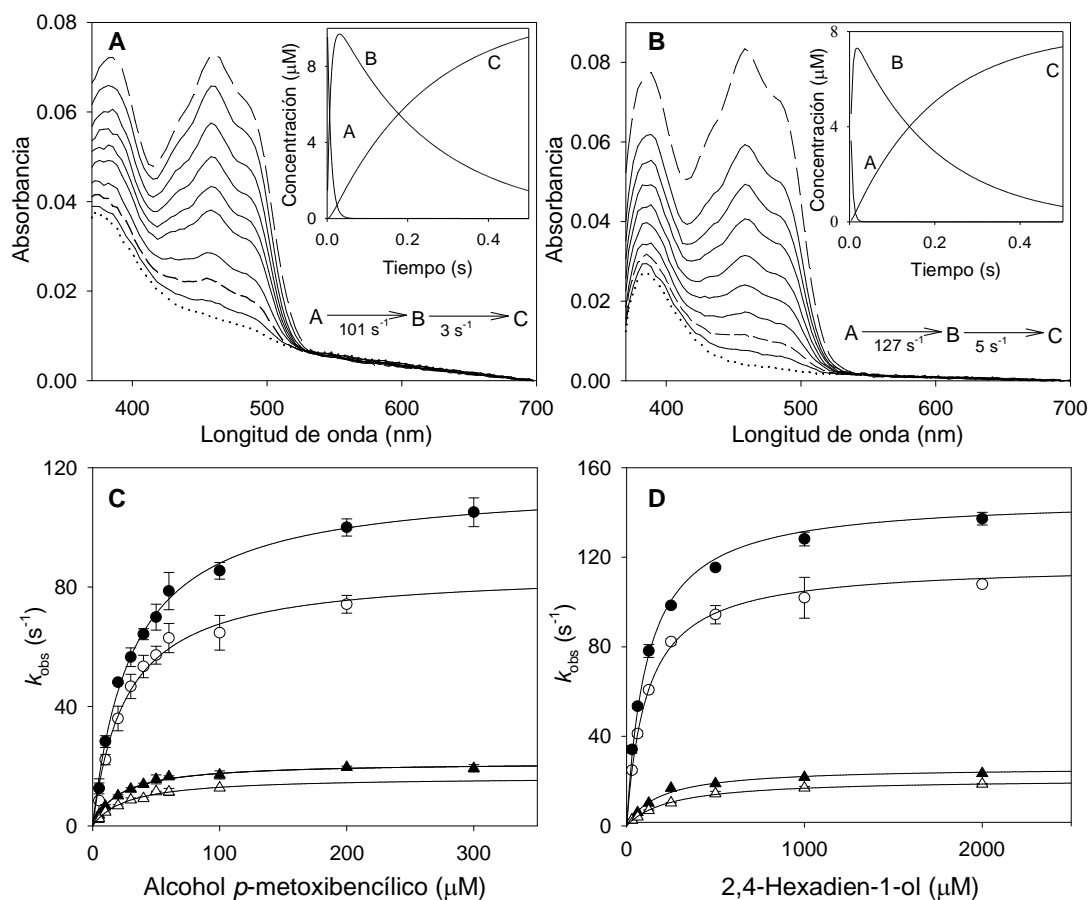


Figura 5. Semi-reacción de reducción de la AAO con alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol. Se muestra la evolución del espectro de absorción de la AAO (8 μM) durante la reducción en anaerobiosis con: (A) 500 μM de alcohol *p*-metoxibencílico, espectros a 1, 4, 6, 9, 12, 15, 22, 32, 93 y 255 ms; (B) 700 μM de 2,4-hexadien-1-ol, espectros a 4, 8, 14, 29, 101, 168, 239, 316, 403 y 570 ms. Los insertos muestran la evolución de las tres especies espectrales obtenidas tras el ajuste de los datos a un modelo de dos pasos: A \rightarrow B \rightarrow C. Estas especies se muestran en el gráfico principal: A (línea de trazos largos), B (línea de trazos cortos) y C (línea de puntos). Abajo se muestra la dependencia de la constante de reducción observada a distintas concentraciones de alcohol (y sus análogos α -dideuterados) para el alcohol *p*-metoxibencílico (C) y 2,4-hexadien-1-ol (D), en agua normal y deuterada: sustratos α -protonados en H_2O (\bullet), α -protonados en D_2O (\circ), α -dideuterados en H_2O (\blacktriangle) y α -dideuterados en D_2O (\triangle). Los datos fueron ajustados a la ecuación 7. Los ensayos fueron llevados a cabo en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido a 12 $^\circ\text{C}$.

3.6 KIE del sustrato y del solvente

Se investigó la existencia de un posible mecanismo de transferencia de hidruro durante la semi-reacción de reducción, empleando alcoholes marcados con deuterio. Para ello, se determinaron las constantes de estado estacionario empleando alcoholes α -dideuterados como sustrato (alcoholes *p*-[α - $^2\text{H}_2$]-metoxibencílico y [α - $^2\text{H}_2$]-2,4-hexadien-1-ol), y concentración atmosférica de oxígeno (**Tabla 2**, izda.). Las tasas de recambio para estos alcoholes, en agua protiada (H_2O) o deuterada (D_2O), mostraron un valor de KIE significativo, con una disminución de la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ de ~ 5 veces y una disminución de la eficiencia catalítica ($^{\text{D}}(^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})$) de 3.7-9.2 veces, a pH 6 (**Tabla 3**), sugiriendo que la ruptura del enlace C α -H/D es limitante durante la reducción de la flavina, y por tanto, durante la catálisis. Mientras que el KIE para la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ no fue significativamente diferente empleando H_2O o D_2O , se observaron efectos más altos para la eficiencia catalítica empleando D_2O (donde los valores $^{\text{D}}(^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{D}_2\text{O}}$ fueron 1.3-1.4 veces mayores a los de $^{\text{D}}(^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})$).

Tabla 2

Parámetros cinéticos (de estado estacionario y transitorio) durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol (y sus análogos α -dideuterados)

Alcohol	Estado estacionario ^a		Estado transitorio ^b	
	$^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ (s^{-1})	$^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{red} (s^{-1})	K_{d} (μM)
<i>p</i> -Metoxibencílico H_2O	115 ± 2	3720 ± 157	112 ± 7	26 ± 6
<i>p</i> -Metoxibencílico D_2O	86 ± 3	3234 ± 281	79 ± 2	23 ± 3
<i>p</i> -[α - $^2\text{H}_2$]-Metoxibencílico H_2O	21 ± 1	1002 ± 54	12 ± 1	23 ± 6
<i>p</i> -[α - $^2\text{H}_2$]-Metoxibencílico D_2O	16 ± 1	608 ± 51	8 ± 1	7 ± 1
2,4-Hexadien-1-ol H_2O	147 ± 3	1280 ± 88	138 ± 1	76 ± 5
2,4-Hexadien-1-ol D_2O	117 ± 2	1017 ± 57	104 ± 1	87 ± 3
[α - $^2\text{H}_2$]-2,4-Hexadien-1-ol H_2O	26 ± 1	140 ± 13	15 ± 1	165 ± 12
[α - $^2\text{H}_2$]-2,4-Hexadien-1-ol D_2O	21 ± 1	84 ± 3	11 ± 1	124 ± 12

Los ensayos de estado estacionario y transitorio fueron realizados en tampón fosfato 0.1 M pH 6, a 24 °C y 12 °C, respectivamente. ^aLas constantes de estado estacionario fueron determinadas a concentración atmosférica de oxígeno tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. ^bLas reacciones de reducción se ajustaron a la Ec. 7.

Los valores de KIE para la k_{cat} ($^{\text{D}}(^{\text{app}}k_{\text{cat}})$) mostraron una dependencia del pH (**Figura 6A**), aumentando con la protonación de un grupo con un pK_{a} de 7.2 ± 0.2 y de 7.4 ± 0.2 , durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol, respectivamente. Estos valores están en el mismo rango que aquellos obtenidos durante la inhibición con ácido *p*-anísico (**Figura 2**) y una unidad por debajo de los encontrados para la

$^{app}k_{cat}$ con ambos sustratos (**Figura 3A**). Por el contrario, los valores de KIE para la eficiencia no mostraron una dependencia del pH (**Figura 6B**) siendo 4.1 ± 0.3 y 9.4 ± 0.9 para el alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol respectivamente, en concordancia con la ausencia de un efecto de pH sobre la eficiencia catalítica, previamente observada (**Figura 3A**). Comparando los valores de KIE de estado estacionario para ambos sustratos a pH 6 (**Tabla 3**) se observa que el valor de $D(^{app}k_{cat})$ para el alcohol *p*-metoxibencílico es significativamente mayor que el de $D(^{app}k_{cat}/K_m)$, sugiriendo que existen condicionamientos externos a la catálisis que están enmascarando parcialmente el KIE para este sustrato.

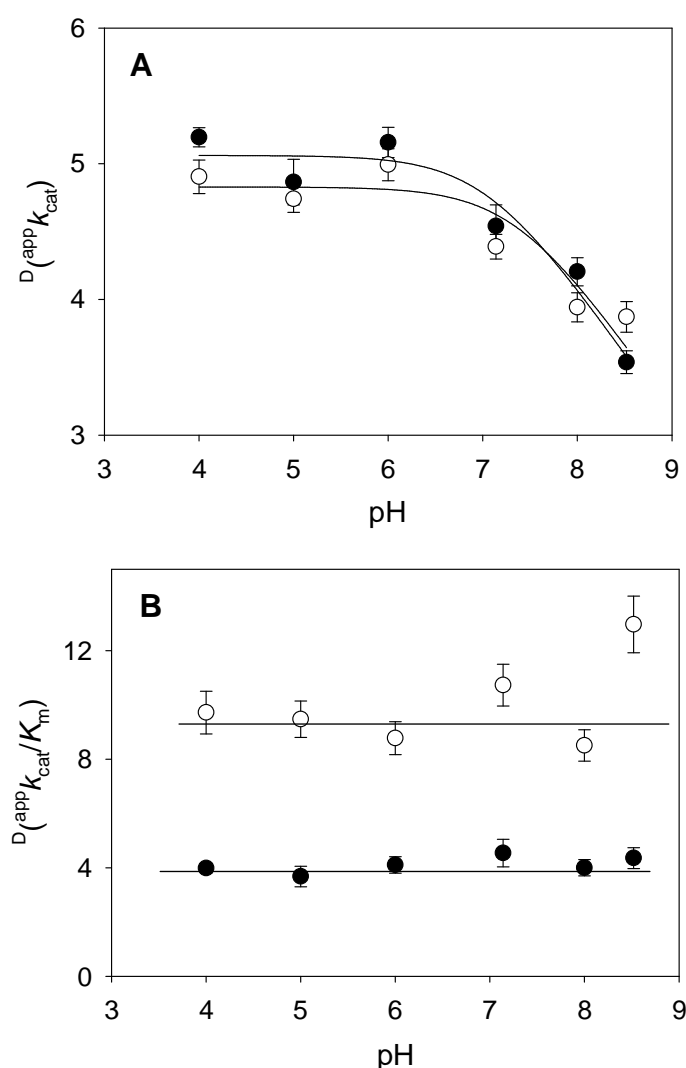


Figura 6. Dependencia del pH para los valores de KIE observados para los parámetros cinéticos de estado estacionario. Dependencia del pH de la $D(^{app}k_{cat})$ (A) y la $D(^{app}k_{cat}/K_m)$ (B) para la oxidación del alcohol $[\alpha^2\text{-H}^2]$ -*p*-metoxibencílico y el $[\alpha^2\text{-H}^2]$ -2,4-hexadien-1-ol (○) por la AAO. Los valores iniciales fueron obtenidos empleando los sustratos α -protiados y α -dideuterados, en tampón fosfato 0.1 M, pH 4-8.5, a 25°C bajo atmósfera de aire. Ajustes a la Ec. 3 en (A).

Tabla 3

KIE del sustrato, solvente y múltiple en las constantes cinéticas de estado estacionario para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol

	Alcohol <i>p</i> -metoxibencílico	2,4-Hexadien-1-ol
KIE del sustrato		
$D^{(app)}k_{cat}$	5.41 ± 0.14	5.59 ± 0.14
$D^{(app)}k_{cat}/K_{m(Al)}$	3.71 ± 0.25	9.16 ± 1.08
$D^{(app)}k_{cat}D_2O$	5.22 ± 0.34	5.57 ± 0.10
$D^{(app)}k_{cat}/K_{m(Al)}D_2O$	5.32 ± 0.65	12.10 ± 0.80
KIE del solvente		
$D_2O^{(app)}k_{cat}$	1.35 ± 0.06	1.25 ± 0.03
$D_2O^{(app)}k_{cat}/K_{m(Al)}$	1.15 ± 0.11	1.26 ± 0.11
$D_2O^{(app)}k_{cat}D$	1.30 ± 0.07	1.25 ± 0.02
$D_2O^{(app)}k_{cat}/K_{m(Al)}D$	1.65 ± 0.17	1.66 ± 0.17
KIE múltiple		
$D,D_2O^{(app)}k_{cat}$	7.03 ± 0.38	6.98 ± 0.15
$D,D_2O^{(app)}k_{cat}/K_{m(Al)}$	6.12 ± 0.58	15.20 ± 1.10

Los ensayos fueron realizados en tampón fosfato normal y deuterado 0.1 M, pH 6 a 25°C (en atmósfera de aire) empleando los alcoholes α -protiados y α -dideuterados como sustrato. Los diferentes KIE estimados fueron: Dk , KIE del sustrato en agua (k del sustrato α -protiado en H_2O/k del sustrato α -dideuterado en H_2O); $^Dk_{(D_2O)}$, KIE del sustrato en D_2O (k del sustrato α -protiado en D_2O/k del sustrato α -dideuterado en D_2O); ^{D_2O}k , KIE del solvente usando sustrato α -protiado (k del sustrato α -protiado en H_2O/k del sustrato α -protiado en D_2O); $^{D_2O}k_D$, KIE del solvente empleando alcoholes α -dideuterados como sustratos (k del sustrato α -dideuterado en H_2O/k del sustrato α -dideuterado en D_2O); $^{D,D_2O}k$, KIE simultáneo del solvente y el sustrato (k del sustrato α -protiado en H_2O/k del sustrato α -dideuterado en D_2O). Los parámetros cinéticos utilizados para calcular los KIEs para $^{app}k_{cat}$ y $^{app}k_{cat}/K_{m(Al)}$ se muestran en la **Tabla 2**.

Igualmente se determinaron las constantes cinéticas de estado estacionario a 25°C (pH 6) empleando agua deuterada para determinar la posible participación de los protones del solvente durante la semi-reacción de reducción (por ejemplo, en la ruptura del enlace O-H del sustrato y la formación del alcoxido) (**Tabla 2**, izda). En todos los casos, el valor de KIE del solvente (**Tabla 3**) fue mucho menor que el valor de KIE del sustrato. Además, se observó un efecto del solvente sobre la k_{cat} ($^{D_2O}(^{app}k_{cat})$) de 1.25-1.35 para los alcoholes *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol, con independencia de su composición isotópica ($^{D_2O}(^{app}k_{cat(D)})$ de 1.25-1.30). En presencia de los sustratos sin deuterar, el valor de KIE del solvente para la eficiencia ($^{D_2O}(^{app}k_{cat}/K_m)$) fue próximo a uno, sin embargo, cuando se emplearon sustratos deuterados ($^{D_2O}(^{app}k_{cat}/K_m)_D$) el valor obtenido fue 1.5-1.6, confirmando el efecto del solvente. Además, se observó un KIE múltiple con ambos sustratos (**Tabla 3**), siendo igual o superior al producto del efecto isotópico del solvente y

del sustrato para $^{app}k_{cat}$ y $^{app}k_{cat}/K_m$. El agua deuterada posee una mayor viscosidad respecto al agua protizada ($\sim 23\%$ a 25°C), pudiendo afectar a las etapas de la reacción que dependen de la difusión, como por ejemplo la formación del complejo enzima sustrato o la disociación del producto. Por este motivo, se estudió el posible efecto de la viscosidad en la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico incrementando progresivamente la concentración de glicerol. Tal y como se observa en la **Figura 7**, no se encontró un efecto de la viscosidad sobre las constantes $^{app}k_{cat}$ y $^{app}k_{cat}/K_m$, lo que permite descartar la existencia de una etapa dependiente de la difusión durante la abstracción del hidroxilo del alcohol por la AAO.

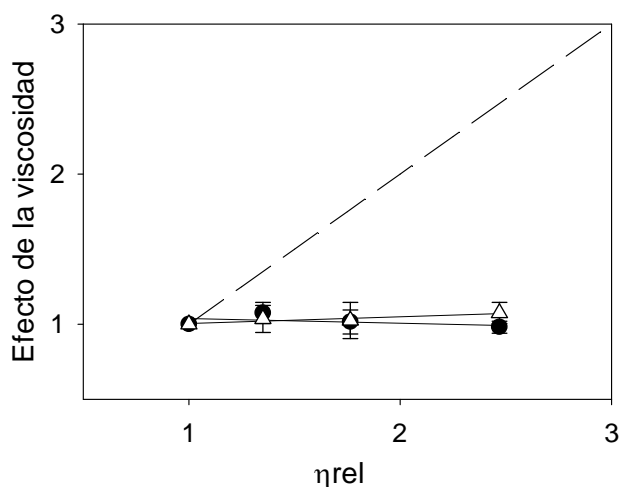


Figura 7. **Efecto de la viscosidad en la actividad de la AAO.** Se estimaron los parámetros cinéticos $^{app}k_{cat}$ (●) y $^{app}k_{cat}/K_m$ (Δ) empleando alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato en medios con diferentes grados de viscosidad, a concentración de oxígeno atmosférico a 25°C . Se empleó glicerol para obtener los diferentes grados de viscosidad de medio. Las líneas continuas muestran los ajustes experimentales. La línea discontinua (con una pendiente de 1) indicaría una reacción dependiente de la difusión y η_{rel} indica la viscosidad relativa.

Para completar el estudio del KIE del sustrato y del solvente, se determinaron las constantes cinéticas de reducción empleando los dos alcoholes dideuterados en condiciones anaeróbicas (pH 6) (**Tabla 2**, dcha.). La reducción de la enzima en presencia del alcohol *p*-[α - $^2\text{H}_2$]-metoxibencílico y [α - $^2\text{H}_2$]-2,4-hexadien-1-ol fue completa e irreversible, y no se detectó ninguna forma intermedia de tipo semiquinona. Con ambos sustratos α -dideuterados se obtuvo un $^Dk_{red}$ de ~ 9 , mientras que no se encontraron diferencias significativas para los valores de $^Dk_{red(D_2O)}$ (**Tabla 4**). Además, se observó un pequeño pero significativo valor para $^{D_2O}k_{red}$ (1.3-1.4), que era aparentemente independiente del sustrato empleado (sin diferencias significativas en el valor de $^{D_2O}k_{red(D)}$). Finalmente se encontró

un KIE múltiple para la k_{red} ($^{D,D2O}k_{\text{red(D)}}$), que resulta del producto entre $^Dk_{\text{red}}$ y $^{D2O}k_{\text{red}}$, cuyo valor fue de 13.5 para el alcohol *p*-[α - $^2\text{H}_2$]-metoxibencílico y 12.5 para el [α - $^2\text{H}_2$]-2,4-hexadien-1-ol. Los resultados anteriores son consistentes con un mecanismo concertado de abstracción de protón del grupo hidroxilo y transferencia de hidruro desde el carbono- α del sustrato a la flavina, durante la oxidación de alcoholes por la AAO.

Tabla 4

KIE del sustrato, solvente y múltiple para la k_{red} empleando alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol α -dideuterados como sustratos

	<i>p</i> -Metoxibencílico	2,4-Hexadien-1-ol
KIE del sustrato		
$^Dk_{\text{red}}$	8.98 ± 0.82	8.93 ± 0.17
$^{D2O}k_{\text{red(D2O)}}$	9.49 ± 0.36	9.41 ± 0.20
KIE del solvente		
$^{D2O}k_{\text{red}}$	1.42 ± 0.10	1.33 ± 0.02
$^{D2O}k_{\text{red(D)}}$	1.50 ± 0.10	1.41 ± 0.04
KIE múltiple		
$^{D,D2O}k_{\text{red}}$	13.50 ± 0.90	12.50 ± 0.30

Los ensayos fueron realizados en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12°C, en anaerobiosis. Los diferentes valores de KIE se calcularon tal y como se explica al pie de la **Tabla 2**.

4. DISCUSIÓN

Los parámetros cinéticos de estado estacionario, obtenidos variando simultáneamente las concentraciones de alcohol y oxígeno, son consistentes con un mecanismo cinético ternario (**Esquema 1**) donde el oxígeno reacciona con la enzima reducida antes de la liberación del primer producto (aldehído) de la reacción.

Por lo tanto, la AAO posee un mecanismo cinético similar a la colina oxidasa, una oxidorreductasa GMC que oxida alcoholes a los correspondientes aldehídos y ácidos (Gadda, 2003a; Ferreira *et al.*, 2005), mientras que la glucosa oxidasa sigue un mecanismo cinético ping-pong (Gibson *et al.*, 1964). Otra flavoenzima que presenta un mecanismo ternario es la vainillil alcohol oxidasa (Fraaije y van Berkel, 1997), perteneciente a otra familia diferente de flavoproteínas.

La AAO presentó una alta reactividad frente al oxígeno durante la oxidación de los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol, observándose valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Ox)}}$ de 3.7×10^5 y $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estos valores son similares a los descritos para otras oxidasas como la glucosa oxidasa y la vainillil alcohol oxidasa (Fraaije y van Berkel, 1997; Roth y Klinman, 2003). En ambas enzimas, se ha

sugerido que la reorganización del centro activo es un paso previo a la activación de la flavina reducida en su reacción con el oxígeno. Estudios previos en la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* han demostrado que la protonación de la His516 ($pK_a \sim 8$), His502 en la AAO de *P. eryngii*, aumenta la reactividad de la enzima frente al oxígeno (Roth y Klinman, 2003). La conservación de este residuo de histidina en todas las enzimas de la familia de oxidorreductasas GMC, ha sugerido su participación en el proceso común a todas ellas (concretamente en la semi-reacción de oxidación) (Su y Klinman, 1999). A diferencia de la glucosa oxidasa, en la AAO y la colina oxidasa no se observó una dependencia de la $k_{cat}/K_m(Ox)$ frente del pH (Ghanem *et al.*, 2003). Sin embargo, en las enzimas metanol oxidasa y colina oxidasa se han encontrado valores similares de pK_a , para la eficiencia catalítica del sustrato reductor (pK_a 8.3 y 7.6 empleando alcohol bencílico y colina, respectivamente). Estos valores de pK_a se han asignado a un residuo de histidina homólogo a la His516 de la glucosa oxidasa (His568 en la metanol oxidasa de *Candida boidinii*, e His466 en la colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis*) que se encontraría desprotonada durante la reacción, pudiendo actuar como base catalítica en la formación del alcóxido (Menon *et al.*, 1995; Gadda, 2003b; Ghanem y Gadda, 2005; Fan *et al.*, 2006).

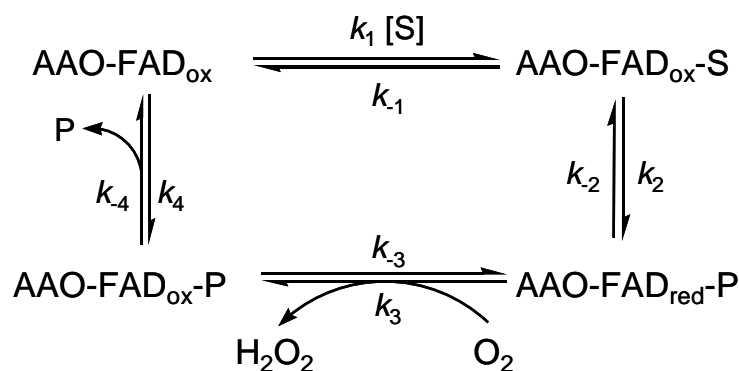
En la AAO los parámetros cinéticos fueron independientes del pH bajo condiciones saturantes de oxígeno y alcohol, incluso cuando se decidió emplear un sustrato con baja eficiencia (**Figura 3B**) para evitar posibles factores externos a la catálisis. Sin embargo, se encontró un ligero efecto del pH sobre la $^{app}k_{cat}$ bajo condiciones no saturantes de oxígeno. Este resultado sugería que un residuo con un $pK_a \sim 8.5$ debía estar protonado para alcanzar la máxima tasa de recambio. Este hecho se ha observado también en la AAO expresada en *Emericella nidulans* durante la oxidación del alcohol veratrílico (Ferreira *et al.*, 2005) y en la AAO de *Bjerkandera adusta* durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Romero *et al.*, 2009), así como en la celobiosa deshidrogenasa y la colesterol oxidasa durante la oxidación de sus respectivos sustratos (Kass y Sampson, 1998a; Rotsaert *et al.*, 2003).

Curiosamente, la resolución de la estructura cristalográfica a nivel atómico de la colesterol oxidasa de *Streptomyces* sp. ha revelado que la His477, se encuentra protonada en un rango de pH de 4.5-7.3 (condiciones de máxima tasa de recambio) desprotonándose a pH 9 (Lario *et al.*, 2003; Lyubimov *et al.*, 2006). Este residuo de histidina es homólogo a la His502 de la AAO de *P. eryngii* y la His689 de la celobiosa deshidrogenasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Ferreira *et al.*, 2006) (así como las histidinas conservadas de la glucosa oxidasa, metanol oxidasa y colina oxidasa antes mencionadas). Los valores teóricos de pK_{a1} y pK_{a2} calculados para algunas de estas histidinas (Li *et al.*, 2005) fueron mas bajos de lo

esperado sugiriendo una modulación de los mismos por el entorno proteico de estas enzimas. Esto sugirió que la dependencia de la tasa de recambio del pH en la AAO y otras oxidorreductasas GMC, podría estar relacionada con la implicación en la catálisis de una histidina neutra mono-protonada (a pH 4-7). En el caso de la AAO, la disminución del valor de la $^{app}k_{cat}$ a valores altos de pH estaría relacionada con la desprotonación de la His502 o la His546 (Varela *et al.*, 2000) a su forma ión imidazolato, lo que estaría afectando negativamente la catálisis, tal y como se ha propuesto para la colesterol oxidasa (Lyubimov *et al.*, 2006).

Tal y como se ha descrito anteriormente, la oxidación del alcohol por la AAO requiere la abstracción del protón del grupo hidroxilo y de un hidruro desde el carbono- α del sustrato. El estudio del efecto isotópico cinético del sustrato se ha utilizado para determinar la participación del enlace C-H, mientras que el efecto isotópico cinético del solvente se utilizó para determinar la ruptura de un enlace O-H. En el caso del 2,4-hexadien-1-ol los valores de KIE para $^D(^{app}k_{cat}/K_m)$ y $^Dk_{red}$ fueron similares, sugiriendo que ningún otra etapa durante la catálisis estaba enmascarando el efecto isotópico debido a la ruptura del enlace C-H. En este caso se puede tomar el valor de KIE para la constante de reducción de la flavina ($^Dk_{red}$) como una medida directa de la Dk_2 , de magnitud similar al KIE intrínseco teórico esperado. Sin embargo, durante la reacción de oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO, el valor $^D(^{app}k_{cat}/K_m)$ fue menor que los valores de $^D(^{app}k_{cat})$ y $^Dk_{red}$ sugiriendo que otras etapas, además de la ruptura del enlace C-H, eran limitantes para la actividad catalítica con este sustrato. En la colesterol oxidasa y la glucosa oxidasa los valores de KIE para la ruptura del enlace C-H implicado en la transferencia de hidruro desde el sustrato a la flavina fueron significativamente más bajos (alrededor de 2-3) que los valores intrínsecos sugiriendo la existencia también de otras etapas limitantes durante la catálisis que enmascaran dichos valores y dificultan el estudio del mecanismo de reacción de estas enzimas (Bright y Gibson, 1967; Kass y Sampson, 1998a; 1998b). Por el contrario en la colina oxidasa los valores de KIE determinados para la k_{red} sugieren valores cercanos al KIE intrínseco (Gadda, 2003b; Fan y Gadda, 2005a), haciendo que esta enzima haya sido propuesta como una oxidasa modelo en la familia de oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008). En el mecanismo propuesto para la AAO (**Esquema 1**), los condicionamientos externos a la catálisis que están enmascarando parcialmente el KIE para el alcohol *p*-metoxibencílico se deben a los altos valores del cociente (k_2/k_{-1}) (ver Ec. 9), mientras que es de esperar que el proceso reversible durante la catálisis ($k_2/k_{3[O_2]}$) sea insignificante debido a que la reducción de la flavina es la etapa limitante (y prácticamente irreversible) y a que la afinidad de la AAO por el oxígeno ($K_{m(Ox)}$ 275 μ M) (**Tabla 1**) es similar a la concentración atmosférica a 25°C.

Respecto al enlace O-H, el valor de KIE del solvente encontrado para los parámetros cinéticos de estado estacionario ($^{D_2O}(\text{app}k_{\text{cat}})$, $^{D_2O}(\text{app}k_{\text{cat}}/K_m)$) fue ligeramente superior a la unidad, mientras que no se encontró ninguna contribución de la viscosidad al KIE del solvente. El aumento del valor de efecto isotópico $^{D_2O}(\text{app}k_{\text{cat}}/K_m)_D$ y particularmente el KIE simultáneo del sustrato y del solvente, observable en los $^{D,D_2O}(\text{app}k_{\text{cat}})$ y $^{D,D_2O}(\text{app}k_{\text{cat}}/K_m)$ (comparados con $^D(\text{app}k_{\text{cat}})$ y $^D(\text{app}k_{\text{cat}}/K_m)$) sugieren que el KIE del solvente procede de la oxidación del sustrato. Estos resultados difieren sustancialmente de los encontrados en otras oxidorreductasas GMC (como la glucosa oxidasa, la colesterol oxidasa y la colina oxidasa) donde no se ha encontrado un KIE del solvente durante la oxidación del sustrato (Bright y Gibson, 1967; Kass y Sampson, 1998a; 1998b; Fan y Gadda, 2005b; Gadda, 2008).



Esquema 1

Para eliminar las posibles interferencias de otras etapas catalíticas, se determinaron las constantes cinéticas de estado transitorio, calculando el KIE del sustrato y del solvente para la constante de reducción, k_{red} (k_2 , en el Esquema 1), en presencia del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol. Con ambos sustratos se encontró un alto valor de KIE para la k_{red} (~ 9), lo que permitió concluir que la ruptura del enlace C-H ocurre durante la etapa limitante de reducción de la flavina. Este hecho junto al KIE múltiple encontrado con ambos sustratos ($^{D,D_2O}k_{\text{red}} \sim 13$), es consistente con un mecanismo concertado de transferencia de hidruro, donde la abstracción del protón del grupo hidroxilo y la transferencia del hidruro a la flavina están altamente acoplados. Este mecanismo de transferencia de hidruro y activación simultánea del sustrato por una base catalítica (**Figura 8**) es compatible con la estructura cristalográfica de la AAO que sugiere una localización del sustrato en el centro activo con la adecuada orientación del C-H que se va a romper frente al N5 de la flavina, próximo a los residuos de histidina que podrían contribuir a la ruptura del enlace O-H.

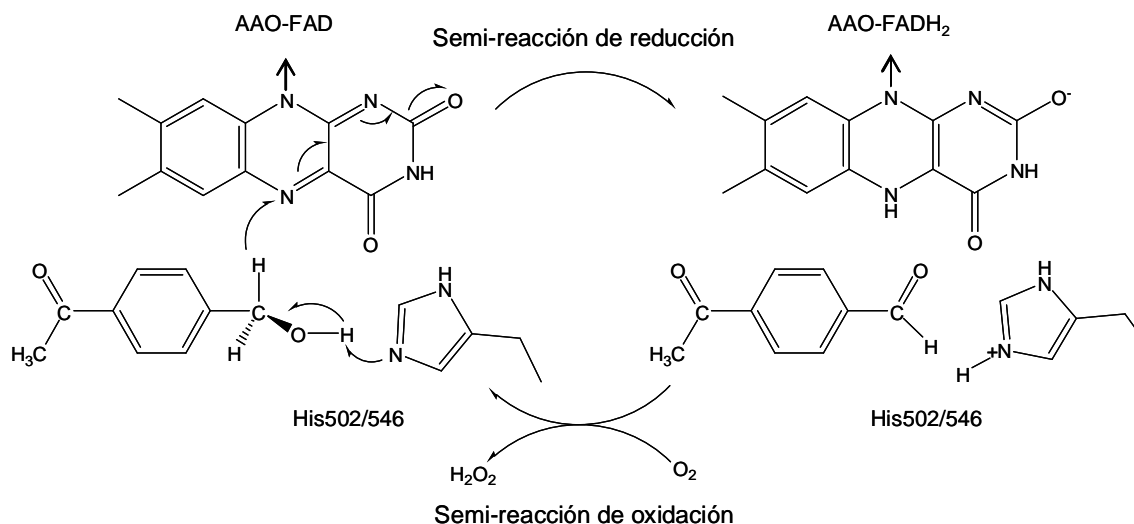


Figura 8. **Esquema del mecanismo catalítico de la AAO.** Durante la semi-reacción de reducción, la oxidación del alcohol (en este caso alcohol *p*-metoxibencílico), supondría la formación del alcóxido asistido por una base catalítica (His502 o His546 recibiendo el protón) y la transferencia de hidruro al N5 de la flavina. Posteriormente, en la semi-reacción de oxidación, la flavina es oxidada por el oxígeno, y se forma el peróxido de hidrógeno requerido para la degradación de la lignina.

Estudios de KIE del solvente y del sustrato han sugerido para otros miembros de la familia de oxidorreductasas GMC un mecanismo catalítico secuencial (frente al concertado) donde la ruptura del enlace O-H precede a la ruptura del enlace C-H (Cleland, 1982; Menon *et al.*, 1995). De hecho, en la colina oxidasa se ha sugerido que la velocidad de abstracción del protón es significativamente más rápida que la transferencia de hidruro. Se ha propuesto que los residuos de histidina conservados podrían actuar como bases catalíticas en estas oxidorreductasas (Menon *et al.*, 1995; Kass y Sampson, 1998b; Witt *et al.*, 2000; Rotsaert *et al.*, 2003; Gadda, 2008). Sin embargo, en la colina oxidasa, Ghanem y Gadda (2005) proponen que la His466, His502 en la AAO, contribuye a la estabilización del intermediario de tipo alcóxido del sustrato así como a la formación de un aducto con el sulfito, en lugar de actuar como base catalítica. El mecanismo concertado descrito para la AAO descarta la estabilización de especies de tipo alcóxido del sustrato durante la catálisis. Esto, junto al hecho de que la enzima es incapaz de estabilizar un aducto sulfito-flavina (Ferreira *et al.*, 2005), sugiere que la AAO no estabiliza especies intermedias de reducción en el centro activo durante la catálisis, tal y como se ha observado en otras oxidorreductasas GMC (Müller y Massey, 1969; Massey *et al.*, 1969; Massey y Hemmerich, 1980; Massey, 1995). Así mismo, el elevado valor de $^Dk_{\text{red}}$ elimina la posibilidad de un mecanismo radicalario, ya que la disminución en la k_{red} debería dar lugar a la estabilización alguna forma

intermedia, como la forma semiquinona de la flavina (forma semi-reducida del FAD). Todo ello está de acuerdo con estudios previos que sugerían que esta enzima no estabiliza termodinámicamente el radical semiquinona de la flavina (Ferreira *et al.*, 2005). Esta característica de la AAO junto a la imposibilidad de formar un aducto con sulfito, son propiedades atípicas de esta enzima respecto a la mayoría de oxidasas (Massey, 1995).

Los datos presentados son consistentes con un mecanismo cinético donde primero tiene lugar la formación de un complejo del tipo Michaelis-Menten, seguido de la oxidación del sustrato (y la reducción del cofactor de la enzima), y finalmente la reoxidación de la enzima reducida por el oxígeno con la consiguiente liberación del producto. El mecanismo de la semi-reacción de reducción es consistente con un mecanismo concertado para la transferencia de protón e hidruro, tal y como se ha visto tras la determinación de los efectos isotópicos. Por tanto, la oxidación del alcoholes por AAO parece ser una excepción dentro de la familia de oxidorreductasas GMC, donde ha sido propuesto un mecanismo secuencial como mecanismo consenso (Gadda, 2008).

5. BIBLIOGRAFIA

- Bannwarth, M., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D., Giffhorn, F. y Schulz, G.E. (2004) Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. *Biochemistry* 43: 11683-11690.
- Bright, H.J. y Gibson, Q.H. (1967) The oxidation of 1-deuterated glucose by glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 242: 994-1003.
- Cleland, W.W. (1980) Measurement of isotope effect by the equilibrium perturbation technique. *Methods Enzymol.* 64: 104-125.
- Cleland, W.W. (1982) The use of pH studies to determinate chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. En: *Methods in Enzymology*. (Ed.: Purich, D.L.), pp. 390-405.
- Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A. y Krastky, C. (2001) The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like a oxidoreductase. *Structure* 9: 803-815.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005a) On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005b) Oxygen- and temperature-dependent kinetic isotope effects in choline oxidase: correlating reversible hydride transfer with environmentally enhanced tunneling. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 17954-17961.

- Fan, F., Germann, M.W. y Gadda, G. (2006) Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* 45: 1979-1986.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., Schopfer, L.M. y Massey, V. (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265: 3793-3802.
- Gadda, G. (2003a) Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1646: 112-118.
- Gadda, G. (2003b) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Ghanem, M., Fan, F., Francis, K. y Gadda, G. (2003) Spectroscopic and kinetic properties of recombinant choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochemistry* 42: 15179-15188.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.

- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209: 603-611.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Hallberg, B.M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998a) Evaluation of the role of His447 in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry* 37: 17990-18000.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998b) The importance of Glu361 position in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* 8: 2663-2668.
- Lario, P.I., Sampson, N. y Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J. Mol. Biol.* 326: 1635-1650.
- Li, H., Robertson, A.D. y Jensen, J.H. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values. *Proteins* 61: 704-721.
- Lyubimov, A.Y., Lario, P.I., Moustafa, I. y Vrielink, A. (2006) Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. *Nat. Chem. Biol.* 2: 259-264.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 265-274.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Massey, V. (1995) Introduction: flavoprotein structure and mechanism. *FASEB J.* 9: 473-475.

- Massey, V. y Hemmerich, P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 246-257.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P.A., Howell, L.G., Mayhew, S.G., Matthews, R.G. y Foust, G.P. (1969) The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. *J. Biol. Chem.* 244: 3999-4006.
- Menon, V., Hsieh, C.T. y Fitzpatrick, P.F. (1995) Substituted alcohols as mechanistic probes of alcohol oxidase. *Bioorg. Chem.* 23: 42-53.
- Müller, F. y Massey, V. (1969) Flavin-sulfite complexes and their structures. *J. Biol. Chem.* 244: 4007-4016.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. y Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.
- Roth, J.P. y Klinman, J.P. (2003) Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 62-67.
- Rotsaert, F.A.J., Renganathan, V. y Gold, M.H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 42: 4049-4056.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Su, Q. y Klinman, J.P. (1999) Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. *Biochemistry* 38: 8572-8581.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.

- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (2000) Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.

CAPÍTULO 3

Difusión y oxidación del sustrato en oxidorreductasas GMC: un estudio experimental y computacional de la aril-alcohol oxidasa *

Resumen. La aril-alcohol oxidasa (AAO) produce el H_2O_2 requerido durante la degradación fúngica de la lignina, un proceso de alto interés biotecnológico. La estructura cristalográfica de la AAO revela que el centro activo, donde se oxidan diferentes alcoholes aromáticos, carece de un acceso directo desde el solvente. En este trabajo se ha estudiado la difusión y oxidación de los sustratos reductores de la AAO, y se ha comparado con la colina oxidasa (CHO), otra enzima relacionada estructuralmente. Empleando simulaciones de búsqueda de cavidades y difusión de ligandos se ha determinado que la entrada del sustrato al centro activo requiere de los desplazamientos de las cadenas laterales de algunos residuos del canal de acceso e interacciones de *stacking* con la Tyr92. A través de estudios de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM) y mutagénesis dirigida se ha determinado la importancia catalítica de dos residuos de histidina en el centro activo. La sustitución de ambos residuos por alanina dio lugar a las variantes H502A y H546A cuyas constantes catalítica (estado estacionario) y de reducción (estado transitorio) en presencia del alcohol *p*-metoxibencílico fueron 1800 y 35 veces inferiores, respectivamente, frente a la enzima nativa. La combinación de diferentes técnicas experimentales y computacionales, incluyendo perfiles de energía QM/MM, predictores de protonación, dinámica molecular, mutagénesis dirigida, y perfiles de pH, proporciona una sólida respuesta sobre la naturaleza de la base catalítica. La histidina frente al anillo de flavina, His502 en la AAO (His466 en la CHO), actúa como base. Para los dos sustratos ensayados, alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol, se ha visto que la transferencia del protón precede a la transferencia del hidruro, aunque ambos procesos están altamente acoplados. En los perfiles de energía para la reacción de la AAO no se han observado formas intermedias estables, en contraste con la CHO. Los resultados de QM/MM junto al efecto isotópico cinético del solvente, sugieren un mecanismo de oxidación de alcoholes concertado asincrónico en la AAO.

*Hernández-Ortega, A., Borreli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.

1. INTRODUCCIÓN

La aril-alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7) cataliza la oxidación de alcoholes aromáticos, y algunos alifáticos, a sus correspondientes aldehídos con la concomitante producción de H₂O₂ a partir de O₂ (Ferreira *et al.*, 2005). Este peróxido está implicado en la biodegradación de la lignina como sustrato de las peroxidases fúngicas de alto potencial redox responsables de la degradación oxidativa del polímero (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). La eliminación de la lignina es un paso clave durante el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres, y también un proceso esencial en la utilización de la biomasa vegetal en las futuras biorefinerías lignocelulósicas, donde la biotecnología podría contribuir a la producción sostenible de biocombustibles o productos químicos de interés (Martínez *et al.*, 2009). Globalmente, la reacción de la AAO consiste en la oxidación de alcoholes poliinsaturados, con un hidroxilo primario en el carbono- α , y la reducción del O₂ en presencia del cofactor FAD:



Tras la clonación del gen de la AAO (Varela *et al.*, 1999) y el modelado molecular de la proteína, la enzima reveló características comunes con miembros de la superfamilia de oxidorreductas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas) (Varela *et al.*, 2000). Una de las semejanzas con algunas de estas flavoenzimas es la presencia de dos histidinas conservadas en el centro activo, His502 e His546 en la AAO de *Pleurotus eryngii*, implicadas en la catálisis. Estudios de mutagénesis dirigida en la AAO mostraron la importancia de estas histidinas durante la catálisis (Ferreira *et al.*, 2006). La resolución de la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (PDB 3FIM) (Fernández *et al.*, 2009) ha confirmado que ambos residuos de histidina (His502 y His546) ocupan una posición relevante para la catálisis situándose en las proximidades del cofactor FAD (**Figura 1**, izda) en orientación similar a la descrita para la colina oxidasa (CHO). Se investigó la entrada de grandes ligandos al centro activo de la AAO debido a que en la estructura cristalográfica no se observa un canal de entrada definido y el centro activo está muy compactado. Concretamente, la cadena lateral de residuo Tyr92 bloquea el acceso al N5 de la flavina (catalítico), y por ello la entrada de los sustratos al centro activo requiere una importante reorganización de las cadenas laterales de algunos residuos.

En la superfamilia de oxidorreductas GMC, el mecanismo catalítico comúnmente aceptado comienza con la abstracción de un protón del alcohol por una base catalítica, que podría corresponderse con uno de los residuos de histidina mencionados anteriormente, His502 o His546 en la

AAO de *P.eryngii* (His466 y His352 en la CHO de *Arthrobacter globiformis*) (**Figura 1**), seguida de la transferencia de un hidruro desde el carbono- α del sustrato al N5 del FAD. El ciclo catalítico continúa con la reducción del O_2 a H_2O_2 por el FAD reducido. Los estudios mecanísticos basados en efectos isotópicos cinéticos (KIE) en la CHO y la metanol oxidasa plantearon la existencia de dos etapas diferentes durante la semi-reacción de reducción, siendo la transferencia de hidruro desde un alcóxido del sustrato, estabilizado por la proteína, la etapa limitante de la reacción (Menon *et al.*, 1995; Gadda, 2008). Los estudios de mutagénesis dirigida en la CHO (Ghanem y Gadda, 2005; Quaye *et al.*, 2008; Rungsruriyachai y Gadda, 2008) han intentado dilucidar el papel de los residuos del centro activo durante la catálisis. Ambas His466 e His351 en la CHO son importantes para la abstracción del protón, aunque no se determinó claramente la identidad de la base catalítica; y el Glu312 parece ser también importante en la unión de los sustratos.

En el presente trabajo se han empleado estudios computacionales y experimentales para investigar, por un lado, las bases estructurales de la migración del alcohol *p*-metoxibencílico, el sustrato natural de la AAO (Gutiérrez *et al.*, 1994), y del 2,4-hexadien-1-ol, un sustrato alifático poliinsaturado (Ferreira *et al.*, 2005) hacia el centro activo de la AAO; y por otro lado, las reacciones de transferencia de hidruro y protón durante la catálisis. Además, se llevaron a cabo simulaciones de la oxidación de la colina por la CHO, comparando los resultados con los de la AAO. Con este fin, se estudió la migración y el acoplamiento (*docking*) molecular inducido del ligando en la AAO empleando el programa *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005), un algoritmo reciente que es capaz de modelar los mecanismos de reconocimiento proteína-ligando. Para el estudio detallado del mecanismo catalítico, se emplearon métodos de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM) que combinan una región clásica, descrita como un conjunto de esferas “sólidas” con cargas puntuales y fuerzas de campo clásico, con una región cuántica donde se resuelve la ecuación de Schrödinger. Así, la descripción electrónica explícita del sistema está limitada a la región QM, contemplando todos los átomos involucrados en el proceso bioquímico (Friesner y Guallar, 2005; Senn y Thiel, 2007).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzima y variantes mutadas

La AAO recombinante de *P. eryngii* fue obtenida mediante expresión heteróloga del cDNA que codifica para la proteína madura en la cepa W3110 de *E. coli* (GenBankTM AF064069). La proteína producida en forma insoluble, tras un proceso de plegado *in vitro* en presencia del cofactor, se

purificó a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico según el protocolo descrito por Ruiz-Dueñas et al. (2006). Las variantes de la AAO H502S/A y H546S/A, fueron preparadas mediante PCR utilizando el kit comercial *QuikChange site-directed mutagenesis* (Stratagene). El cDNA de la AAO clonado en el vector pFLAG1 fue empleado como molde y los siguientes oligonucleótidos, incluyendo las mutaciones (subrayado) en los correspondientes tripletes (negrita) fueron usados como cebadores (se muestran solamente las secuencias directas): H502S, 5'-GCCAACACG ATTTTCAGCCCAGTTGGAACGGCC-3'; H502A, 5'-GCCAACACGAT TTTCGCCCCAGTTGGAACGGCC-3'; H546S, 5'-CCCTTCGCGCCCAA CGCAAGTACCCAAGGACCG-3'; H546A, 5'-CCCTTCGCGCCCAAACG CAGCTACCCAAGGACCG-3'. Los plásmidos mutados fueron aislados y el cDNA secuenciado (Secuenciador GS-FLX Roche) para confirmar las mutaciones introducidas. Las variantes fueron producidas como se indica arriba para la AAO nativa. Las concentraciones de enzima utilizadas fueron determinadas empleando los coeficientes de extinción molar: AAO, ϵ_{463} 11050 M⁻¹·cm⁻¹; H502S, ϵ_{468} 9980 M⁻¹·cm⁻¹; H502A, ϵ_{467} 9800 M⁻¹·cm⁻¹; H546S ϵ_{463} 12400 M⁻¹·cm⁻¹; y H546A, ϵ_{467} 9669 M⁻¹·cm⁻¹.

2.2 Cinéticas de estado estacionario y transitorio

Las medidas de actividad enzimática en estado estacionario se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Sigma-Aldrich) a *p*-anisaldehído (ϵ_{285} 16950 M⁻¹·cm⁻¹) (Ferreira *et al.*, 2005). Las constantes cinéticas de estado estacionario para la enzima nativa y las variantes H546S y H546A fueron determinadas mediante cinéticas bisustrato variando las concentraciones de ambos sustratos alcohol (4-2000 μ M) y oxígeno (51, 128, 273, 566 y 1279 μ M). Los ensayos se realizaron en cubetas selladas con un septo de silicona donde se equilibra la mezcla de reacción a la concentración de oxígeno deseada mediante burbujeo de la correspondiente mezcla comercial de O₂/N₂ durante 10-15 min. Las reacciones se inician mediante la inyección de la enzima, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el ajuste de las velocidades iniciales (k_{obs}) a distintas concentraciones de alcohol a la ecuación 1 (empleando SigmaPlot v11), que describe un mecanismo cinético ternario, donde e representa la concentración de enzima; k_{cat} es la constante catalítica; S es la concentración de alcohol; B es la concentración de O₂; $K_{m(Al)}$ y $K_{m(Ox)}$ son las constantes de Michaelis para S y B , respectivamente; y K_d es la constante de disociación de S .

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{\text{cat}}SB}{K_{\text{m(Ox)}}S + K_{\text{m(Al)}}B + SB + K_d K_{\text{m(Ox)}}} \quad \text{Ec. 1}$$

Las constantes de estado estacionario de las variantes H502S y H502A fueron determinadas variando únicamente la concentración de alcohol (62-5000 μM) a concentración atmosférica de oxígeno, debido a que la tasa de recambio es independiente de la concentración de oxígeno en estas variantes. Las constantes cinéticas fueron obtenidas ajustando las k_{obs} a la ecuación de Michaelis-Menten.

La dependencia de la actividad en función del pH (4-9) fue estudiada a 25°C empleando alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato y concentración atmosférica de oxígeno. Las medidas de actividad se realizaron en tampón citrato fosfato 0.1 M para el rango de pH 4-7 y pirofosfato 0.1 M para el rango de pH 8-9. La dependencia de las constantes cinéticas, $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ y $^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$, del pH fueron determinadas ajustando las k_{obs} a las ecuaciones 2-4. Los datos que mostraban una pendiente de +1 y -1 fueron ajustados a las ecuaciones 2 y 3, donde los valores pK_{a1} y pK_{a2} representan los valores de pK_{a} de los residuos ácidos y básicos, respectivamente. Los perfiles de pH de tipo campana se ajustaron a la ecuación 4, donde C es el valor independiente de pH del parámetro cinético de interés.

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-pK_{\text{a1}}}}} \right) \quad \text{Ec. 2}$$

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pK_{\text{a2}}}}{10^{-\text{pH}}}} \right) \quad \text{Ec.3}$$

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-pK_{\text{a1}}}} + \frac{10^{-pK_{\text{a2}}}}{10^{-\text{pH}}}} \right) \quad \text{Ec.4}$$

Para los estudios cinéticos de estado transitorio, se utilizó un equipo de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX17.MV (Applied Photophysics) usando un detector de longitud de onda fija o de diodos (350-900 nm) y los programas SX18.MV y Xscan, respectivamente. Las soluciones del sustrato y la enzima se prepararon por separado en tonómetros de vidrio, eliminando el oxígeno mediante ciclos sucesivos de vacío y argón. Para garantizar las condiciones de anaerobiosis durante las

medidas, antes de conectar los tonómetros a las jeringas del sistema se les adicionó una solución de glucosa oxidasa ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) y glucosa (10 mM). La anaerobiosis del equipo de mezcla rápida con flujo detenido se realizó con una solución anaeróbica saturada en ditionito y posteriores lavados del sistema con el tampón anterior en anaerobiosis (Fraaije y van Berkel, 1997). Las medidas se realizaron en tampón fosfato pH 6 a 25°C para las variantes H502S, H502A y H546A, y a 12°C para la enzima nativa debido a su rápida reducción. El estudio de la evolución espectral del proceso de reducción de las muestras se realizó mediante análisis global y ajustes a un modelo cinético $A \rightarrow B$ utilizando el programa de análisis *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd.), siendo A y B las especies espectrales cuantificables macroscópicamente correspondientes a las formas oxidada y reducida, respectivamente. Este modelo es equivalente a la ecuación monoexponencial utilizada para realizar el análisis cinético de la evolución de la reacción a una longitud de onda (462 o 467 nm , máximos espectrales de AAO y las variantes H502S, H502A y H546A en estado oxidado, respectivamente) y poder obtener así las constantes observadas (k_{obs}) para la reacción de reducción. Los valores de k_{obs} a diferentes concentraciones de sustrato se ajustan la ecuación 5, donde k_{red} y K_d son las constantes de reducción y disociación, respectivamente.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{red}}S}{K_d + S} \quad \text{Ec. 5}$$

2.3 Adecuación de los modelos de la AAO y la CHO

Los estudios computacionales están basados en la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) (Fernández *et al.*, 2009). Tras una inspección visual, las histidinas 91, 313, 387 y 398 fueron protonadas en su posición ϵ (y denominadas Hie), y las histidinas 137, 148 y 360 fueron protonadas en ambas posiciones ϵ y δ (y denominadas Hip, cargadas positivamente); todas las histidinas restantes fueron protonadas en δ (y denominadas Hid). Además se estudió el estado de protonación de las histidinas catalíticamente activas, His502 e His546, mediante dinámica molecular (MD) y métodos QM/MM. En el caso de la CHO, se utilizó la cadena A de la estructura 2JBV depositada en PDB (Quaye *et al.*, 2008). Las cadenas laterales del Glu222 y Glu340 fueron completadas y analizadas mediante PLOP (Jacobson *et al.*, 2004). Se eliminó el átomo de oxígeno que formaba un aducto con la flavina (Orville *et al.*, 2009) y se empleó el dimetilsulfóxido (DMS) de la estructura cristalográfica para modelar la posición del sustrato (colina). Tras la inspección visual, las histidinas 310, 506, 257, y 148 fueron protonadas en su posición ϵ y las histidinas 216 y 149 fueron protonadas en sus posiciones ϵ y δ , el resto de

histidinas fueron protonadas en su posición δ . Debido a la presencia de la molécula de DMS no fue necesario realizar la difusión de la colina al centro activo de la enzima, como se describe posteriormente para la AAO. El sistema fue equilibrado con una trayectoria MD de 1 ns. Tras los primeros 200 ps de la trayectoria MD, la colina (sustrato) adoptó su posición catalítica, con el grupo hidroxilo orientado hacia la His466.

2.4 Exploración dinámica de ligando y proteína: *PELE*

El algoritmo *Protein Energy Landscape Exploration (PELE)* combina una aproximación estocástica con métodos de predicción estructural, siendo capaz realizar la migración dinámica de ligandos en proteínas (Borrelli *et al.*, 2005; Guallar *et al.*, 2009; 2010). El algoritmo heurístico del *PELE* está basado en tres procesos principales: i) perturbaciones locales de ligando y proteína, incluyendo la traslación y rotación del ligando y desplazamientos de los carbonos- α de la proteína siguiendo un modelo de aproximación de red anisotrópica; ii) muestreo de las cadenas laterales, mediante el posicionamiento de las cadenas próximas al ligando; y iii) minimización de energía incluyendo, al menos, todos los residuos locales a los átomos implicados en i y ii. Típicamente, una simulación implica diferentes procesadores calculando las diferentes etapas y compartiendo la información conjunta para alcanzar un objetivo común. Se empleó el programa *SiteMap* (Halgren, 2007) para la exploración de cavidades en la AAO, permitiendo localizar el punto de partida para las migraciones investigadas con *PELE*.

2.5 Predicción de protonación y cálculos MD

Se emplearon tres programas diferentes para calcular la posición teórica de los hidrógenos y los valores de pK_a de las posibles bases catalíticas: i) *WhatIf* (Vriend, 1990), que utiliza patrones de enlaces de hidrógeno para elegir el mejor estado de protonación de los residuos estudiados; ii) *Adaptative Poisson Boltzmann Solver (APBS)* (Baker *et al.*, 2001), que emplea la ecuación de Poisson-Boltzmann para calcular los cambios intrínsecos de los valores de pK_a debido a la presencia de residuos adyacentes; iii) *Interaction Cluster Decomposition (ICDA)* (Li *et al.*, 2007), que utiliza bibliotecas de rotámeros de residuos, campos de fuerzas clásicos y solvatación implícita de Born. Los cálculos de MD fueron llevados a cabo mediante *NAMD v2.6* (Phillips *et al.*, 2005) comenzando por las estructuras determinadas tras la migración del ligando. La proteína fue solvatada en una solución de 0.5 M NaCl en cajas periódicas de 90 x 80 x 70 Å. Cada sistema, conteniendo aproximadamente 12000 moléculas de agua y 46000 átomos totales, fue equilibrado mediante una minimización

seguida por 10 ps de MD en el conjunto NVT (N, número de átomos; V, volumen del sistema; T, temperatura del sistema), seguidos por 0.5 ns de NPT (P, presión del sistema) y NVT con un paso de integración de 1 fs. Las trayectorias finales consintieron en 5 ns de MD con un paso de integración de 2 fs en el conjunto NVT, empleando la malla de partículas de *Ewald* para el tratamiento electrostático de largo alcance.

2.6 Cálculos QM/MM

Todos los cálculos QM/MM fueron realizados con el programa *QSite* (Schrödinger Inc, 2007) empleando la teoría del funcional de densidad (DFT) con un nivel teórico B3LYP, la función de base atómica 6-31G*, y la aproximación de la unión del átomo de hidrogeno para el corte de las partes cuántica (QM) y clásica (MM). La región cuántica incluye: el FAD, el alcohol (ligando), las tres histidinas del centro activo (502, 313 y 546 en la AAO, 466, 310 y 351 en la CHO), Glu389 en la AAO y Gln510 en la CHO. El campo de fuerzas *OPLS-AA (Optimized Potentials for Liquid Simulations-all atoms)* se empleó para el tratamiento de la parte MM. Para ambas enzimas el sistema QM/MM inicial se obtuvo tras el equilibrado de las moléculas de agua en la trayectoria de dinámica molecular, eliminando todas las situadas más allá de 10 Å de la superficie proteica. Todas las optimizaciones geométricas fueron realizadas restringiendo armónicamente los átomos de oxígeno de moléculas de agua alejadas 5 Å de la superficie (a más de 20 Å de cualquier átomo de la región QM). Se realizaron cálculos QM en fase gaseosa MP2 de segundo orden mediante *Gaussian03* (Frisch *et al.*, 2003) con la base 6-311G*. El tamaño de la región QM (~ 160 átomos) y la metodología (B3LYP) no permiten ir más allá de un análisis de coordenada de reacción QM/MM (optimizaciones de la geometría a lo largo de la coordenada de reacción protón/hidruro). Sin embargo, un nivel teórico similar ha demostrado ser valido en otros sistemas enzimáticos (Friesner y Guallar, 2005; Senn y Thiel, 2007). Cuando se construyeron las coordenadas de reacción QM/MM, se consideró tanto la posibilidad de que la transferencia de protón seguida de la transferencia de hidruro, como el proceso opuesto. El eje de ordenadas es la suma de las distancias de transferencia de protón e hidruro (distancia del hidrogeno al aceptor); los valores más altos corresponden a los reactivos (alcoholes) y los menores a los productos (aldehídos). Para cada estado de protonación se estudiaron tres mecanismos diferentes. Los dos primeros implican únicamente la transferencia de un átomo (el protón o el hidruro) con incrementos de 0.15 Å a lo largo de la coordenada de reacción. El tercer mecanismo implica el movimiento simultáneo (concertado) de ambos átomos.

3. RESULTADOS

Se han combinado estudios experimentales y computacionales para determinar el mecanismo de oxidación de alcoholes en el (escasamente accesible) centro activo de la AAO. En primer lugar, tras la exploración de cavidades, se estudió la ruta de migración de los alcoholes desde la superficie de la proteína empleando el programa *PELE*. Después se investigó experimentalmente el papel de dos histidinas del centro activo a través de la caracterización de las variantes obtenidas mediante mutagénesis dirigida, y se predijo su estado de protonación con el propósito de identificar la base catalítica. Finalmente se obtuvieron, mediante métodos de QM/MM, los perfiles de energía de las reacciones de la AAO y la CHO con objeto de determinar los tiempos de transferencia de protón e hidruro, y la existencia de intermediarios de reacción.

3.1 Migración de ligandos hasta el centro activo de la AAO

En la estructura cristalográfica de la AAO se observa un centro activo no expuesto al solvente, conteniendo únicamente algunas moléculas de agua. Así mismo, se observa que la cavidad del centro activo es pequeña y el acceso al N5 de la flavina está bloqueado por la cadena lateral de la Tyr92 y otros residuos (**Figura 1**, izda). Por tanto, el acoplamiento directo de grandes ligandos, como los alcoholes aromáticos sustratos de la AAO, no parece el procedimiento más adecuado para estudiar el posicionamiento de los sustratos en el centro activo. Así, durante la exploración de posibles cavidades en la estructura de la enzima con *SiteMap*, sólo se encontraron sitios de unión de ligandos en la superficie de la proteína. Por tanto, se procedió a colocar el ligando en la superficie y realizar posteriormente la migración hacia el centro activo mediante las simulaciones con *PELE*. Curiosamente, la posición preferente obtenida con *SiteMap* se localizó en las proximidades de la Pro402, que forma parte del *loop* flexible que conecta la superficie de esta enzima con el centro activo. Para confirmar el punto de entrada de la migración, primero se mutó *in silico* la molécula de agua del centro activo por metanol (**Figura 1**) y se llevaron a cabo las simulaciones mediante *PELE*, asignando al programa la tarea de mover el metanol desde su posición inicial hasta el exterior de la proteína, siguiendo una dirección libre y aleatoria. Las tres simulaciones realizadas con diferentes temperaturas (300, 500 y 1000 K) dieron lugar a una ruta de salida idéntica que terminaba en la Pro402 (**Figura 2**).

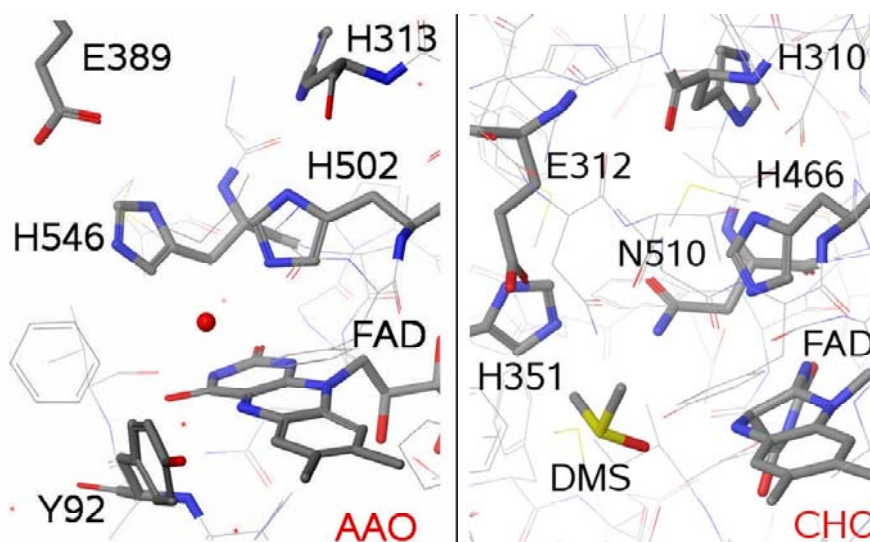


Figura 1. **Estructura cristalográfica del centro activo de la AAO y la CHO.** Se muestran el anillo de isoaloxacina del FAD y cinco residuos del centro activo (colores CPK). Una molécula de dimetilsulfoxido (DMS) ocupa el sitio de unión a sustrato en el centro activo de la CHO, mientras que una molécula de agua (esfera roja) se localiza en el centro activo de la AAO. PDB 3FIM y 2JBV, respectivamente (Quaye *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009).

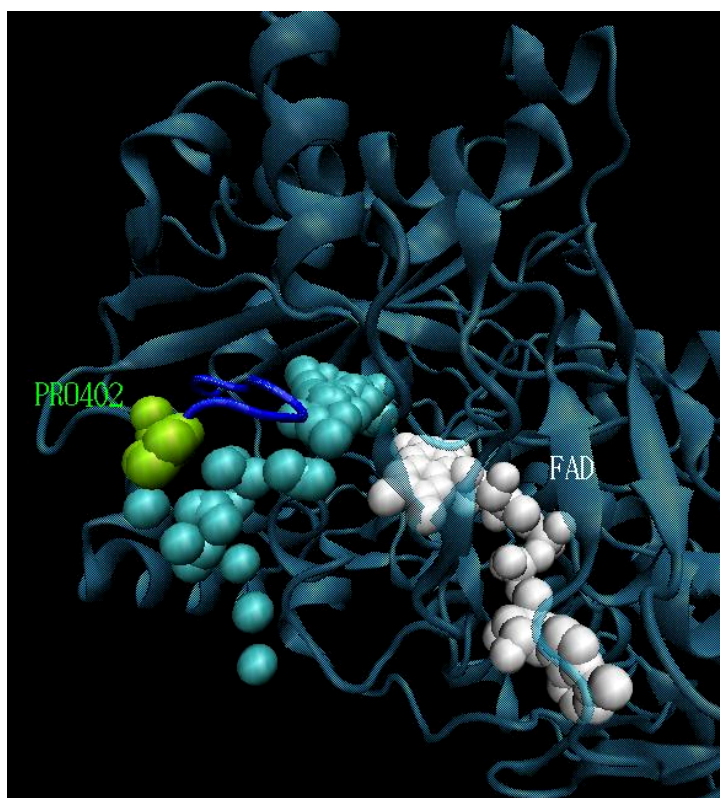


Figura 2. **Canal de salida del metanol en la AAO.** Predicción de la trayectoria de migración del metanol mediante *PELE*, mostrada como una serie de esferas de van der Waals (color cian), desde el centro activo de la AAO, próximo al anillo de isoaloxazina del FAD (esferas blancas), hasta la superficie proteica. Se indica el *loop* 395-406 (azul oscuro) implicado en la migración, incluyendo la Pro402 (esferas verdes).

La concordancia entre el resultado obtenido con *SiteMap* y la ruta de salida del metanol obtenida con *PELE*, identificó claramente el punto de entrada del canal de acceso de los ligandos en la AAO. A continuación se situaron los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol en este punto de la superficie y se pidió al programa *PELE* que migrara ambos ligandos hacia el centro activo, aproximándose al residuo His502, cuyo papel en la catálisis se discute más adelante. La **Figura 3** muestra el perfil de energía para la difusión del 2,4-hexadien-1-ol al centro activo de la enzima, equivalente al perfil de energía observado con el alcohol *p*-metoxibencílico, representando la energía interna de cientos de conformaciones frente a la distancia ligando-FAD, y mostrando claramente tres mínimos de energía. El perfil energético indicó que la entrada estaba localizada a ~ 17 Å del anillo de flavina, próximo a la Pro402. Desde este punto el movimiento del ligando estaba acoplado a las oscilaciones del *loop* Gln395-406. El segundo mínimo de energía se correspondía con el primer intermediario estable a ~ 11 Å del FAD, donde interacciona (a través de interacciones π) con la Phe397. A partir de este punto, la migración del ligando al centro activo requería de reajustes de la cadena lateral de este residuo, así como de diversos residuos hidrofóbicos (como la Leu315 y la Ile391) y de la Tyr92. En el centro activo, el alcohol adoptó una orientación catalíticamente competente a una distancia de ~ 5 Å (centro de masas) del anillo de flavina.

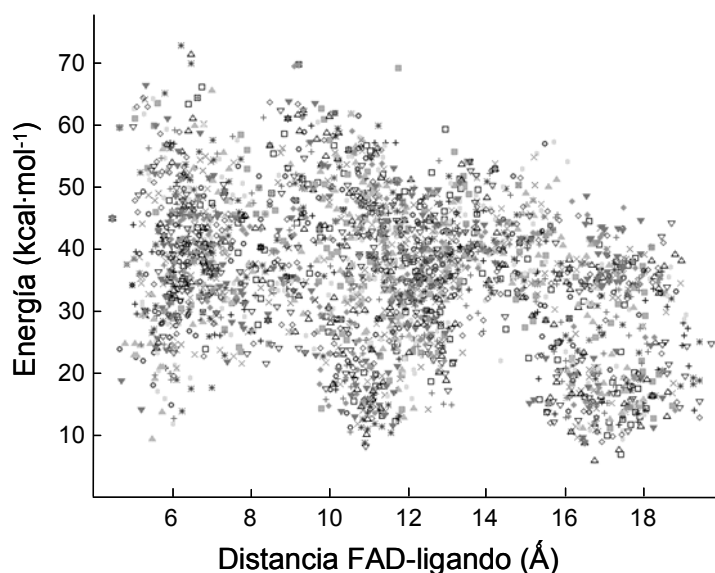


Figura 3. **Perfil de energía obtenido mediante *PELE* para la difusión del sustrato al sitio activo de la AAO.** El eje-x muestra la distancia del N5 del anillo de flavina al centro de masas del 2,4-hexadien-1-ol, y el eje-y las energías internas de cientos de conformaciones obtenidas mediante *PELE* (cada punto corresponde a una conformación diferente obtenida por cada uno de los 12 procesadores trabajando durante 10 h).

La **Figura 4** muestra tres instantáneas a lo largo de la ruta de migración del alcohol *p*-metoxibencílico, que se corresponden con los tres mínimos de energía mostrados en la **Figura 3**. En el panel de la izquierda se muestra una conformación representativa de la unión del ligando a la superficie. En el panel central se muestra una etapa intermedia donde se observa una interacción de *stacking* π - π entre el alcohol *p*-metoxibencílico y la Phe397. El panel de la derecha muestra la conformación final en el centro activo, donde aparecen marcadas con una línea rosa las coordenadas de abstracción de protón e hidruro. Esta última estructura corresponde a la especie catalíticamente competente, empleada para realizar los cálculos QM/MM que se describen más adelante.

La última estructura también sugiere que en el centro activo la cadena lateral de la Tyr92 establece interacciones *stacking* π - π con el sustrato. La interacción observada no es una interacción paralela, sino de tipo “*edge-to-plane*” (tipo-T) (**Figura 4C**). En las geometrías finales obtenidas tras *PELE*, las energías de interacción QM obtenidas mediante MP2, confirman la naturaleza de este tipo de interacciones. Se obtuvieron energías de estabilización para los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol de -2.7 y -1.6 kcal·mol⁻¹ (1 kcal = 4.184 kJ), respectivamente. Además, existen tres películas, producidas para ilustrar la migración del ligando en el centro activo, incluidas en el CD adjunto a la tesis (**Películas 1-3**).

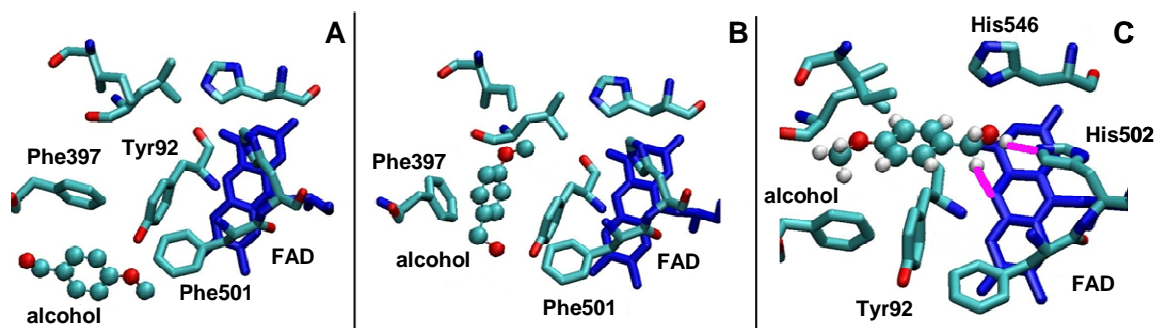


Figura 4. **Tres instantáneas representativas del proceso de difusión del sustrato hacia el centro activo de la AAO.** Se muestran tres instantáneas diferentes a lo largo de la migración del alcohol *p*-metoxibencílico al centro activo de la AAO determinada mediante las simulaciones con *PELE*. El panel derecho (C) corresponde a la conformación catalíticamente competente, donde se muestran las coordenadas de transferencia del protón y el hidruro (al N ϵ de la His502 y al N5 del FAD, respectivamente) mediante líneas rosas, mientras que en los otros paneles se muestran la entrada del alcohol (A) y una posición intermedia en la trayectoria de migración (B).

3.2 Mutagénesis de las histidinas del centro activo: parámetros cinéticos y perfiles de pH

El centro activo de la AAO posee dos histidinas conservadas, además del residuo de tirosina (Y92) implicado en la estabilización del sustrato (**Figura 1**). Ambas histidinas fueron reemplazadas independientemente por serina y alanina mediante mutagénesis dirigida dando lugar a las variantes H502S/A y H546S/A. Las dos variantes H502S/A mostraron una disminución severa en la tasa de recambio (alrededor de 2900 veces), mientras que las variantes H546S/A presentaron descensos menores (12 y 60 veces, respectivamente) (**Tabla 1**). Todas las sustituciones causaron un descenso en la afinidad por el alcohol, que fue mayor para las variantes H502S/A (27 y 80 veces, respectivamente) comparado con las variantes H546S/A (8 y 25 veces, respectivamente). Estas mutaciones provocaron que las variantes H546S, H546A, H502S y H502A fueran, respectivamente, 80, 1450, 80000 y 200000 veces menos eficientes que la enzima nativa oxidando el alcohol *p*-metoxibencílico.

Se investigó la semi-reacción de reducción (oxidación del sustrato) en las variantes H502S/A y H546A mediante estudios de estado transitorio en condiciones de anaerobiosis empleando un equipo de mezcla rápida con flujo detenido (la baja estabilidad de la variante H546S impidió su caracterización por este método). Tal y como se determinó previamente para la AAO nativa, en estas variantes no se observaron formas intermedias de la flavina durante su reducción a la forma hidroquinona. Las constantes de reducción observadas mostraron una dependencia de la concentración de alcohol *p*-metoxibencílico, ajustándose a la Ec. 5 y permitiendo la determinación de las constantes de reducción (k_{red}) y disociación del sustrato (K_d) (**Tabla 1**). Los valores de las k_{red} para las variantes H546A, H502S y H502A fueron al menos 35, 1200 y 1800 veces menores, respectivamente, a la AAO nativa, y además se observó una fuerte disminución de la afinidad por el alcohol (valores de K_d 50-200 veces más altos). Estos datos confirmaron que ambos residuos His502 e His546 participan en la catálisis de la AAO, jugando un papel crucial durante la semi-reacción de reducción.

Tabla 1**Parámetros cinéticos de estado estacionario y transitorio de la AAO nativa y las variantes de His502 e His546 empleando alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato**

	AAO	H502S	H502A	H546S	H546A
<i>Estado estacionario:</i>					
k_{cat} (s^{-1})	208 ± 5	0.069 ± 0.005	0.072 ± 0.002	17 ± 1	3.5 ± 0.1
K_m (μM)	48 ± 3	1289 ± 246	3820 ± 234	310 ± 56	1160 ± 33
k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	4330 ± 290	0.054 ± 0.01	0.019 ± 0.001	53 ± 11	3.0 ± 0.1
<i>Estado transitorio:</i>					
k_{red} (s^{-1})	139 ± 16	0.111 ± 0.002	0.076 ± 0.001	nd ^a	3.96 ± 0.05
K_d (μM)	26 ± 5	4740 ± 184	3180 ± 74	nd	1310 ± 30

Las constantes de estado estacionario para la AAO nativa y las variantes de la His546 fueron determinadas variando simultáneamente la concentración de alcohol *p*-metoxibencílico y O_2 en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C; mientras que las constantes de las variantes de la His502 fueron determinadas a concentración atmosférica de oxígeno (no hay dependencia de la concentración de O_2). Las constantes de estado transitorio fueron determinadas a 12°C y 25°C para la AAO nativa y sus variantes, respectivamente, empleando el tampón anteriormente citado. ^a nd, no determinado por la inestabilidad de la variante H546S.

Respecto a la dependencia del pH, la AAO nativa, al contrario que la variante His546S, no mostró un claro perfil de dependencia durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (**Figura 5**). El perfil de eficiencia catalítica para la variante H546S sugiere que un residuo con un valor de $\text{p}K_a$ 3.8 debe estar desprotonado durante la catálisis. El perfil de dependencia del pH de tipo campana para la tasa de recambio indicaba la implicación de dos grupos ionizables: uno con un $\text{p}K_a \leq 3.5$ debe estar desprotonado y otro con un $\text{p}K_a \geq 8.3$ debe estar protonado durante la catálisis. Tal y como se muestra en la **Tabla 1**, la actividad de la variante H502S fue demasiado baja para permitir la determinación de la eficiencia catalítica a diferentes valores de pH. Sin embargo, se pudo determinar un $\text{p}K_a \geq 7.5$ para la tasa de recambio de la variante H502S (**Figura 5B**), que se corresponde con un residuo que debe estar protonado durante la tasa de recambio, desapareciendo al mismo tiempo el $\text{p}K_a \leq 3.5$ observado previamente, sugiriendo así que este último se corresponde con la His502 sustituida por serina en esta variante.

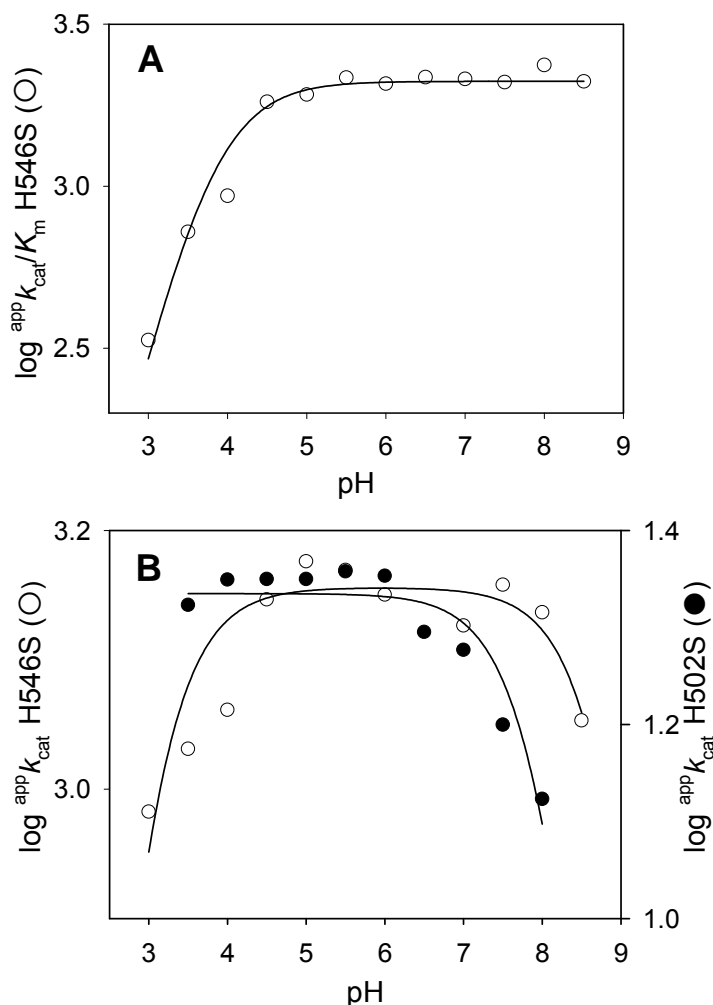


Figura 5. Dependencia del pH de las constantes cinéticas en dos variantes mutadas de la AAO. Eficiencia catalítica aparente ($^{app}k_{cat}/K_m$ en $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (A) y tasa de recambio ($^{app}k_{cat}$ en min^{-1}) (B) para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por las variantes H546S y H502S, determinadas a diferentes valores de pH, en atmosfera de aire, a 25°C, y representadas empleando la transformación logarítmica (y dos ejes-y diferentes en B).

3.3 Estados de protonación de His502, His546 y otros residuos del centro activo

Los resultados de mutagénesis dirigida indicaron la importancia de los residuos de His502 e His546 en la catálisis, pero no revelaron si estaban protonados en sus posiciones δ o ϵ (Hid o Hie) o en ambas posiciones (Hip), un aspecto fundamental a la hora de identificar la base catalítica. Por ello, se estudió el estado de protonación del conjunto de residuos Glu389/His546/His502/His313 con tres predictores de pK_a diferentes. En presencia de sustrato, todos los métodos coincidieron en que la carga neta

del conjunto debía ser cero con diferencias en el residuo que debía estar preferentemente protonado. *WhatIF* e *ICDA* protonaron el Glu389 mientras que *APBS* protonó la His546. Por lo tanto, como era de esperar, se estableció la carga negativa del Glu389 en el centro activo aunque no quedó claro cual de los residuos estaba protonado.

Para determinar adecuadamente la protonación de los diferentes residuos, se llevó a cabo una minimización QM/MM sobre la estructura cristalográfica de la AAO libre de sustrato, incluyendo como región QM: las tres histidinas, el glutámico y la flavina. Cuando la His546 estaba protonada (Hip546), ocurría una transferencia espontánea de protón entre la His546 y el Glu389, formando un glutámico neutro, Glh389, y disminuyendo la separación de cargas del centro activo. La protonación de los residuos His313 o His502 (originando Hip313 o Hip502), dio lugar a una conformación menos estable (+8.9 y +2.5 kcal·mol⁻¹, respectivamente) respecto a la situación con la His546 protonada (Hip546). Además, el RMSD de la estructura cristalográfica con Hip546 fue también menor (0.63 Å), confirmando que el estado con el Glu389 en su forma neutra es la configuración correcta. Los mismos resultados descritos anteriormente fueron obtenidos cuando las simulaciones se realizaron con el alcohol *p*-metoxibencílico unido al centro activo de la AAO. La naturaleza neutra del Glu389 está relacionada con el entorno hidrofóbico de un centro activo aislado en la estructura cristalográfica. En contraste con el glutámico equivalente en la CHO, Glu312, que está en contacto directo con el solvente en la estructura cristalográfica. Esto se observa claramente, por ejemplo, cuando se emplea un predictor de protonación como *APBS*, que determinó un valor de p*K*_a de 8.19 para el Glu389 (similar al p*K*_a básico obtenido experimentalmente para las variantes de histidina de la AAO) (**Figura 5B**), mientras que para el Glu312 de la CHO se obtuvo un valor de p*K*_a de 5.4.

Para explorar en detalle los posibles estados de protonación de los residuos His502 e His546, se realizó una MD de 5 ns para 6 estados diferentes de protonación: tres para la His546 (Hid, Hie y Hip) y dos para la His502 (Hid y Hie). El estado de protonación de la His313 fue modificado en cada una de las simulaciones (Hid313 o Hie313) para mantener los enlaces de hidrógeno. La **Figura 6** muestra las distancias de transferencia de hidruro y protón a lo largo de las simulaciones de MD para los dos únicos estados de protonación capaces de transferir el protón. La combinación de Hip546 y Hid502 producía especies catalíticamente estables donde ambos procesos, abstracción de protón y transferencia de hidruro fueron simultáneamente óptimos, tal y como se muestra en la **Figura 6A**.

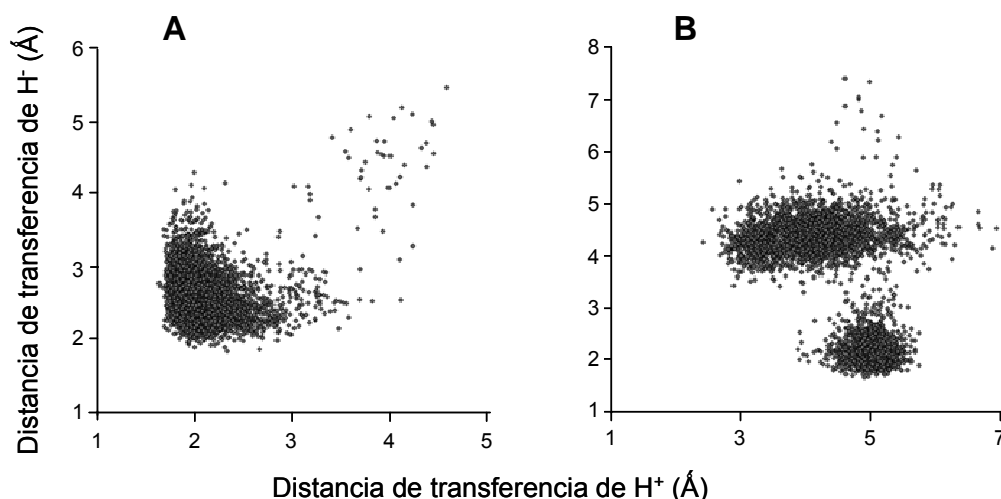


Figura 6. **Estudios de protonación de las histidinas.** Se muestran las distancias de transferencia de protón e hidruro desde la posición del alcohol *p*-metoxibencílico a la histidina capaz de actuar como base catalítica (His502 o His546) y al N5 de la flavina, respectivamente, a lo largo de las simulaciones MD de 5-ns (instantáneas guardadas cada 2 ps), considerando dos posibles estados de protonación: **(A)** Hid502/Hip546, con la His502 protonada únicamente en N δ y la His546 doblemente protonada; y **(B)** Hie502/Hie546, con ambas histidinas protonadas únicamente en el N ϵ .

La combinación de Hie546 y Hie502 generó una transferencia independiente de protón e hidruro, sin embargo no permitió la transferencia simultánea de ambos hidrógenos (H^+ y H^-), como se observa al comparar ambas distancias de transferencia en la **Figura 6B**. Esta última combinación requiere que el Glu389 esté desprotonado, en contradicción con los resultados obtenidos con los predictores de pK_a . Además, los resultados posteriores mostraron que la barrera energética es significativamente mayor cuando la transferencia del hidruro es anterior a la transferencia del protón. El resto de estados de protonación no estabilizaron estructuras capaces de transferir un protón a la His502 o la His546. Por lo tanto, solamente la combinación de Hip546 e Hid502 produce especies catalíticamente estables donde ambas distancias de abstracción de protón (por la histidina que actúa como base) y de transferencia de hidruro (al N5 de la flavina) son simultáneamente óptimas.

Para ilustrar lo anterior, la **Figura 7A** y **B** muestra los estados inicial y final cuando la His546 está protonada, en concordancia con las simulaciones de QM/MM y de MD, y la **Figura 7C** muestra el estado de protonación Hie502/Hie546.

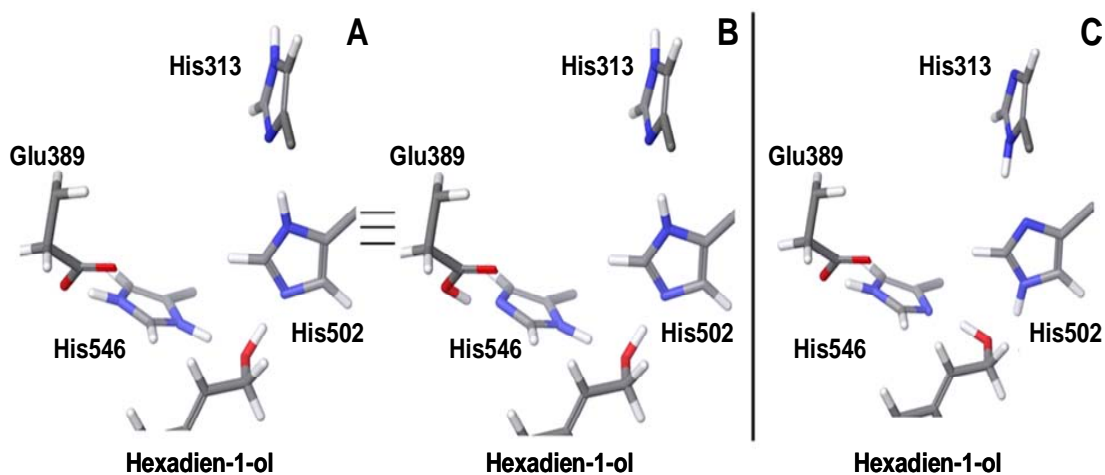


Figura 7. **Estados de protonación teóricos de los residuos del centro activo de la AAO.** (A) Estado de protonación inicial de la His546 con la His502 protonada en N δ y la His546 doblemente protonada (Hid502/Hip546); (B) estado de protonación final de la His546 con ambas histidinas protonadas en N δ y el Glu389 protonado (Glh389/Hid502/Hid546); (C) estado de protonación de la His502 con ambas histidinas protonadas únicamente en N ϵ (Hie502/Hie546). La cadena lateral de la His546 ha sido girada respecto a la estructura cristalográfica original (3FIM).

3.4 Análisis QM/MM de las reacciones enzimáticas de la AAO y la CHO

Posteriormente, se determinó el perfil energético QM/MM para la oxidación del alcohol por la AAO, partiendo de las especies catalíticamente activas generadas tras la migración de ligando, en las que el sustrato ocupa el centro activo. Los análisis anteriores habían indicado que el estado de protonación Glh389/Hid502/Hid546 es preferente al Hie502/Hie546 (**Figura 7B** y **C**, respectivamente). A pesar de ello se realizaron los cálculos para ambos estados, que se denominaron como Glh389/Hid502 y Hie502/Hie546. En el primer caso, la His502 acepta el protón y la His546 une el sustrato mediante un puente de hidrógeno; en el segundo caso los roles de ambas histidinas se invierten.

La **Figura 8A** muestra el perfil energético obtenido para el alcohol *p*-metoxibencílico con estos dos estados de protonación. Como se esperaba en este tipo de mecanismos de reacción, los perfiles indican que el protón es el primero en ser transferido; ya que si el proceso comenzaba por la transferencia de hidruro, se originaban barreras energéticas más altas (y tempranas). En todos los casos, el componente principal de la barrera energética corresponde a la transferencia de hidruro. La **Figura 8B** muestra los perfiles energéticos correspondientes a la oxidación del 2,4-hexadien-1-ol donde únicamente se representan los perfiles energéticos en los que el

protón es el primero en ser transferido, ya que la transferencia inicial del hidruro dio lugar al mismo resultado que con el alcohol *p*-metoxibencílico. El tercer mecanismo ensayado fue la transferencia simultánea de protón e hidruro (concertado-sincrónico), que produjo las barreras energéticas más altas para ambos sustratos. Todos los intentos de encontrar un estado de transición durante la transferencia sincrónica, con cualquiera de los sustratos, resultó en barreras energéticas superiores a $30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

En el caso del estado de protonación Hie502/Hie546 (**Figura 7C**) la transferencia de protón a la Hie546 implicó una segunda transferencia espontánea al Glu389 con ambos sustratos, actuando la cadena lateral del glutámico como base final. En el estado Glh389/Hid502 (**Figura 7B**), la His502 forma un enlace de hidrógeno con la His313, que podría actuar como base final. Sin embargo, todos los intentos de continuar la transferencia de protón hasta la His313, dio lugar a estructuras inestables antes y después de la transferencia de hidruro con ambos sustratos, volviendo el protón de nuevo a la His502.

La estructura cristalográfica de la CHO indica la correlación entre la His466 y la His502 de la AAO, pero la His546 de la AAO se corresponde con un residuo de Asn (Asn510) en la CHO (**Figura 1**). Sin embargo existe una segunda histidina en la CHO capaz de actuar como base, la His351. Empleando QM/MM se estudiaron cuatro bases catalíticas alternativas en la CHO: His351, His466, Glu312, y el O4 de la flavina. Únicamente cuando se empleó la His466 como base se obtuvo un perfil energético con un intermediario alcóxido y la barrera energética más baja. Paralelamente a lo que ocurre con la His546 en la AAO, la abstracción de un protón por la His351 indujo una transferencia espontánea desde esta histidina al Glu312. Por tanto, el estado final es el mismo cuando la His351 o el Glu312 actúan como bases. El perfil energético indicaba una barrera energética de $\sim 20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y una endotermicidad de $18 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que se traduce en un intermedio alcóxido inestable.

La **Figura 9** compara los perfiles energéticos de la CHO y la AAO cuando se utilizan los residuos His466 e His502 como bases, respectivamente. La oxidación de la colina en la CHO presenta una barrera energética $\sim 10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ menor, y presenta un intermediario estable como resultado del primer evento de transferencia del protón, $\sim 6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ mayor que los reactivos, mientras que en la AAO no se estabiliza ningún intermedio de reacción.

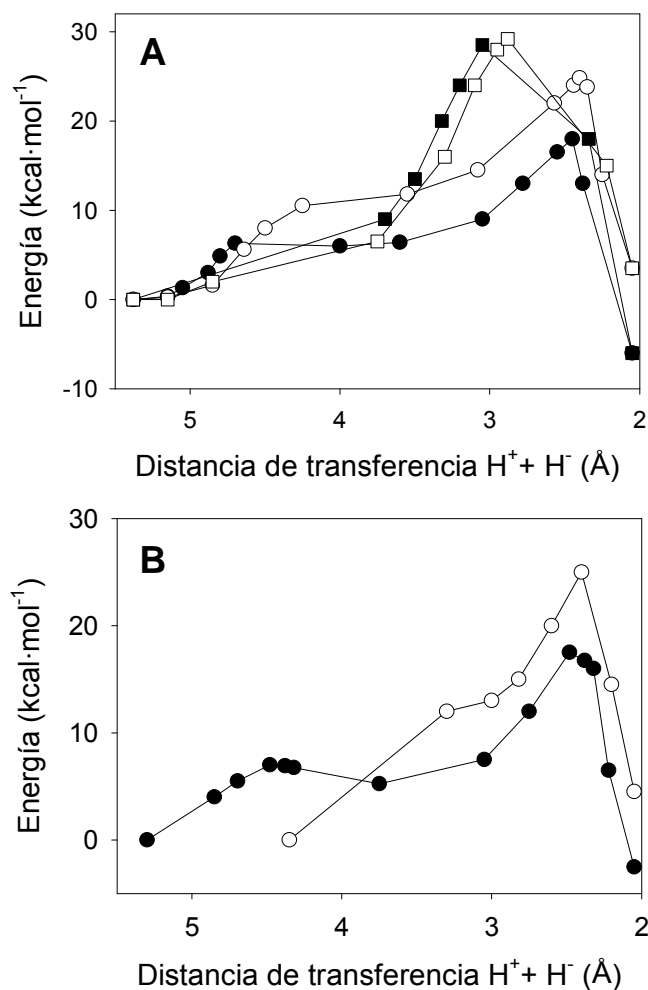


Figura 8. **Perfiles para la deshidrogenación del alcohol *p*-metoxibencílico y el 2,4-hexadien-1-ol por la AAO.** Perfiles de energía QM/MM obtenidos para las reacciones de la AAO con el alcohol *p*-metoxibencílico (**A**) y el 2,4-hexadien-1-ol (**B**). En estas simulaciones se han empleado, dos estados de protonación de Glu389, His502 e His546 (**B** y **C** en **Figura 5**) y dos posibles comienzos de la reacción (transferencia de hidruro o de protón) en las siguientes combinaciones: Glh389/Hid502/Hid546, reacción iniciada por transferencia de hidruro (□); Glh389/Hid502/Hid546, reacción iniciada por transferencia de protón (○); Hie502/Hie546, reacción iniciada por transferencia de protón (●); e Hie502/Hie546, reacción iniciada por transferencia de hidruro (■). El curso de la reacción, desde la izquierda a la derecha del eje-X, fue estimado como la distancia entre el hidrógeno del grupo hidroxilo del alcohol y la histidina catalítica (transferencia H⁺) más la distancia entre el hidrógeno bencílico y el N5 de la flavina (transferencia de H⁻).

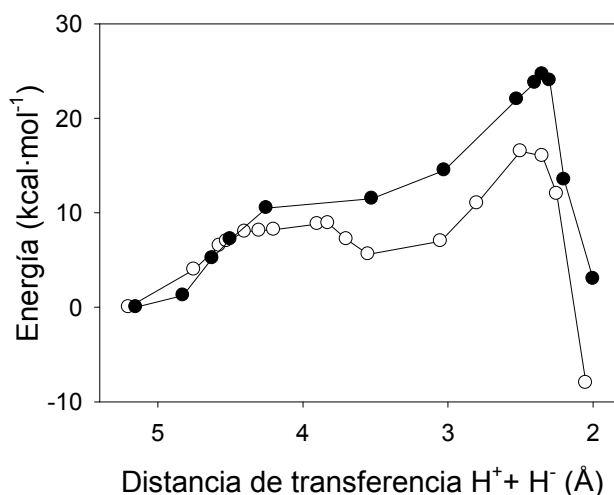


Figura 9. **Perfiles de energía durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO y la oxidación de la colina por la CHO.** Los perfiles energéticos para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO (○) y la colina por la CHO (●), en reacciones iniciadas por la transferencia de un protón a la base catalítica (His502 e His466, respectivamente) seguida de la transferencia de hidruro al N5 de la flavina, fueron obtenidos mediante cálculos QM/MM. El curso de la reacción, desde la izquierda a la derecha del eje-X, fue estimado como la distancia entre el hidrógeno del grupo hidroxilo del alcohol y la histidina catalítica (transferencia del H⁺) más la distancia entre el hidrógeno bencílico del alcohol y el N5 de la flavina (transferencia de H⁻).

Además, en contraste a lo observado en la AAO, la abstracción del protón en la CHO produce una segunda transferencia espontánea del protón desde la His466 a la His310 (**Figura 1**). Esta segunda transferencia genera una disminución de la energía de ~ 3 kcal·mol⁻¹, lo que contribuye significativamente a la estabilización del intermediario alcoxido de la reacción en la CHO. Tal y como se muestra en la **Figura 9**, el perfil energético durante la segunda parte del proceso (la transferencia de hidruro) es prácticamente idéntico en ambos sistemas; mientras que la exotermicidad del proceso en la CHO proviene principalmente de la estabilización del intermediario.

4. DISCUSIÓN

4.1 Difusión del sustrato al centro activo de la AAO

Las simulaciones de unión y migración de ligando indican claramente que la entrada del sustrato al centro activo de la AAO está acoplada a las oscilaciones del *loop* Gln395-Thr406. Tal y como se ha descrito recientemente (Fernández *et al.*, 2009), este *loop* representa una característica estructural propia de la AAO, comparada con las estructuras de la glucosa oxidasa y la CHO. En las enzimas anteriores el centro activo es mucho más accesible, debido a la ausencia del *loop*, aunque un estudio computacional reciente ha propuesto la existencia de un mecanismo de puerta (*gating*) en la CHO (Xin *et al.*, 2009).

El perfil energético de la ruta de migración determinada con *PELE* para la AAO, muestra una etapa intermedia donde el ligando interacciona con la Phe397. La entrada de ligandos acoplada a movimientos de cadenas laterales de residuos de fenilalanina parece ser una característica común en diversos sistemas, tal y como se ha descrito recientemente en el citocromo P450 (Borrelli *et al.*, 2005; Fishelovitch *et al.*, 2009). Una vez en el centro activo, el ligando adopta una posición catalítica con el hidrógeno del grupo hidroxilo orientado hacia las posibles bases catalíticas (His502/546), uno de los hidrógenos del carbono- α orientado hacia el N5 del FAD (a una distancia de 2.4-2.5 Å) facilitando la transferencia de hidruro, y el anillo aromático estableciendo interacciones tipo π - π con la Tyr92. Nuestros estudios sugieren que esta última interacción es del tipo-T (*T-shaped*), ampliamente estudiada en sistemas biológicos (Meyer *et al.*, 2003), y que constituye uno de los principales mínimos energéticos locales en dímeros de benceno (Dinadayalane y Leszczynski, 2009). Estudios anteriores de mutagénesis dirigida de la Tyr92 (Ferreira *et al.*, 2006) mostraron el requerimiento de un residuo aromático en esta posición, ya que la variante Y92A fue totalmente inactiva, mientras que los parámetros cinéticos de la variante Y92F fueron similares a los de la enzima nativa, apoyando así la implicación de la interacción π - π en la catálisis de la AAO.

4.2 Mecanismo concertado no-sincrónico en la oxidación de alcoholes por la AAO

Se ha estudiado intensamente el papel de los residuos de histidina conservados en el centro activo de las enzimas de la superfamilia de oxidorreductasas GMC. Estos residuos actuarían como bases y ácidos durante las semi-reacciones de reducción y oxidación, respectivamente (Wohlfahrt *et al.*, 1999; Su y Klinman, 1999; Roth y Klinman, 2003; Gadda, 2008).

Los estudios de mutagénesis dirigida llevados a cabo indicaron la importancia de ambas histidinas durante la semi-reducción de reducción de la AAO. La caracterización de la variante H546A empleando el alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato, reveló un descenso en los valores de k_{cat} y k_{red} (20-60 veces), y un incremento de los valores de K_m y K_d (en un orden similar). Por tanto la His546 estaría participando tanto en la unión como en la oxidación de los sustratos. Este papel de la His546 está en concordancia con los resultados encontrados durante los estudios de MM donde el estado de protonación Hid502/Hip546 produjo el mejor alineamiento del sustrato durante la catálisis, y en el que las distancias de transferencia de hidruro y protón eran simultáneamente óptimas. La observación de la estructura cristalográfica, donde la His546 está próxima al Glu389, indica que ambos residuos forman un enlace de hidrógeno, donde tanto la His546 como el Glu389 podrían estar protonados. Los estudios posteriores empleando predictores de protonación confirmaron que el Glu389 está protonado y que ambas His546 e His502 están protonadas únicamente en el N δ (forma neutra). La caracterización cinética de las variantes His502S/A mostró un descenso de ~ 3000 veces para la k_{cat} , y de al menos ~ 1000 veces para la k_{red} , sugiriendo que la His502 podría ser la base catalítica en la AAO. Este residuo también es fundamental en la unión del sustrato, tal y como se ha observado por la disminución de la afinidad (K_m 27-80 veces mayor, y K_d 100-200 veces mayor) en las variantes anteriores. Aquellas mutaciones que pudieran cambiar la polarización del centro activo o exponerlo al solvente provocarían un descenso en el valor de pK_a para el Glu389, permitiendo a la His546 actuar como base.

Los perfiles de energía QM/MM durante la oxidación de los alcoholes por la AAO indican la presencia de unos intermediarios de reacción muy inestables (con una barrera energética de $\sim 1-2$ kcal \cdot mol $^{-1}$ para los reactivos). Los cálculos anteriores se refieren solamente a energías internas, sin considerar las energías de vibración o térmicas. Las correcciones de estas energías son del orden de 3-4 kcal \cdot mol $^{-1}$ para las reacciones de transferencias de protón (Truong y McCammon, 1991; Agarwal *et al.*, 2002; Guallar *et al.*, 2002) (ver por ejemplo la Figura 3 en Agarwal *et al.*, 2002). Cuando se consideraron estas energías en todos los perfiles energéticos, ninguno presentó intermediarios de reacción. La ausencia de estos intermediarios indica la presencia de un mecanismo catalítico donde las transferencias de protón e hidruro tienen lugar de forma concertada. Este resultado es similar al obtenido durante los estudios experimentales previos, donde se emplearon las formas α -dideuteradas de los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol, y agua deuterada como solvente de la reacción (Ferreira *et al.*, 2009). Aquellos estudios mostraron un efecto isotópico cinético del sustrato elevado, confirmando el mecanismo de transferencia de hidruro, mientras que la transferencia de un protón fue

confirmada a través del menor pero consistente efecto isotópico del solvente (y un claro efecto isotópico múltiple cuando se combinaron los alcoholes y el solvente deuterados) (**Tabla 2**). Estos efectos isotópicos cinéticos se determinaron tanto en condiciones de estado estacionario como transitorio, indicando la existencia de un mecanismo concertado de transferencia de hidruro y protón. Recientemente, se ha establecido un mecanismo similar de transferencia de protón durante la oxidación de algunos aldehídos aromáticos cuyos sustituyentes actúan como aceptores de electrones, promoviendo la formación del *gem*-diol correspondiente de los sustratos (Ferreira *et al.*, 2010). Un mecanismo concertado ocurre en un único paso, pero no es indicativo de la sincronía o asincronía en la ruptura de los enlaces. En este trabajo se han estudiado ambas posibilidades y cualquier intento de encontrar una transferencia sincrónica de hidruro y protón resultó en barreras energéticas muy altas, mientras que un mecanismo asincrónico fue energéticamente más favorable. Este mecanismo concertado asincrónico se ha descrito previamente en otras oxidorreductasas (Newcomb *et al.*, 1995).

Tabla 2
Comparación de los KIE del sustrato, solvente y múltiple^a

	AAO ^b		CHO ^c
	Alcohol <i>p</i> -metoxibencílico	2,4-Hexadien-1-ol	Colina
^D <i>k</i> _{cat}	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1	7.3 ± 1.0
^D <i>k</i> _{red}	9.0 ± 0.8	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2
^{D₂O} <i>k</i> _{cat}	1.35 ± 0.06	1.25 ± 0.03	1.1 ± 0.1
^{D₂O} <i>k</i> _{red}	1.42 ± 0.10	1.33 ± 0.02	0.99 ± 0.02
^{D,D₂O} <i>k</i> _{cat}	7.0 ± 0.4	7.0 ± 0.2	7.3 ± 0.2
^{D,D₂O} <i>k</i> _{red}	13.5 ± 0.9	12.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2

Se muestran los valores de KIE de las constantes *k*_{cat} y *k*_{red} para la oxidación de los alcoholes *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol α -dideuterados por la AAO, y la oxidación de la colina 1,2-tetradeuterada por la CHO. El KIE del sustrato (^D*k*) es el ratio entre la actividad sobre el sustrato normal y deuterado; el KIE del solvente (^{D₂O}*k*) es el ratio entre la actividad en H₂O y en D₂O, y el KIE múltiple (^{D,D₂O}*k*) es el ratio entre la actividad sobre el sustrato normal en H₂O y el sustrato deuterado en D₂O. ^btomados de Ferreira et al. (2009) (Capítulo 3). ^ctomados de Fan y Gadda (2005).

4.3 Mecanismo catalítico en oxidorreductasas GMC: una comparación entre la CHO y la AAO

Durante los últimos años se ha investigado en detalle el mecanismo catalítico de la CHO como modelo de oxidorreductasa GMC (8). En la CHO la polaridad del centro activo cambia significativamente respecto a la AAO. El análisis de pK_a del Glu312 del centro activo de la CHO, reveló la existencia de una cadena lateral aniónica a pH fisiológico. Además, la mutación del Glu312 provocó una disminución en valor de la K_d de 500 veces (Quaye *et al.*, 2008). Por tanto, parece claro que este ácido glutámico está cargado negativamente e interaccionando con el grupo trimetilamonio de la colina.

Cuando se compararon los perfiles energéticos de la CHO obtenidos mediante QM/MM se obtuvo que la His466 actúa como base catalítica, y que por tanto en ambas enzimas (AAO y CHO) la histidina situada frente al anillo de flavina sería la base catalítica. El menor valor de pK_a del Glu312 de la CHO, comparado con el del Glu389 de la AAO, produce un incremento drástico tanto en la barrera energética como en las energías de los intermediarios, de forma que la His351 no podría actuar como base catalítica en la CHO. Aunque los estudios de Gadda y colaboradores (2005; 2008) no han determinado de forma definitiva la naturaleza de la base catalítica en la CHO, las mutaciones sobre la His466 fueron las que produjeron los mayores efectos sobre la k_{cat} . Recientemente, Gadda (2008) sugirió que una u otra histidina del centro activo de la CHO (His351 o His466) podría actuar como base catalítica (His351 sería la base cuando se mutaba la His466), y que alternativamente la acidificación del grupo hidroxilo del sustrato, con la consiguiente pérdida del protón hacia el solvente, podría ocurrir a través de la interacción con múltiples residuos del centro activo. Sin embargo, los perfiles de energía QM/MM acordes con un mecanismo catalítico secuencial y la existencia de un intermediario estable, sugieren que la His466 actuaría como base en la CHO. Además la caracterización de la variante H466A de la CHO, reveló que en esta variante la k_{cat} estaba drásticamente reducida, lo que provocó la aparición de un mecanismo concertado (Ghanem y Gadda, 2005; Gadda, 2008), que sería consistente con la situación en la que la His351 actuaría como base y donde las barreras energéticas de abstracción de protón y transferencia de hidruro serían similares.

Una de las principales diferencias entre la AAO y la CHO es la existencia de un intermediario estable de tipo alcóxido en el sustrato tras la transferencia inicial de protón en la CHO. Este intermediario es parcialmente resultado de la transferencia del protón desde la His466 a la His310. Este fenómeno podría ocurrir también en la AAO debido a la presencia de la His313. Sin embargo, nuestros cálculos indican que esta

segunda transferencia de protón no tiene lugar en la AAO, debido probablemente a que el microambiente de esta segunda histidina es significativamente diferente en ambas enzimas. En la CHO, la His310 está interaccionando con los grupos carbonilo de los residuos Val507 y Thr380, y su cadena lateral está formando una interacción de *stacking* con la cadena lateral de la His506. Así en la CHO, la transmisión del protón desde la His446 a la His310 se encuentra favorecida por la estabilización electrostática de los dos grupos carbonilo y la interacción catión- π con la His506. Por otro lado, la existencia de un intermediario estable en la transferencia de protón de la CHO se correlaciona con la observación mediante estudios cinéticos de un proceso secuencial en dos etapas, en oposición al mecanismo concertado en la AAO. Esta divergencia de mecanismos en ambas enzimas está relacionada con la ausencia de un efecto isotópico del solvente en condiciones de estado estacionario y transitorio durante la oxidación de la colina por la CHO (Gadda, 2003; Fan y Gadda, 2005) frente al efecto del solvente encontrado durante la oxidación de dos alcoholes por la AAO (Ferreira *et al.*, 2009) (**Tabla 2**). Por tanto, el mecanismo concertado asincrónico de la AAO, basado en los resultados de los KIE y los perfiles energéticos QM/MM, sería diferente al mecanismo secuencial propuesto como mecanismo general en la familia de oxidorreductasas GMC (Fan y Gadda, 2005; Gadda, 2008).

Se ha estudiado el mecanismo de difusión y oxidación de alcoholes en la AAO, empleando una aproximación experimental y computacional, y comparando los resultados con los obtenidos con la CHO. Se ha observado que el lugar de entrada del sustrato al centro activo está próximo al *loop* Gln395-Thr406, y que posteriormente el sustrato interacciona con la cadena lateral de la Phe397. Así mismo, se requiere una reorientación de las cadenas laterales de algunos residuos del centro activo para facilitar el *stacking* con la Tyr92. Los resultados de QM/MM y de mutagénesis dirigida de la AAO han mostrado que la His502 y la His546 están implicadas en la catálisis, y su sustitución produce un severo descenso en k_{cat} y k_{red} . Los perfiles energéticos teóricos, los predictores de protonación y los estudios de mutagénesis dan una respuesta robusta sobre la naturaleza de la base catalítica: la histidina situada frente al anillo de flavina (His502 en la AAO e His466 en la CHO) actuaría como base. Además, se ha observado que la transferencia de protón precede a la transferencia de hidruro, con los dos sustratos ensayados, aunque ambos procesos están altamente acoplados. En la AAO, los perfiles de energía QM/MM determinaron que no existe un intermediario estable a lo largo de la coordenada de reacción para la transferencia de protón e hidruro. Sin embargo, en la CHO, se ha encontrado un intermediario estable tras la abstracción del protón. La resolución de los análisis computacionales a nivel atómico ha permitido relacionar estas diferencias con cambios en el

centro activo de ambas enzimas. Finalmente, la combinación de estudios teóricos y de efectos isotópicos, sugiere un mecanismo concertado no sincrónico durante la oxidación de alcoholes por la AAO.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P.K., Billeter, S.R. y Hammes-Schiffer, S. (2002) Nuclear quantum effects and enzyme dynamics in dihydrofolate reductase catalysis. *J. Phys. Chem. B* 106: 3283-3293.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. y McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10037-10041.
- Borrelli, K., Cossins, B. y Guallar, V. (2010) Exploring hierarchical refinement techniques for induced fit docking with protein and ligand flexibility. *J. Comp. Chem.* 31: 1224-1235.
- Borrelli, K.W., Vitalis, A., Alcantara, R. y Guallar, V. (2005) PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. *J. Chem. Theory Comput* 1: 1304-1311.
- Dinadayalane, T.C. y Leszczynski, J. (2009) Geometries and stabilities of various configurations of benzene dimer: details of novel V-shaped structure revealed. *Struct. Chem.* 20: 11-20.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005) On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Aldehyde oxidation by *Pleurotus* aryl-alcohol oxidase involved in lignin biodegradation. *Proc. LignoBiotech-1 Symp.*, Reims, 29 March-1 April
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol

- oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Fishelovitch, D., Shaik, S., Wolfson, H.J. y Nussinov, R. (2009) Theoretical characterization of substrate access/exit channels in the human cytochrome P450 3A4 enzyme: Involvement of phenylalanine residues in the gating mechanism. *J. Phys. Chem. B* 113: 13018-13025.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.
- Friesner, R.A. y Guallar, V. (2005) Ab initio quantum chemical and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods for studying enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56: 389-427.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X.Y., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P.Y., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G., Dapprich, S., Daniels, A.T., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B.G., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C. y Pople, J.A. (2003) Gaussian 03, Revision A.1. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.
- Gadda, G. (2003) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.

- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Guallar, V., Harris, D.L., Batista, V.S. y Miller, W.H. (2002) Proton-transfer dynamics in the activation of cytochrome P450eryF. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 1430-1437.
- Guallar, V., Lu, C.Y., Borrelli, K., Egawa, T.Y. y Yeh, S.R. (2009) Ligand migration in the truncated hemoglobin-II from *Mycobacterium tuberculosis*: The role of G8 tryptophan. *J. Biol. Chem.* 284: 3106-3116.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Halgren, T. (2007) New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. *Chem. Biol. Drug Design* 69: 146-148.
- Jacobson, M.P., Pincus, D.L., Rapp, C.S., Day, T.J.F., Honig, B., Shaw, D.E. y Friesner, R.A. (2004) A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* 55: 351-367.
- Li, X., Jacobson, M.P., Zhu, K., Zhao, S. y Friesner, R.A. (2007) Assignment of polar states for protein amino acid residues using an interaction cluster decomposition algorithm and its application to high resolution protein structure modeling. *Proteins* 66: 824-837.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Menon, V., Hsieh, C.T. y Fitzpatrick, P.F. (1995) Substituted alcohols as mechanistic probes of alcohol oxidase. *Bioorg. Chem.* 23: 42-53.
- Meyer, E.A., Castellano, R.K. y Diederich, F. (2003) Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 1210-1250.
- Newcomb, M., Letadicbiadatti, F.H., Chestney, D.L., Roberts, E.S. y Hollenberg, P.F. (1995) A nonsynchronous concerted mechanism for cytochrome-P-450 catalyzed hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 12085-12091.
- Orville, A.M., Lountos, G.T., Finnegan, S., Gadda, G. y Prabhakar, R. (2009) Crystallographic, spectroscopic, and computational analysis of a flavin C4a-oxygen adduct in choline oxidase. *Biochemistry* 48: 720-728.

- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L. y Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26: 1781-1802.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. y Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.
- Roth, J.P. y Klinman, J.P. (2003) Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 62-67.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2008) On the role of histidine 351 in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 47: 6762-6769.
- Schrödinger Inc. (2007) QSite 4.5. Schrödinger, Inc., Portland, Oregon.
- Senn, H.M. y Thiel, W. (2007) QM/MM methods for biological systems. *Atomistic Approaches in Modern Biology: from Quantum Chemistry to Molecular Simulations* 268: 173-290.
- Su, Q. y Klinman, J.P. (1999) Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. *Biochemistry* 38: 8572-8581.
- Truong, T.N. y McCammon, J.A. (1991) Direct dynamics study of intramolecular proton-transfer in hydrogenoxalate anion. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7504-7508.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8: 52-56.

- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. y Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. Acta Crystallogr. D 55: 969-977.
- Xin, Y., Gadda, G. y Hamelberg, D. (2009) The cluster of hydrophobic residues controls the entrance to the active site of choline oxidase. Biochemistry 48: 9599-9605.

CAPÍTULO 4

Transferencia de hidruro estereoselectiva en la aril-alcohol oxidasa, un miembro de la superfamilia GMC*

Resumen. La oxidación de alcoholes primarios por la aril-alcohol oxidasa (AAO), una flavoenzima fúngica que produce el H₂O₂ necesario para la acción de las peroxidases ligninolíticas, incluye la transferencia concertada de un protón y un hidruro, tal y como indican los efectos isotópicos cinéticos del solvente y del sustrato observados. Además, tras estudiar el mecanismo de reacción empleando los enantiómeros (*R*) y (*S*) del alcohol *p*-metoxibencílico α -monodeuterado, se ha observado un efecto isotópico primario (~ 6) únicamente para la forma (*R*) revelando que la transferencia de hidruro es estereoselectiva. El acoplamiento (*docking*) molecular del alcohol *p*-metoxibencílico en el centro activo de la enzima, y los subsiguientes cálculos QM/MM, han mostrado que la estereoselectividad se debe a las posiciones relativas de los átomos que reciben el hidruro y el protón (el N5 de la flavina y el N ϵ de la His502, respectivamente) respecto a la posición de los sustituyentes del carbono- α (la orientación pro-*S* presenta una penalización de 6 kcal·mol⁻¹ con respecto a la orientación pro-*R*). El papel de la His502 es compatible con el descenso de la actividad de la variante H502A en tres órdenes de magnitud. A pesar de que la actividad de la AAO es menor sobre los alcoholes secundarios, también se puede observar una oxidación estereoselectiva con estos alcoholes (con un exceso enantiomérico del 98% para la forma (*R*) tras una incubación de la muestra racémica de 1-(*p*-metoxifenil)-etanol, tal y como se ha observado mediante HPLC quiral) y particularmente, empleando la variante F501A. Esta variante posee un centro activo de mayor tamaño que permite una mejor acomodación de los sustituyentes- α , lo que da lugar a una mayor estereoselectividad (relación *S/R*). Este estudio describe por primera vez la enantioselectividad en un miembro de la superfamilia GMC, y muestra la posibilidad de mejorar la AAO para una aplicación en la desracemización de mezclas de alcoholes quirales.

*Aitor Hernández-Ortega, Patricia Ferreira, Pedro Merino, Milagros Medina, Victor Guallar, y Angel T. Martínez. (2012) Stereospecific hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. ChemBioChem. 13: 427-435

1. INTRODUCCION

La aril-alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7) es una flavooxidasa secretada por algunos hongos de podredumbre blanca (como las especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera*) que está implicada en la degradación extracelular de la lignina produciendo el peróxido necesario para la acción de las peroxidasas ligninolíticas (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). La eliminación del polímero recalcitrante de lignina es un paso clave durante el reciclado del carbono en ecosistemas terrestres, y también es un aspecto esencial en la utilización a nivel industrial de la biomasa vegetal para la producción de sustancias químicas, materiales y combustibles (Ragauskas *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2009).

El poder reductor para la activación del O₂ a H₂O₂ proviene de los alcoholes aromáticos que son oxidados por la AAO a sus correspondientes aldehídos, siendo el alcohol *p*-metoxibencílico uno de los mejores sustratos reductores de la AAO de *Pleurotus eryngii* (Guillén *et al.*, 1992). Esta enzima puede oxidar también algunos aldehídos aromáticos a sus ácidos correspondientes a través de sus formas *gem*-diol (Ferreira *et al.*, 2010). Curiosamente, en este y otros hongos de podredumbre blanca, tiene lugar la producción continua de H₂O₂ a través del reciclado redox del *p*-metoxibenzaldehído (*p*-anisaldehído), el principal metabolito secretado por *Pleurotus*, en el que participan deshidrogenasas aromáticas asociadas a micelio junto a la AAO (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994).

Para ser un buen sustrato de la AAO, un alcohol debe tener un hidroxilo primario junto a un sistema de dobles enlaces conjugados, incluyendo alcoholes bencílicos, β-naftilmetílicos y alifáticos poliinsaturados (Ferreira *et al.*, 2005), que son capaces de establecer interacciones de *stacking* con una tirosina del centro activo (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Se ha investigado la oxidación de sustratos en otros miembros de la superfamilia de oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas), una amplia familia de flavoenzimas que incluye la glucosa oxidasa, la colina oxidasa y la colesterol oxidasa entre otras. El mecanismo de oxidación consenso implica la activación del sustrato por una base catalítica y la oxidación del alcóxido resultante a aldehído (y eventualmente a ácido en un segundo paso) por el N5 del cofactor FAD, que posteriormente es reoxidado por el O₂ (Gadda, 2008).

Se han descrito reacciones estereoespecíficas (o estereoselectivas) de oxidorreducción en oxidasas, dehidrogenasas y otras oxidorreductasas, que frecuentemente se asocian con la estructura del centro activo (van den Heuvel *et al.*, 1998; Holland y Weber, 2000; Knapp *et al.*, 2002; Gilabert *et al.*, 2004; Minasian *et al.*, 2004; Aguila *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010). Se están investigando activamente las transformaciones llevadas a cabo por microorganismos, y más recientemente por enzimas, para su aplicación en

una variedad de reacciones redox asimétricas de creciente interés industrial (Matsuda *et al.*, 2009). Estas transformaciones incluyen la síntesis de fármacos, ya que más de la mitad de estos compuestos contienen centros quirales (Carey *et al.*, 2006). Aunque las hidrolasas son las enzimas más utilizadas en la síntesis de compuestos quirales, las oxidorreductasas son también herramientas útiles para la producción de compuestos de interés industrial en transformaciones asimétricas (Matsuda *et al.*, 2009). Las oxidorreductasas estereoselectivas se pueden emplear tanto en la síntesis enantioselectiva como en la resolución de mezclas quirales.

En el presente trabajo, se sintetizaron los alcoholes *p*-metoxibencílicos α -monodeuterados – enantiomeros (*R*) y (*S*) – y α -dideuterado y se utilizaron como sustratos de la AAO. Para obtener información sobre el mecanismo de oxidación de los alcoholes primarios por la AAO, se estudiaron los efectos isotópicos cinéticos (KIE) del sustrato y del solvente, se llevaron a cabo ensayos de acoplamiento (*docking*) molecular del alcohol *p*-metoxibencílico en el centro activo de la enzima, y se realizaron cálculos QM/MM; desvelando que la abstracción de hidruro es estereoselectiva afectando únicamente a uno de los dos hidrógenos- α . Las conclusiones obtenidas pueden extenderse a la transformación de alcoholes aromáticos quirales, cuya oxidación estereoselectiva se incrementó mediante mutagénesis dirigida dando lugar a una variante de la AAO con un centro activo ampliado.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Compuestos químicos

Los alcoholes *p*-metoxibencílico, *p*-fluorobencílico, 1-(*p*-metoxifenil)-etanol (racémico), (*R*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol, (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol y los compuestos *p*-metoxibenzaldehído, *p*-fluoroacetofenona y metil-*p*-metoxibenzoato, junto con los agentes reductores deuterados empleados a continuación, fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

2.2 Síntesis de compuestos deuterados

Se preparó el alcohol dideuterado [α - $^2\text{H}_2$]-*p*-metoxibencílico mediante la reducción del *p*-metoxibenzoato de metilo con LiAl^2H_4 (Fetizon *et al.*, 1973). El alcohol (*R*)-[α - ^2H]-*p*-metoxibencílico se preparó a partir del *p*-metoxibenzaldehído (Walker y Curley, 2001), empleando (*S*)-alpino borano en la reducción enantioselectiva del aldehído deuterado intermedio. El enantiómero (*S*) se preparó de la misma manera pero empleando el (*R*)-alpino borano. Para confirmar los productos obtenidos se emplearon ^1H -NMR (400 MHz) y DEPT ^{13}C - (100 MHz), usando C^2HCl_3 como solvente.

2.3 Enzima nativa y variante

La AAO recombinante de *P. eryngii* fue obtenida mediante expresión heteróloga del cDNA que codifica para la proteína madura (GenBank™ AF064069) en la cepa W3110 de *Escherichia coli*. La proteína producida en forma insoluble, se replegó *in vitro* en presencia del cofactor, y purificó a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico según el protocolo descrito por Ruiz-Dueñas et al. (2006).

La variante F501A se preparó mediante PCR empleando el kit de mutagénesis dirigida *QuikChange* (Stratagene). Para las reacciones de PCR, se empleó como molde el cDNA de la AAO clonado en el vector pFLAG1. Los siguientes oligonucleótidos (mostrando únicamente la secuencia directa) portando la mutación (subrayada) en el triplete correspondiente (negrita) fueron usados como cebadores para obtener el cDNA mutado de la variante F501A: 5'-CAACGCCAACACGATT**GCCC** ACCCAGTTGGAACG-3'. Tras aislar el plásmido mutado, se confirmó la mutación introducida mediante secuenciación (Secuenciador GS-FLX Roche). Para la expresión y purificación de la variante F501A se utilizaron los mismos protocolos descritos anteriormente para la enzima nativa. Las concentraciones enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente empleando los coeficientes de extinción molar de la AAO nativa (ϵ_{463} 11050 M⁻¹·cm⁻¹) y la variante F501A (ϵ_{463} 10389 M⁻¹·cm⁻¹) determinados tras desnaturalización térmica.

2.4 Cinéticas de estado estacionario y transitorio

Las actividades enzimáticas en estado estacionario se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Sigma-Aldrich) a *p*-anisaldehído (ϵ_{285} 16950 M⁻¹·cm⁻¹) (Ferreira *et al.*, 2005). Las constantes cinéticas de estado estacionario se determinaron en cinéticas bisustrato variando las concentraciones de ambos sustratos (alcohol y oxígeno). Los ensayos se realizaron en cubetas selladas con un septo de silicona donde se equilibra la mezcla de reacción a la concentración de oxígeno deseada mediante burbujeo de la correspondiente mezcla comercial de O₂/N₂ durante 10-15 min. Las reacciones se inician mediante la inyección de la enzima, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los parámetros cinéticos se determinaron ajustando las velocidades iniciales (k_{obs}) obtenidas para las distintas concentraciones de alcohol ensayadas a las ecuaciones 1 o 2 (según la calidad del ajuste). Las ecuaciones 1 y 2 describen, respectivamente, un mecanismo ternario o ping-pong; donde e representa la concentración de enzima, k_{cat} es la constante catalítica, S es la concentración de alcohol, B es la concentración de O₂, $K_{m(Al)}$ y $K_{m(Ox)}$ son

las constantes de Michaelis para S y B , respectivamente, y K_d es la constante de disociación de S .

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}SB}{K_{m(Ox)}S + K_{m(Al)}B + SB + K_d K_{m(Ox)}} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}SB}{K_{m(Ox)}S + K_{m(Al)}B + SB} \quad \text{Ec. 2}$$

Las medidas de estado transitorio se llevaron a cabo empleando un equipo Applied Photophysics SX18.MV de mezcla rápida con flujo detenido. Los resultados de las medidas con los detectores de longitud de onda fija y fotodiodos (350-900 nm) se procesaron con los programas SX18.MV y Xscan, respectivamente. La semi-reacción de reducción para la AAO nativa se estudió en condiciones de anaerobiosis. La anaerobiosis en los tonómetros que contenían las soluciones de enzima y sustrato se realizó mediante ciclos sucesivos de vacío y argón antes de acoplarlos al equipo de flujo detenido. Las soluciones contenían además glucosa (10 mM) y glucosa oxidasa (10 U·mL⁻¹) para garantizar la anaerobiosis. La anaerobiosis del equipo de mezcla rápida con flujo detenido se realizó con una solución anaeróbica saturada en ditionito y posteriores lavados del sistema con el tampón anterior en anaerobiosis (Fraaije y van Berkel, 1997). Las medidas se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12°C (debido a la rápida reducción de la enzima). El estudio cinético de la evolución espectral durante la reducción de la enzima se realizó mediante análisis global empleando el programa *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd.). Las constantes observadas (k_{obs}) fueron obtenidas a partir del análisis cinético global de la evolución espectral durante la reacción empleando un ajuste a un modelo A→B. Los valores de k_{obs} para diferentes concentraciones de sustrato fueron ajustados a la ecuación 3, donde k_{red} y K_d son las constantes de reducción y disociación respectivamente.

$$k_{obs} = \frac{k_{red}S}{K_d + S} \quad \text{Ec. 3}$$

2.5 KIE para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico

Se determinaron las constantes de estado estacionario en cinéticas bisustrato empleando como sustrato la formas deuteradas del alcohol *p*-metoxibencílico (R , S y forma dideuterada) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los KIE del sustrato fueron calculados ajustado las constantes observadas a la ecuación 4, que describe un mecanismo con efectos isotópicos separados en la k_{cat} y la k_{cat}/K_m ; donde S es la concentración de

sustrato, F_i es la fracción atómica de deuterio en el sustrato (0.98 en este caso), y E_{k_{cat}/K_m} y $E_{k_{cat}}$ son los efectos isotópicos menos 1.

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat} S}{K_m (1 + F_i E_{k_{cat}/K_m}) + S (1 + F_i E_{k_{cat}})} \quad \text{Ec. 4}$$

Para determinar el efecto isotópico del solvente, los componentes de la reacción fueron disueltos en tampón fosfato 0.1 M deuterado, pD 6. La AAO se dializó exhaustivamente frente este tampón para eliminar los protones intercambiables, y las reacciones se llevaron a cabo tal y como se describió anteriormente. Simultáneamente, se determinó el posible efecto de la viscosidad durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico empleando una concentración de glicerol 30% (w/v) y se calculó el cociente entre las constantes cinéticas obtenidas en presencia y ausencia de glicerol. Además se determinó el KIE para los parámetros de estado transitorio. Los ensayos se realizaron tal y como se ha descrito previamente. El KIE de los parámetros k_{red} y K_d se calculó usando la ecuación 5, donde $E_{k_{red}}$ es el efecto isotópico de la k_{red} menos 1.

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{red} S}{K_d + S (1 + F_i E_{k_{red}})} \quad \text{Ec. 5}$$

2.6 Oxidación de alcoholes secundarios

Se estudió la oxidación del 1-(*p*-metoxifenil)-etanol por la AAO nativa y la variante F501A midiendo el H_2O_2 generado en un ensayo acoplado con peroxidasa de rábano (HRP, Roche) y AmplexRed (Invitrogen) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de AAO, y se determinó espectrofotométricamente la producción del producto resofurina ($\epsilon_{585} 52000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Igualmente se determinó la oxidación del (*R*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol y el (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol a *p*-fluoroacetofenona ($\epsilon_{247} 11616 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C, tras largas incubaciones (24 horas) debido a la baja actividad de la AAO sobre estos alcoholes. Para los análisis de HPLC quiral (abajo) se incubó una muestra con 20 mM de 1-(*p*-metoxifenil)-etanol (5-10 mg) racémico durante 24 h con AAO (20 μM), en tampón fosfato 50 mM, pH 6, a 25 °C. Posteriormente, se eliminó la enzima de la muestra mediante ultrafiltración y se liofilizó. Simultáneamente, se estimaron las actividades para ambos alcoholes secundarios relativas al alcohol *p*-metoxibencílico (en las mismas condiciones) por motivos comparativos.

2.7 HPLC quiral y rotación óptica

La enantioselectividad de la AAO para la oxidación del 1-(*p*-metoxifenil)-etanol se cuantificó mediante HPLC quiral (Waters Alliance). Tras eliminar las sales de la muestra, se utilizó una columna Chiracel IN (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Daicel Chemical Industries, Ltd.) eluyendo con *n*-hexano/2-propanol (98:2 v/v) a un flujo de 1 ml/min, monitorizando el pico a 225 nm con un detector de diodo. La rotación óptica se determinó con un polarímetro Jasco utilizando cloroformo como solvente.

2.8 Cálculos QM/MM

Los cálculos QM/MM se realizaron empleando el programa Qsite (Schrödinger Inc, 2010). Para la optimización de la geometría, se empleó el método DFT con el funcional M06 (Zhao y Truhlar, 2008), la resolución pseudo-espectral ultrafina y la función de base atómica 6-31G*. La región cuántica incluyó el sustrato y los residuos His502 e His46. La región clásica empleó un minimizador de gradiente conjugado (con un *rmsg* de 0.01) y el campo de fuerza OPLS-AA. Debido a la gran influencia de las cargas puntuales clásicas en la función de onda, el corte de interacciones que no forman enlace se fijó en más de 100 Å y se actualizó cada 10 pasos. Durante la optimización, se permitió el movimiento de todos los átomos dentro de una distancia de 20 Å del sustrato. La inspección del diedro C1-C α (manteniendo fijo el anillo aromático) se realizó a lo largo de una coordenada de reacción con 6 minimizaciones intermedias. La estructura inicial (*pro-R*) fue obtenida previamente mediante las simulaciones basadas en la migración y *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico con el programa *PELE* (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a), sobre la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) (Fernández *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS

3.1 Oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico α -deuterado por la AAO

Se sintetizaron alcoholes *p*-metoxibencílicos α -monodeuterados y α -dideuterados (usando agentes reductores deuterados) para confirmar que durante la oxidación de alcoholes primarios por la AAO tiene lugar una transferencia de hidruro desde el carbono- α , e investigar la posible estereoselectividad de la reacción. Los isómeros (*R*) y (*S*) monodeuterados, obtenidos con un exceso enantiomérico (*ee*) del 98%, mostraron idénticas propiedades físicas y espectroscópicas a excepción del signo de rotación óptica. En la **Figura 1** se muestran los espectros ¹H-NMR de los alcoholes mono y dideuterados.

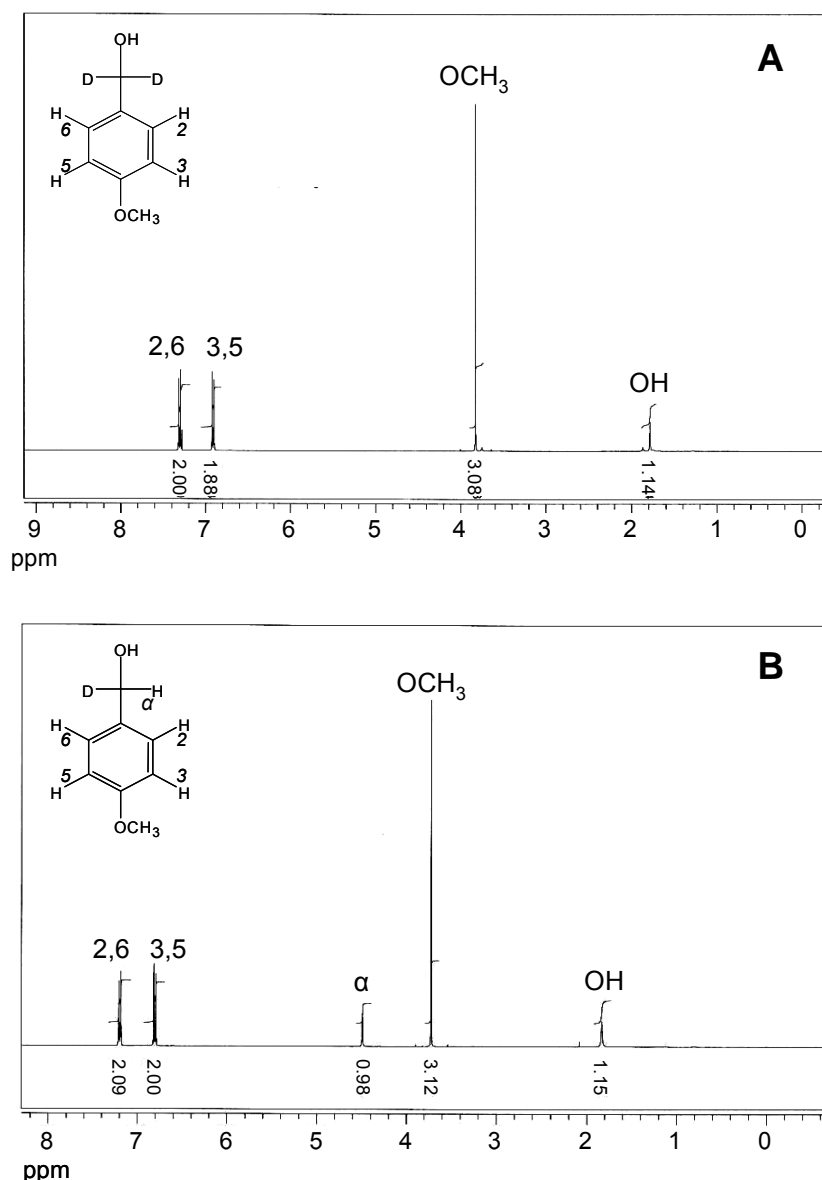


Figura 1. Espectros de $^1\text{H-NMR}$ del alcohol *p*-metoxibencílico α -dideuterado y α -monodeuterado. Se muestran los ocho protones del alcohol $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ -*p*-metoxibencílico (A) y los nueve protones del alcohol $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ -*p*-metoxibencílico (*R* o *S*) (B), incluyendo el proton- α con δ_{H} de 4.43 ppm ausente en el compuesto dideuterado, en espectros $^1\text{H-NMR}$ de 400 MHz adquiridos en C^2HCl_3 .

Los parámetros de estado estacionario para el alcohol *p*-metoxibencílico α -protiado y α -deuterado – formas (*R*)- $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$, (*S*)- $[\alpha\text{-}^2\text{H}]$ y $[\alpha\text{-}^2\text{H}_2]$ – fueron determinados variando simultáneamente las concentraciones de alcohol y O_2 (en cinéticas bisustrato) para obtener los valores máximos mediante extrapolación a condiciones saturantes. En la **Tabla 1** se muestran las constantes de Michaelis-Menten (K_m) y las eficiencias (k_{cat}/K_m) para el alcohol (Al) y el oxígeno (Ox) así como la constante catalítica (k_{cat}). Las constantes de reducción (k_{red}) y disociación (K_d) para el estado transitorio, mostradas en la **Tabla 1**, se determinaron en anaerobiosis utilizando un dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido.

Tabla 1

Constantes cinéticas de estado estacionario y transitorio para el alcohol (Al) y el O₂ (Ox) durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico α -deuterado y α -protiado (el último en tampón H₂O o ²H₂O) por la AAO^a

	Alcohol α -deuterado (en H ₂ O)			Alcohol α -protiado	
	(<i>R</i>)-[α - ² H]	(<i>S</i>)-[α - ² H]	[α - ² H ₂]	H ₂ O	² H ₂ O
<i>Estado estacionario:</i>					
k_{cat}	38 ± 1	144 ± 2	25 ± 1	196 ± 2	131 ± 1
$K_{\text{m(Al)}}$	34 ± 1	45 ± 1	25 ± 1	49 ± 1	38 ± 1
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$	1110 ± 17	3190 ± 101	1020 ± 16	3980 ± 113	2510 ± 103
$K_{\text{m(Ox)}}$	47 ± 1	134 ± 5	32 ± 1	159 ± 5	114 ± 4
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Ox)}}$	808 ± 18	1070 ± 38	785 ± 20	1236 ± 38	1150 ± 38
<i>Estado transitorio:</i>					
k_{red}	25 ± 1	77 ± 1	12 ± 1	139 ± 16	79 ± 2
K_{d}	36 ± 2	33 ± 1	23 ± 6	26 ± 6	23 ± 3

^a Las constantes cinéticas de estado estacionario – constante catalítica (k_{cat} , s⁻¹), constante de Michaelis-Menten (K_{m} , μM) y eficiencia ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ s⁻¹·mM⁻¹) – fueron estimadas mediante cinéticas bisustrato a 25 °C, empleando las Ec. 1 y 2. Las constantes de estado transitorio –incluyendo la constante de reducción (k_{red} , s⁻¹) y de disociación del alcohol (K_{d} , μM) – fueron estimadas a 12 °C, usando la Ec. 3. Se muestran los valores medios y el error standard.

Los valores de KIE para las constantes cinéticas aparentes de los tres alcoholes α -deuterados a cinco concentraciones diferentes de oxígeno (51, 128, 273, 560 y 1279 μM) se muestran en la **Tabla 2**. Los valores de ^D(^{app} k_{cat}) para los alcoholes (*R*)-[α -²H] y [α -²H₂]-*p*-metoxibencílico se incrementaron significativamente con la concentración de O₂, mientras que los valores de ^D($k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$) aunque significativos fueron similares a todas las concentraciones de oxígeno, y los valores de KIE para el alcohol (*S*)-[α -²H]-*p*-metoxibencílico fueron siempre próximos a la unidad (**Figura 2**). Por el contrario los valores de KIE de estado estacionario (**Tabla 3**) se calcularon como el cociente entre las constantes cinéticas (en cinéticas bisustrato) para el alcohol α -protiado y los diferentes alcoholes α -deuterados. Durante los ensayos de cinética rápida con flujo detenido se determinaron las constantes de reducción observadas frente a los diferentes alcoholes protiados y deuterados, y su dependencia de la concentración del sustrato (**Figura 3**). Los descensos más altos de velocidad, con respecto al alcohol *p*-metoxibencílico protiado, se obtuvieron para la forma (*R*) y dideuterada, pero también se observó un ligero descenso para el enantiómero (*S*). Con estos datos, se obtuvieron los KIE de las constantes cinéticas de reducción de la enzima (^D k_{red} y ^D K_{d}) (**Tabla 4**).

Tabla 2
KIE de las constantes cinéticas aparentes de estado estacionario para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico α -deuterado por la AAO a cinco concentraciones de O₂^a

	$D_{(app)k_{cat}}$	$D_{(app)K_m}$	$D_{(app)k_{cat}/K_m(Al)}$
0.051 mM O₂			
(<i>R</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	2.62 ± 0.02	0.73 ± 0.05	3.66 ± 0.10
(<i>S</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.21 ± 0.01	0.93 ± 0.09	1.27 ± 0.04
[α - ² H ₂]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.31 ± 0.02	0.77 ± 0.05	4.22 ± 0.12
0.128 mM O₂			
(<i>R</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.27 ± 0.02	0.87 ± 0.05	3.89 ± 0.08
(<i>S</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.26 ± 0.02	1.03 ± 0.08	1.21 ± 0.06
[α - ² H ₂]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.57 ± 0.03	1.11 ± 0.07	4.05 ± 0.11
0.273 mM O₂			
(<i>R</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.93 ± 0.04	1.03 ± 0.06	3.78 ± 0.12
(<i>S</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.29 ± 0.02	1.00 ± 0.08	1.28 ± 0.06
[α - ² H ₂]- <i>p</i> -metoxibencílico	5.68 ± 0.04	1.38 ± 0.08	4.08 ± 0.12
0.566 mM O₂			
(<i>R</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.56 ± 0.4	1.25 ± 0.06	3.67 ± 0.12
(<i>S</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.37 ± 0.02	1.12 ± 0.08	1.23 ± 0.06
[α - ² H ₂]- <i>p</i> -metoxibencílico	6.68 ± 0.04	1.68 ± 0.08	3.99 ± 0.10
1.279 mM O₂			
(<i>R</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	5.03 ± 0.04	1.32 ± 0.08	3.83 ± 0.10
(<i>S</i>)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.34 ± 0.02	1.03 ± 0.07	1.31 ± 0.05
[α - ² H ₂]- <i>p</i> -metoxibencílico	7.55 ± 0.06	1.85 ± 0.12	4.10 ± 0.12

^a Las constantes cinéticas aparentes de estado estacionario para el alcohol se determinaron a cinco concentraciones diferentes de O₂ en tampón 0.1 M, pH 6, a 25°C. Los valores de KIE de sustrato (^D*k*) se calcularon como el cociente entre la actividad sobre el alcohol protiado y deuterado empleando la Ec. 4. Se muestran los valores medios y el error standard.

Tabla 3
Valores de KIE del sustrato (alcohol *p*-metoxibencílico) y del solvente para las constantes cinéticas de estado estacionario de la AAO^a

	$D_{k_{cat}}$	$D_{K_m(Al)}$	$D_{k_{cat}/K_m(Al)}$	$D_{K_m(Ox)}$	$D_{k_{cat}/K_m(Ox)}$
(<i>R</i>)-[α - ² H]	5.2 ± 0.1	1.4 ± 0	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
(<i>S</i>)-[α - ² H]	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1
[α - ² H ₂]	7.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	5.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1
² H ₂ O	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1

^a Los valores de KIE se calcularon como los cocientes entre las actividades máximas (determinadas en cinéticas bisustrato) sobre los alcoholes α -protiado/ α -deuterado, y en tampón H₂O/²H₂O, respectivamente. Se muestran los valores medios y de desviación standard.

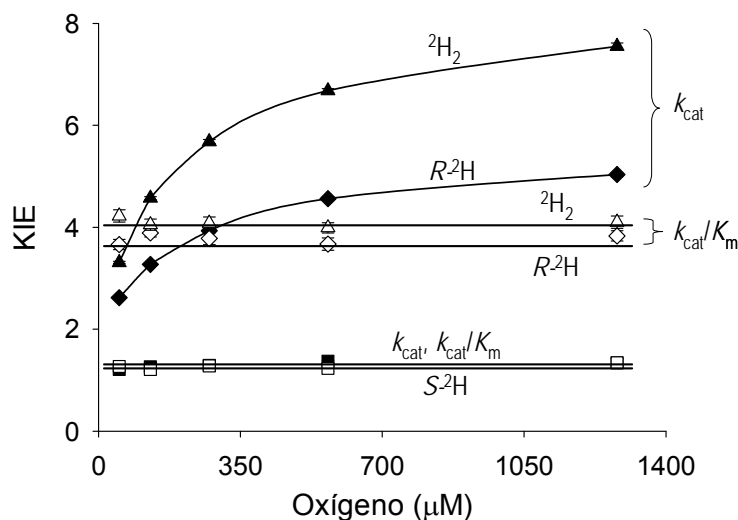


Figura 2. **Influencia de la concentración de O_2 en el KIE de los parámetros de estado estacionario.** Se estimó el KIE de las constantes cinéticas aparentes (k_{cat} y k_{cat}/K_m) durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico α -monodeuterado ($R\text{-}^2\text{H}$ y $S\text{-}^2\text{H}$) y α -dideuterado ($^2\text{H}_2$) por la AAO, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25°C, ajustando los datos a la Ec. 4.

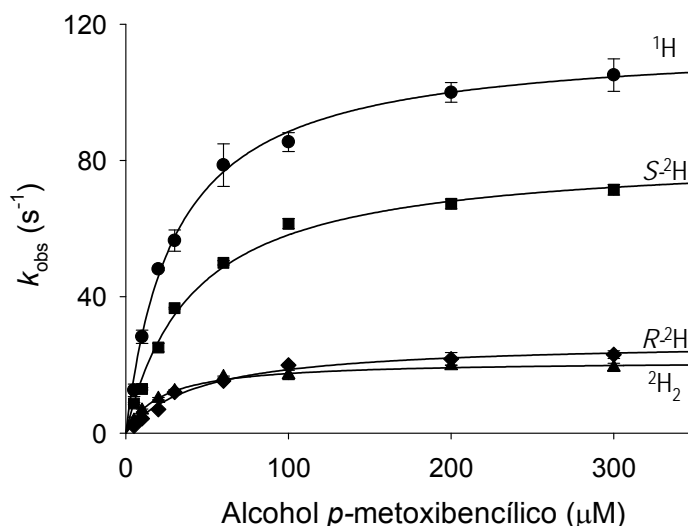


Figura 3. **Dependencia de las constantes de reducción observadas en estado transitorio respecto a la concentración de diferentes alcoholes deuterados.** Empleando un dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido, se estimaron las constantes de reducción observadas a diferentes concentraciones de alcohol *p*-metoxibencílico α -protiado (^1H), α -monodeuterados ($R\text{-}^2\text{H}$ y $S\text{-}^2\text{H}$) y α -dideuterado ($^2\text{H}_2$), en tampón fosfato 0.1 M, pH, 6, a 12°C en anaerobiosis. Los datos experimentales se ajustaron a la Ec. 3.

Tabla 4

Valores de KIE de sustrato (alcohol *p*-metoxibencílico) y solvente para las constantes de estado transitorio ^a

	^D <i>k</i> _{red}	^D <i>K</i> _d
(<i>R</i>)-[α- ² H]	6.5 ± 0.1	1.5 ± 0.4
(<i>S</i>)-[α- ² H]	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.3
[α- ² H ₂]	9.3 ± 0.1	1.1 ± 0.4
² H ₂ O	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3

^a Los valores de KIE de estado transitorio fueron calculados mediante el ajuste de los datos a la Ec 5. Se muestran los valores medios y el error standard.

Se observó un valor de KIE significativo para las constantes catalítica (*k*_{cat}) y de reducción (*k*_{red}) del alcohol (*R*)-[α-²H]-*p*-metoxibencílico, próximo al obtenido para el alcohol [α-²H₂]-*p*-metoxibencílico dideuterado, mientras que el KIE para el alcohol (*S*)-[α-²H]-*p*-metoxibencílico fue mucho menor. Los valores de KIE para la eficiencia catalítica (^D(*k*_{cat}/*K*_{m(Al)})) fueron inferiores a los valores de ^D*k*_{cat} indicando que la unión del sustrato está ligeramente afectada por la sustitución isotópica, en relación con los (bajos) valores de KIE observados para la *K*_d. Los valores de KIE primarios indican que la ruptura del enlace (*R*)-Cα-¹H/²H del alcohol está limitando la tasa de reducción de la flavina y, por tanto, la catálisis. Además muestran que el hidrógeno en posición pro-*R* (es decir, el hidrógeno cuya sustitución da lugar al enantiómero (*R*)) es el que está implicado en la reacción de transferencia de hidruro a la flavina.

El pequeño pero consistente valor de KIE determinado para las *k*_{cat} y *k*_{red} del alcohol (*S*)-[α-²H]-*p*-metoxibencílico, junto al KIE encontrado para el alcohol [α-²H₂]-*p*-metoxibencílico dideuterado, mayor que el encontrado para el alcohol (*R*)-[α-²H]-*p*-metoxibencílico, indican que también existe un ligero KIE secundario. El KIE múltiple, derivado de los KIE primario y secundario, se observa claramente en condiciones de estado transitorio, donde el valor de ^D*k*_{red} para el alcohol [α-²H₂]-*p*-metoxibencílico fue próximo al producto de los valores de ^D*k*_{red} para los enantiómeros (*R*) y (*S*) del alcohol. Este KIE secundario reveló que el átomo en posición (*S*)-Cα (¹H o ²H), aunque no se transfiere a la flavina, influye en la transferencia ¹H/²H desde la posición (*R*)-Cα-¹H/²H.

3.2 KIE del solvente durante la oxidación del alcohol por la AAO

Se estudió la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO empleando un tampón deuterado para confirmar la existencia de etapas cinéticas limitantes que implican la participación de protones intercambiables con el solvente (incluyendo el protón del grupo hidroxilo del alcohol), junto con la transferencia de hidruro descrita anteriormente.

En la **Tabla 3** se muestran los valores máximos de KIE para las reacciones en estado estacionario en tampón deuterado, que se estimaron como el cociente entre las constantes obtenidas en H₂O y ²H₂O (en cinéticas bisustrato). En la **Tabla 4** se muestran los valores de KIE del solvente en estado transitorio, determinado a partir de las constantes de reducción de la enzima en presencia del tampón deuterado.

Aunque los valores de KIE del solvente son cuantitativamente menores a los del sustrato, se observó un KIE significativo para la k_{cat} y la k_{red} , y un valor similar para la eficiencia frente al alcohol, mientras que el KIE de la K_{d} fue próximo a uno. Este efecto del solvente se confirmó a partir del KIE múltiple (^{D,D₂O} k_{red} 1.5 ± 0.9 , determinado como el cociente entre los valores de k_{red} en presencia de alcohol α -protiado en H₂O y alcohol α -dideuterado en ²H₂O), cuyo valor fue similar al producto de los valores de KIE del sustrato y del solvente para la k_{red} . Aunque no se estimaron los valores de KIE múltiple en cinéticas bisustrato, éste se puede observar a partir de las constantes cinéticas aparentes determinadas a concentración atmosférica de O₂, cuyos ^D(^{app} k_{cat}) (7.0 ± 0.4) y ^D(^{app} $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$) (6.1 ± 0.6) fueron iguales o mayores al producto del KIE del sustrato y del solvente de la ^{app} k_{cat} (5.4 ± 0.1 y 1.3 ± 0.1 , respectivamente) y la ^{app} $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$ (3.7 ± 0.3 y 1.2 ± 0.1 , respectivamente).

Debido a que el ²H₂O produce un incremento de la viscosidad del solvente (pudiendo ralentizar las etapas de reacción que dependen de la difusión), se evaluó la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico en presencia de glicerol al 30% (v/v), concentración que permite obtener una viscosidad del solvente similar a la obtenida en presencia de ²H₂O. No se encontró un efecto significativo en los parámetros cinéticos, k_{cat} (0.99 ± 0.01), $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$ (1.03 ± 0.04) y $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Ox)}}$ (1.01 ± 0.04), confirmando que el KIE del solvente previamente observado, se debe a un efecto de los protones intercambiables del solvente y no a un incremento de la viscosidad.

3.3 Cálculos QM/MM y *stacking* molecular del alcohol en el centro activo

La estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) muestra que el centro activo está aislado del solvente y su conexión con el mismo está bloqueada por las cadenas laterales de los residuos Tyr92, Phe397 y Phe501. En un estudio reciente (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a), se empleó el programa *PELE* para dilucidar el acceso del alcohol *p*-metoxibencílico al centro activo de la AAO. Para ello, se situó la molécula del alcohol sobre la superficie de la proteína, y el programa migró el ligando aproximándolo al residuo catalítico His502. En la **Figura 4A** se puede observar la posición final del alcohol, donde las distancias entre el

hidrógeno de su grupo hidroxilo y el N ϵ de la His502, y el hidrógeno de su carbono- α y el N5 de la flavina, son similares (~ 2.5 Å). El N δ de la His546 está protonado y próximo al grupo hidroxilo, y además se produce una interacción de *stacking* entre el anillo del alcohol *p*-metoxibencílico y el anillo aromático de la cadena lateral de la Tyr92.

Para estudiar la preferencia en la abstracción del hidruro desde la posición pro-*R* (Figura 4A y B), se realizó un análisis de energía QM/MM durante la rotación del plano C1-C α -OH, respecto al del anillo aromático, hasta alcanzar la posición en que sería el protón pro-*S* el implicado en la transferencia (Figura 4B). El análisis de energía está basado en optimizaciones geométricas con restricciones en los valores de los ángulos del diedro. En la región cuántica se incluyeron los átomos implicados en la formación de los enlaces de hidrógeno, es decir, el sustrato y los residuos His502 e His546. Se obtuvo una penalización de 6 kcal·mol⁻¹ para la orientación pro-*S* (respecto a la pro-*R*), con una barrera energética de rotación de 10 kcal·mol⁻¹. Además, en este último caso (oxidación pro-*S*), el aumento de la distancia entre el grupo hidroxilo y las cadenas laterales de la His502 e His546, daría lugar a la formación de un nuevo enlace de hidrógeno, impidiendo la contribución de estos residuos en la catálisis (Figura 4B).

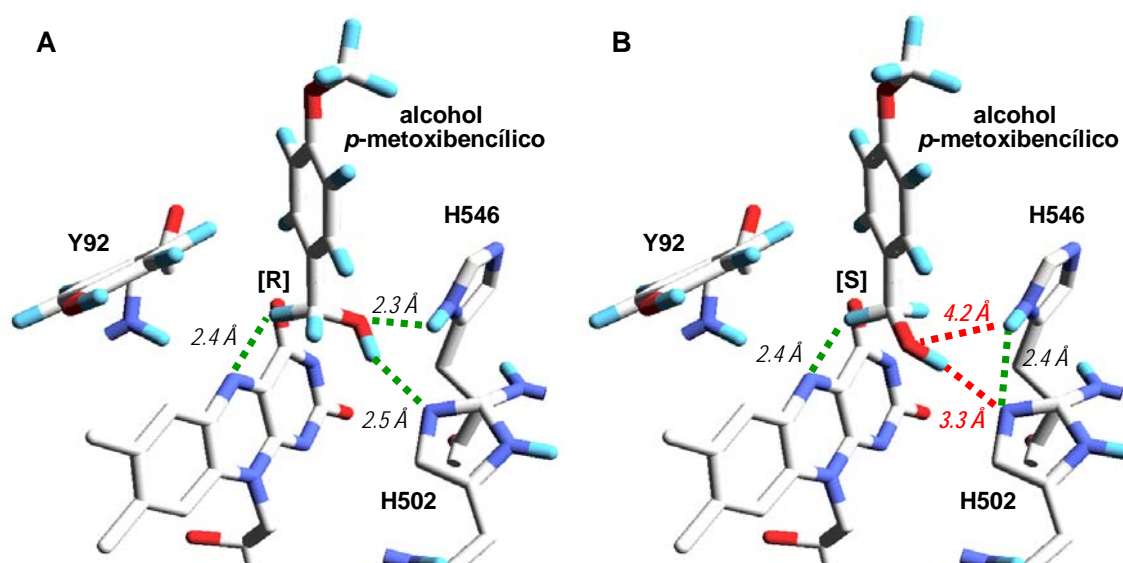


Figura 4. Acoplamiento molecular del alcohol *p*-metoxibencílico en el centro activo de la AAO (vista lateral de la flavina). Tras la migración con *PELE*, el hidrógeno pro-*R* y el hidrógeno del grupo hidroxilo del sustrato se situaron a una distancia de transferencia del N5 de la flavina y el N ϵ de la His502, respectivamente (líneas discontinuas en verde), y el N δ protonado de la His546 forma un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo (línea discontinua verde) (A). Sin embargo, cuando se simula una transferencia de hidruro desde la posición pro-*S* (B), el grupo hidroxilo queda muy lejos (línea discontinua roja) de los residuos His502 e His546 (y se forma un nuevo enlace de hidrógeno entre ambas histidinas). Basado en la estructura cristalográfica de la AAO, PDB 3FIM.

3.4 Oxidación de alcoholes aromáticos secundarios

La **Figura 5A** muestra la unión del alcohol *p*-metoxibencílico tras *docking* molecular en el centro activo de la AAO, desde el lado-*si* de la flavina (incluyendo también los residuos Phe501, His502 e His546). Aunque la cadena lateral de la Phe501 está orientada hacia la posición bencílica, el alcohol *p*-metoxibencílico puede ocupar fácilmente una posición catalítica en el centro activo (con el grupo hidroxilo y el hidrógeno pro-*R* del carbono- α a distancia de transferencia respecto al N5 de la flavina y el N ϵ de la His502, respectivamente). Sin embargo, si se sustituye el hidrógeno pro-*S* del sustrato por un metilo, como en el 1-(*p*-metoxifenil)-etanol, y se fuerza el sustrato a adoptar una posición compatible con la catálisis se producen impedimentos estéricos (flecha roja en **Figura 5B**).

Las predicciones anteriores se confirmaron experimentalmente. Durante la oxidación del 1-(*p*-metoxifenil)-etanol por la AAO (estimada como producción de H₂O₂) se observó una eficiencia aparente de sólo $3.59 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ (comparada con $4070 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ para el alcohol *p*-metoxibencílico) y un valor de ${}^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ de 0.179 s^{-1} (comparada con 120 s^{-1} para el alcohol *p*-metoxibencílico).

Cuando se compara la actividad de la AAO nativa sobre los alcoholes secundarios con la obtenida para la variante F501A, referidas a la actividad sobre el alcohol *p*-metoxibencílico (**Tabla 5**), se observa que la variante F501A (en la que se ha eliminado la cadena lateral de la Phe501 que impedía la acomodación de alcoholes secundarios) posee una mayor actividad sobre el 1-(*p*-metoxifenil)-etanol (60 veces) y el (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol (19 veces) respecto a la enzima nativa.

Tabla 5

Oxidación relativa de los alcoholes secundarios 1-(*p*-metoxifenil)-etanol y (*R*) y (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol por la AAO y la variante F501A, respecto a su actividad sobre el alcohol *p*-metoxibencílico ($\times 10^{-6}$) y relación de estereoselectividad^a

	AAO nativa	variante F501A
1-(<i>p</i> -Metoxifenil)-etanol (racémico)	53	3130
(<i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Fluorofenil)-etanol	0.043	0.263
(<i>S</i>)-1-(<i>p</i> -Fluorofenil)-etanol	0.914	17.37
Estereoselectividad (relación <i>S/R</i>)	21	66

^a Se siguió la oxidación de alcoholes secundarios a las correspondientes cetonas tras incubaciones prolongadas en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25°C y concentración atmosférica de O₂ (ver **Figura 6**), y los valores de k_{obs} se refirieron a los valores obtenidos durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO nativa ($120 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) y la variante F501A ($3.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) bajo las mismas condiciones.

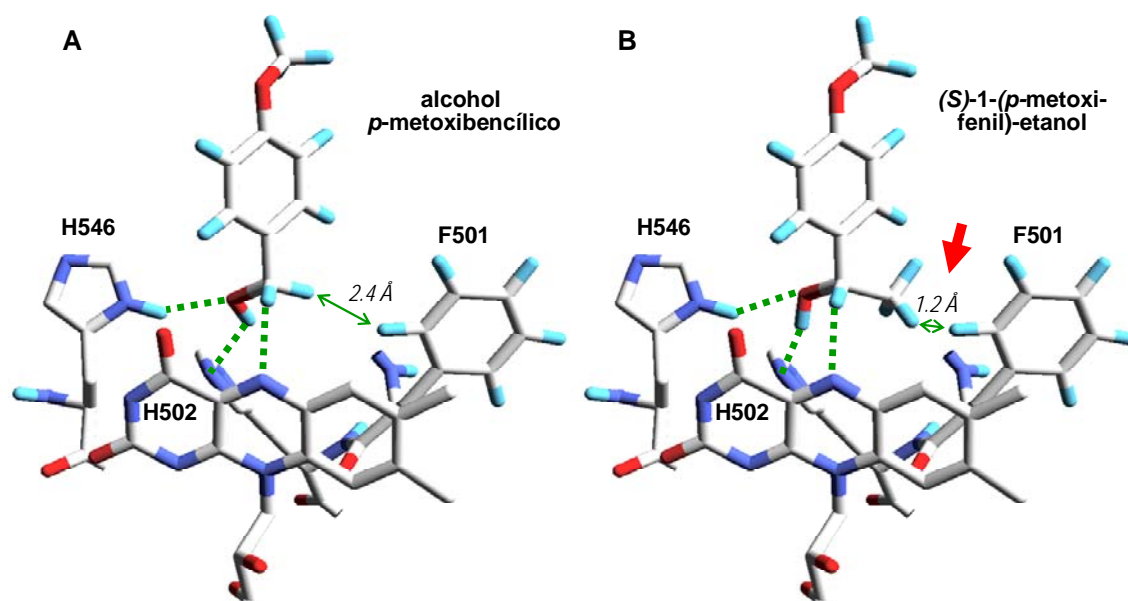


Figura 5. Acoplamiento molecular de alcoholes aromáticos primarios y secundarios en el centro activo de la AAO (vista desde el lado-*si* de la flavina). A diferencia de lo observado para el alcohol *p*-metoxibencílico (A), cuando se posiciona el (*S*)-1-(*p*-metoxifenil)-etanol (B) en la misma posición catalítica, se producen impedimentos estéricos que impiden la acomodación del grupo α -metilo debido a la colisión (flecha roja) con la cadena lateral de la Phe501 (B). Basado en la estructura cristalográfica, PDB 3FIM.

Curiosamente, durante la lenta oxidación del 1-(*p*-fluorofenil)-etanol por la AAO nativa y especialmente por la variante F501A (del orden de $0.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) se observó una preferencia neta por el enantiómero (*S*) (Figura 6A y C), tal y como revela la formación de la correspondiente cetona (*p*-fluoroacetofenona), en el espectro diferencial (Figura 6B y D).

La estereoselectividad de la reacción con el 1-(*p*-metoxifenil)-etanol racémico se confirmó mediante HPLC quiral, que mostró un único pico mayoritario tras el tratamiento con AAO (Figura 7) con un ee >98%. Se determinó la configuración absoluta del enantiómero remanente tras la oxidación midiendo su rotación óptica. Se obtuvo un valor positivo que se corresponde con el enantiómero (*R*) (Yim y Wills, 2005; Barros *et al.*, 2009), confirmando que la enzima oxida el isómero (*S*) de forma selectiva. Esta oxidación estereoselectiva implica una abstracción del hidrógeno en posición pro-*R*, similar a la descrita previamente para los alcoholes primarios.

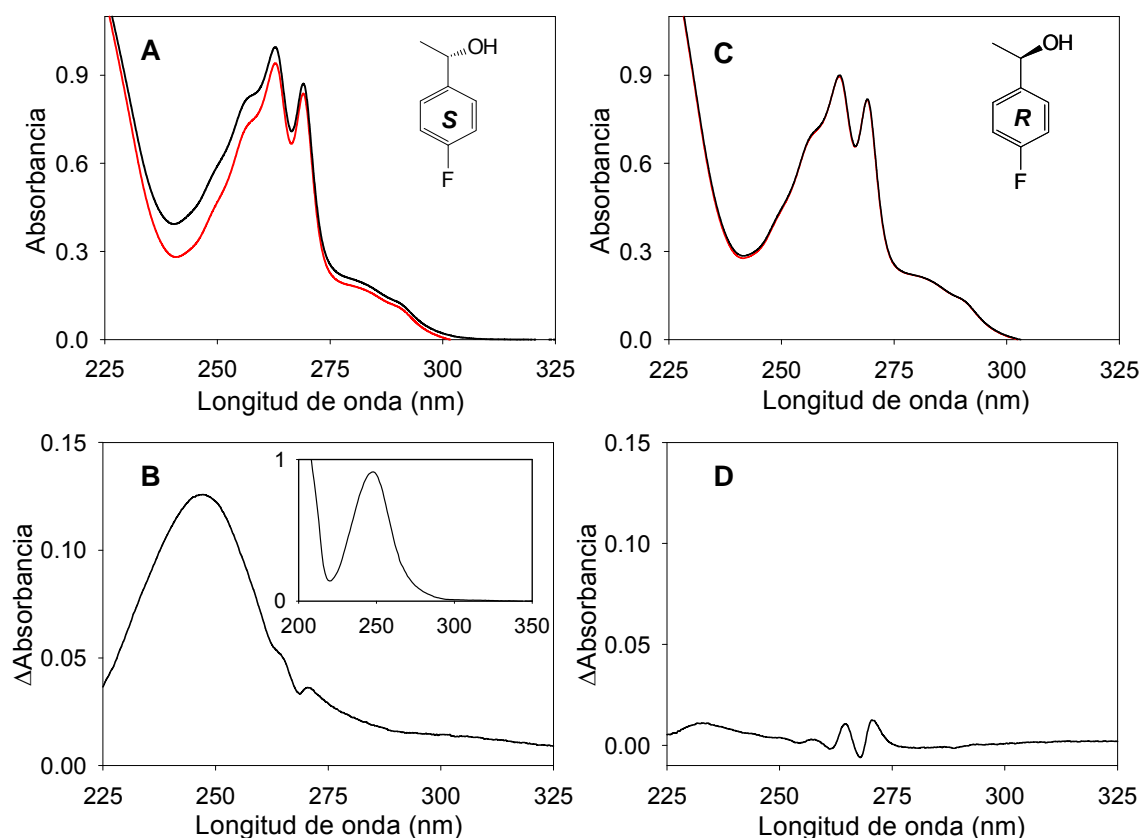


Figura 6. **Incubación de los enantiómeros (*S*) y (*R*) de un alcohol secundario con la variante F501A.** (arriba) Espectros de absorción inicial (rojo) y final (negro) obtenidos tras incubar durante 20 h los alcoholes (*S*)-(*p*-fluorofenil)-etanol (A) y (*R*)-(*p*-fluorofenil)-etanol (C) (ambos 1 mM) con la variante F501A, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25°C. (abajo) Espectros diferenciales mostrando el máximo de la *p*-fluoroacetofenona obtenido únicamente para el enantiómero (*S*) (B). También se muestra el espectro de absorción de la *p*-fluoroacetofenona comercial (inserto).

Cabe destacar que la preferencia de la AAO por el (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol se incrementó 3 veces tras sustituir la voluminosa cadena lateral de la Phe501 por alanina, en la variante F501A, mostrando un factor de estereoselectividad *S/R* de 66:1 para este alcohol secundario (Tabla 5). Esto es consistente con una mayor oxidación relativa de los alcoholes 1-(*p*-metoxifenil)-etanol y (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol por la variante F501A (comparada con la AAO nativa), relacionada con una mejor acomodación de los alcoholes secundarios en esta variante.

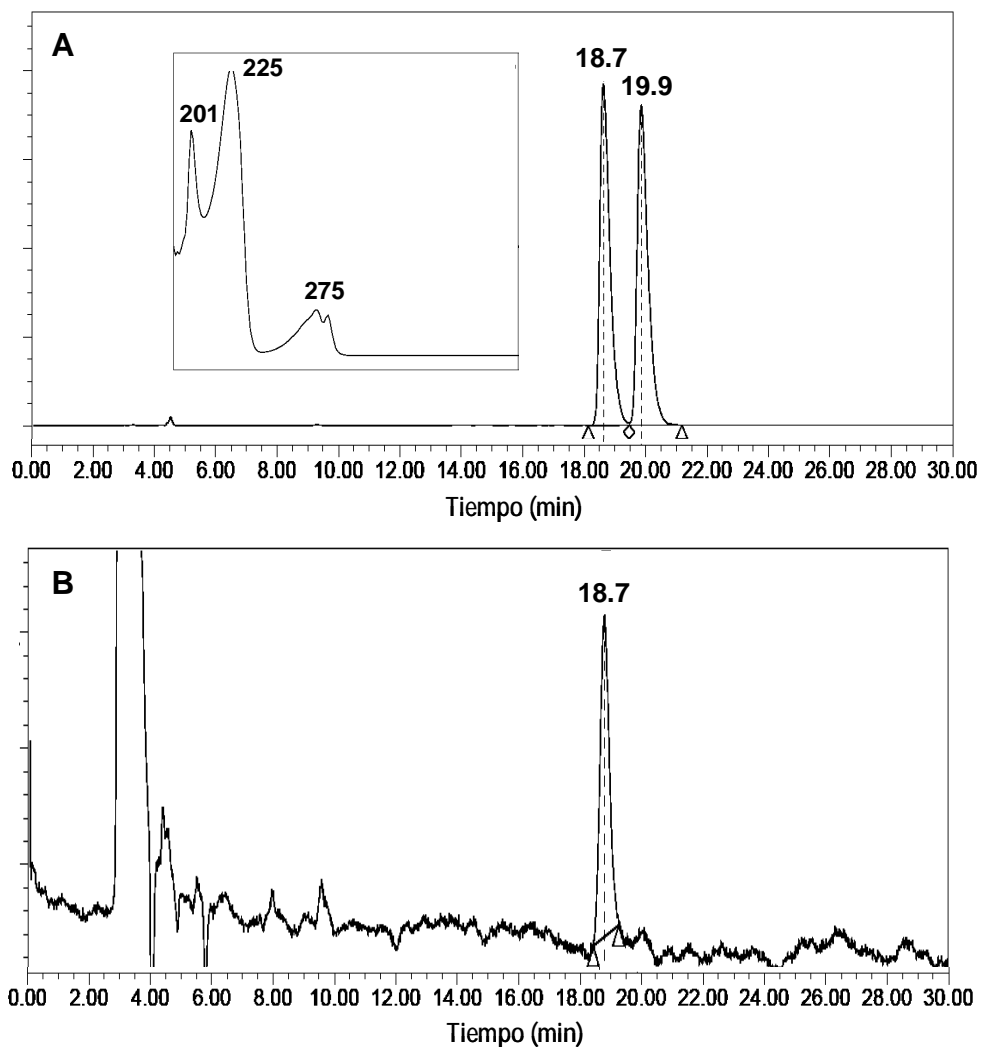


Figura 7. **HPLC quiral de la desracemización del 1-(*p*-metoxifenil)-etanol por la AAO.** (A) Cromatograma control de la muestra racémica mostrando los picos correspondientes a los enantiómeros (*S*) y (*R*). (B) Cromatograma tras el tratamiento con AAO revelando un alto ee (>98%) para el enantiómero (*R*) (identificado por su rotación óptica) debido a la desracemización enzimática. Los análisis se llevaron a cabo con una columna Chiralcel IB y los picos fueron monitorizados a 225 nm. En el inserto se muestra el espectro de absorción de los picos correspondientes al 1-(*p*-metoxifenil)-etanol.

4. DISCUSIÓN

4.1 Mecanismo de oxidación por la AAO, un miembro de la superfamilia GMC

El elevado KIE primario del sustrato, obtenido durante las reacciones en estado transitorio y estacionario (bisustrato) de la AAO con alcohol metoxibencílico α -deuterado (con $^Dk_{\text{cat}}$ y $^Dk_{\text{red}}$ 8-9), indica que esta flavooxidasa abstrae uno de los hidrógenos del carbono- α (junto a dos electrones) durante la oxidación del sustrato. La transferencia de hidruro, al N5 de la flavina, es actualmente el mecanismo consenso en la superfamilia de oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008), y los valores de KIE del sustrato, mostrados en este trabajo, son del mismo orden a los descritos para la colina oxida, la GMC modelo (Gadda, 2003; Fan y Gadda, 2005a). El KIE para la eficiencia aparente fue independiente de la concentración de oxígeno, sugiriendo un proceso irreversible de transferencia de hidruro, contrariamente a lo descrito para la colina oxidasa donde los valores $^D(^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_m)$ se incrementan con la concentración de oxígeno (Fan y Gadda, 2005b).

Por otra parte, el pequeño pero consistente KIE del solvente (~ 1.5) encontrado en las reacciones de estado transitorio y estacionario con la AAO, indicó que la transferencia de hidruro desde el sustrato al N5 de la flavina es un proceso concertado con la transferencia de un protón intercambiable del solvente. En los estudios cinéticos previos, realizados en estado estacionario a concentraciones atmosféricas de oxígeno, se determinaron valores similares de KIE del sustrato y del solvente (Ferreira *et al.*, 2009). El KIE múltiple observado para la AAO (obtenido comparando las reacciones de alcohol α -protiado en H_2O y del alcohol α -dideuterado en $^2\text{H}_2\text{O}$, bajo condiciones de estado estacionario y transitorio), cuyo valor fue similar al producto de los valores del KIE del sustrato y del solvente, confirmó el efecto isotópico del solvente en las reacciones de oxidación catalizadas por la AAO. El fuerte descenso de las k_{cat} y k_{red} en la variante H502A (2890 y 1830 veces, respectivamente) (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a), junto a la posición de la His502 en el centro activo, confirmó que la His502 actúa como base catalítica, siendo responsable de la activación del sustrato mediante la abstracción del protón del grupo hidroxilo, de acuerdo con el KIE del solvente previamente observado. También se ha descrito un mecanismo concertado en la oxidación de algunos aldehídos aromáticos por la AAO, a través de sus formas *gem*-diol (Ferreira *et al.*, 2010).

En este aspecto, la AAO difiere de la colina oxidasa (Fan y Gadda, 2005a) y otras oxidorreductasas GMC relacionadas, donde se ha propuesto una transferencia no-concertada (secuencial) de hidruro y protón (lo que da

lugar a un intermediario alcóxido) como mecanismo general (Gadda, 2008). Recientemente, se ha descrito en la piranosa-2 oxidasa un mecanismo no-concertado de transferencia a la flavina y a la His548 (homóloga a la His502 de la AAO) (Sucharitakul *et al.*, 2010; Wongnate *et al.*, 2011). Cálculos QM/MM mostraron que la transferencia de protón precede a la transferencia de hidruro en la oxidación de alcoholes por la AAO, sin que tenga lugar la formación de un intermediario estable, siendo por tanto consideradas como transferencias concertadas no-sincrónicas (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Sin embargo, la AAO no es una excepción entre las flavoenzimas ya que por ejemplo se ha descrito un mecanismo de transferencia de hidruro concertado en la D-amino ácido oxidasa, el paradigma de las flavoenzimas (Pollegioni *et al.*, 1997). Además, en la colina oxidasa y otras flavoproteínas con propiedades catalíticas similares (como la flavocitocromo b_2), tras la mutación de los residuos que participan en la abstracción del protón del grupo hidroxilo, se observó un cambio desde un mecanismo secuencial a concertado (Sobrado y Fitzpatrick, 2003; Ghanem y Gadda, 2005; Rungsruriyachai y Gadda, 2010), con valores de KIE del solvente y múltiple similares a los encontrados para la AAO. Finalmente, se ha descrito un pequeño pero significativo KIE del solvente para la lenta oxidación de los alcoholes bencílico y *p*-metoxibencílico por la galactosa oxidasa (Whittaker *et al.*, 1998; Minasian *et al.*, 2004), cuya estereoselectividad se discute más adelante.

4.2 Estereoselectividad sobre alcoholes arílicos primarios (y secundarios)

Cuando se emplearon los dos enantiómeros mono-deuterados del alcohol *p*-metoxibencílico, (*S*)-[α - ^2H] y (*R*)-[α - ^2H], como sustratos de la AAO, se observó un KIE primario de ~ 6 para el enantiómero (*R*) en condiciones de estado estacionario y transitorio. Esto reveló por primera vez que la transferencia de hidruro en los alcoholes arílicos primarios, que son los sustratos naturales de la AAO, se produce selectivamente desde la posición pro-*R*. También se ha descrito una oxidación estereoselectiva o estereoespecífica de sustratos en otras oxidasas, como la galactosa oxidasa (Minasian *et al.*, 2004), y otras flavoenzimas como la D-aminoácido oxidasa (Mattevi *et al.*, 1996) y la vainillil-alcohol oxidasa (van den Heuvel *et al.*, 1998). Además, la glucosa oxidasa es selectiva ya que únicamente oxida la forma β -anomérica de la D-glucosa (Keilin y Hartree, 1952; Leskovac *et al.*, 2005). Sin embargo, esta es la primera vez en la que se ha descrito la oxidación estereoselectiva de un alcohol primario (con sólo uno de los dos hidrógenos- α implicado en la abstracción de hidruro) en un miembro de la superfamilia de oxidorreductasas GMC.

Además del KIE primario descrito antes, se observa un KIE secundario en las reacciones de la AAO, que indica un efecto túnel para la transferencia del átomo de hidrógeno, tal y como se ha descrito para la tirosina hidroxilasa (Frantom *et al.*, 2002). Durante los últimos años, se han descrito efectos túnel para la transferencia de hidruro en muchas otras oxidorreductasas (Pu *et al.*, 2006; Nagel y Klinman, 2009), incluyendo flavoproteínas relacionadas como la colina oxidasa (Fan y Gadda, 2005a; Sutcliffe *et al.*, 2006; Lans *et al.*, 2010). Los KIE secundarios son frecuentemente una consecuencia del cambio en el estado de hibridación del donador al pasar de los reactivos al estado de transición. Los KIE múltiples obtenidos sugieren que la rehibridación está ocurriendo en el mismo estado de transición que la transferencia de hidruro.

La estereoselectividad de la AAO en la abstracción de hidruro desde la posición pro-*R* del carbono- α de los alcoholes aromáticos primarios (no quirales), revelada mediante el marcaje con deuterio, se mantuvo cuando se utilizaron alcoholes aromáticos secundarios (quirales) como sustratos, a pesar de la baja actividad de la enzima sobre ellos. Esto se observó en primer lugar, por el hecho de que la oxidación del (*S*)-1-(*p*-fluorofenil)-etanol fue 20 veces más rápida que la del enantiómero (*R*), indicando una abstracción de hidruro desde la posición (*R*). La estereoselectividad se confirmó posteriormente por la eliminación selectiva del enantiómero (*S*) del 1-(*p*-metoxifenil)-etanol, dando un ee > 98% para el enantiómero (*R*) remanente (tal y como se determinó mediante HPLC quiral). Por tanto, la AAO podría ser empleada en la desracemización de mezclas quirales de alcoholes arílicos secundarios para la obtención de enantiómeros puros. Estos compuestos incluyen productos de interés industrial cuya desracemización microbiológica se ha considerado anteriormente (Allan y Carnell, 2001). El empleo de la AAO para desracemizaciones enzimáticas no requiere la introducción de estereoselectividad, sino extender su actividad a los alcoholes secundarios, como se discute más adelante.

En la galactosa oxidasa estereoselectiva, capaz de oxidar alcoholes bencílicos aunque con menor eficiencia catalítica ($0.36 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) que el 1-*O*-metil- α -D-galactopiranosido ($29.50 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) (Minasian *et al.*, 2004), se ha llevado a cabo la evolución dirigida de una variante mejorada (Sun *et al.*, 2001) para extender su actividad a los alcoholes arílicos secundarios (Escalettes y Turner, 2008). La única mutación introducida durante el proceso de evolución (una sustitución K330M) produjo un aumento de la hidrofobicidad del centro activo que podría mejorar la unión del 1-feniletanol. En la AAO, el *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico sobre la estructura cristalográfica (Fernández *et al.*, 2009) muestra, por un lado, que la posición bencílica se encuentra en la parte inferior de la cavidad del centro activo (con los hidrógenos del grupo hidroxilo y el de la posición pro-*R* orientados tal y como se ha descrito anteriormente) y por

otro lado, que el resto de la cavidad está ocupada por el anillo aromático del alcohol. Por tanto, para acomodar un alcohol secundario, la parte inferior del centro activo debe ser ensanchada. Para concluir el presente estudio, se empleó la variante F501A, donde la voluminosa cadena lateral de la Phe501 (localizado frente al hidrógeno pro-*S*) ha sido eliminada. Esta variante posee una eficiencia reducida oxidando alcoholes primarios, tal y como se ha mostrado recientemente (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b) (**Capítulo 7**), pero su actividad relativa sobre alcoholes secundarios ha aumentado respecto a la enzima nativa. Más importante, cuando se estudió la oxidación de los enantiómeros (*R*) y (*S*) del 1-(*p*-fluorofenil)-etanol, la estereoselectividad había mejorado notablemente con respecto a la AAO nativa.

4.3 Bases estructurales de la catálisis y la estereoselectividad en la AAO

Empleando como punto de partida la estructura cristalográfica de la AAO (Fernández *et al.*, 2009), el programa *PELE* migró satisfactoriamente el alcohol *p*-metoxibencílico hasta el centro activo de la AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a), donde el sustrato adoptó una posición catalítica. Curiosamente, en esta posición el hidrógeno- α pro-*R* está a 2.4 Å del N5 de la flavina, una distancia que permite la transferencia de hidruro de acuerdo con el KIE del sustrato obtenido. Simultáneamente, el hidrógeno del hidroxilo está a 2.5 Å del N ϵ de la His502 permitiendo su contribución como base catalítica, aceptando el protón para la activación del alcohol. Además se forma un enlace de hidrógeno con el sustrato desde la His546, un residuo importante durante la catálisis cuya eliminación produjo una disminución (de 40 veces) tanto en la actividad como en la afinidad por el alcohol (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a).

Por el contrario, cuando se intentó posicionar el alcohol *p*-metoxibencílico con el hidrógeno- α pro-*S* en la posición que permitiría la transferencia de hidruro al N5 de la flavina, el resultado fue energéticamente desfavorable, tal y como revelaron los cálculos de QM/MM. La estructura pro-*S* presentó una reorganización de los enlaces de hidrógeno. El grupo hidroxilo queda demasiado lejos de ambas His502 e His546 para formar enlaces de hidrógeno y permitir una catálisis eficiente. Como resultado, se forma un nuevo enlace de hidrógeno entre ambas histidinas. Consecuentemente, el KIE para ambos enantiómeros α -monodeuterados del alcohol *p*-metoxibencílico y la pequeña pero estereoselectiva actividad de la AAO sobre alcoholes secundarios quirales, se correlacionan con la posición predicha para el alcohol en el centro activo.

Postulamos que la estereoselectividad de la AAO está relacionada con la arquitectura del centro activo y el mecanismo de reacción, establecido tras los estudios de KIE que implican la transferencia concertada del protón del grupo hidroxilo (a la His502) y del hidruro desde el carbono- α (al N5 de la flavina), en contraste con el mecanismo secuencial (no-concertado) propuesto como mecanismo consenso en la familia de oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008). Cuando las dos reacciones de transferencia son secuenciales, la posición del hidrógeno del carbono- α del intermediario alcóxido, formado en la primera etapa, puede experimentar algunos cambios conformacionales antes de su abstracción en la segunda etapa. Sin embargo, en la transferencia concertada catalizada por la AAO, una vez que el sustrato se sitúa en el centro activo con el grupo hidroxilo orientado hacia la His502, tal y como se ha visto mediante *docking* con *PELE*, únicamente el hidrógeno pro-*R* está orientado hacia el N5 de la flavina, resultando en una abstracción estereoselectiva.

Empleando enantiómeros deuterados del sustrato natural de la AAO se ha encontrado, por primera vez, una transferencia estereoselectiva en un miembro de la familia de oxidorreductasas GMC. El significativo KIE observado previamente para el sustrato α -dideuterado es indicativo de un mecanismo de oxidación mediante transferencia de hidruro. Además, los resultados experimentales indican, en correlación con los análisis teóricos, que la activación del sustrato por la base catalítica es un proceso concertado con la transferencia de hidruro, en lugar de un proceso secuencial como se ha descrito para la colina oxidasa, y sugerido como mecanismo general en las oxidorreductasas GMC. El modelado de la geometría del centro activo reveló el mecanismo de la estereoselectividad a nivel atómico, incluyendo enlaces de hidrógeno con la His502 y la His546. La modelización de la posición catalíticamente relevante del sustrato también indicó el potencial de la variante F501A para la oxidación de alcoholes secundarios. La variante fue producida y ensayada, mostrando una estereoselectividad mejorada en la oxidación de los derivados del 1-feniletanol. Estos resultados proporcionan información relevante sobre el mecanismo catalítico en las oxidorreductasas GMC, y al mismo tiempo muestran la posibilidad de emplear la AAO, o sus variantes mejoradas, como biocatalizadores industriales en la producción de alcoholes aromáticos quirales de interés industrial en los sectores químico y farmacéutico.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguila, S., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Rivera, M., Pecchi, G. y Alderete, J.B. (2008) Stereoselective oxidation of R-(+)-limonene by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Green Chem.* 10: 647-653.
- Allan, G.R. y Carnell, A.J. (2001) Microbial deracemization of 1-aryl and 1-heteroaryl secondary alcohols. *J. Org. Chem.* 66: 6495-6497.
- Barros, B.A., de Oliveira, M.D.F., Lemos, T.L.G., de Mattos, M.C., de Gonzalo, G., Gotor-Fernández, V. y Gotor, V. (2009) *Lentinus strigellus*: a new versatile stereoselective biocatalyst for the bioreduction of prochiral ketones. *Tetrahedron-Asymmetry* 20: 1057-1061.
- Carey, J.S., Laffan, D., Thomson, C. y Williams, M.T. (2006) Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org. Biomol. Chem.* 4: 2337-2347.
- Escalettes, F. y Turner, N.J. (2008) Directed evolution of galactose oxidase: Generation of enantioselective secondary alcohol oxidases. *ChemBioChem* 9: 857-860.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005a) On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005b) Oxygen- and temperature-dependent kinetic isotope effects in choline oxidase: correlating reversible hydride transfer with environmentally enhanced tunneling. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 17954-17961.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol

- oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Fetizon, M., Henry, Y., Moreau, N., Moreau, G., Golfier, M. y Prange, T. (1973) Preparation of deuterated or tritiated aldehydes on carbonyl. *Tetrahedron* 29: 1011-1014.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.
- Frantom, P.A., Pongdee, R., Sulikowski, G.A. y Fitzpatrick, P.F. (2002) Intrinsic deuterium isotope effects on benzylic hydroxylation by tyrosine hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 4202-4203.
- Gadda, G. (2003) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Gilabert, M.A., Fenoll, L.G., Garcia-Molina, F., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2004) Stereospecificity of horseradish peroxidase. *Biol. Chem.* 385: 1177-1184.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209: 603-611.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011a) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.

- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2011b) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-41114.
- Holland, H.L. y Weber, H.K. (2000) Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 547-553.
- Keilin, D. y Hartree, E.F. (1952) Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem. J.* 50: 331-341.
- Knapp, M.J., Rickert, K. y Klinman, J.P. (2002) Temperature dependent isotope effects in soybean lipoxygenase-1: Correlating hydrogen tunneling with protein dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 3865-3874.
- Lans, I., Peregrina, J.R., Medina, M., Garcia-Viloca, M., Gonzalez-Lafont, A. y Lluch, J.M. (2010) Mechanism of the hydride transfer between *Anabaena* Tyr303Ser FNR(rd)/FNR(ox) and NADP(+)/H. A combined pre-steady-state kinetic/ensemble-averaged transition-state theory with multidimensional tunneling study. *J. Phys. Chem. B* 114: 3368-3379.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J. y Pericin, D. (2005) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 731-750.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Matsuda, T., Yamanaka, R. y Nakamura, K. (2009) Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron-Asymmetry* 20: 513-557.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. y Curti, B. (1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome *b2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7496-7501.
- Minasian, S.G., Whittaker, M.M. y Whittaker, J.W. (2004) Stereoselective hydrogen abstraction by galactose oxidase. *Biochemistry* 43: 13683-13693.
- Nagel, Z.D. y Klinman, J.P. (2009) A 21(st) century revisionist's view at a turning point in enzymology. *Nat. Chem. Biol.* 5: 543-550.
- Pollegioni, L., Blodig, W. y Ghisla, S. (1997) On the mechanism of D-amino acid oxidase. Structure/linear free energy correlations and deuterium

- kinetic isotope effects using substituted phenylglycines. *J. Biol. Chem.* 272: 4924-4934.
- Pu, J., Gao, J. y Truhlar, D.G. (2006) Multidimensional tunneling, recrossing, and the transmission coefficient for enzymatic reactions. *Chem. Rev.* 106: 3140-3169.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. y Tschaplinski, T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2010) Role of asparagine 510 in the relative timing of substrate bond cleavages in the reaction catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 49: 2483-2490.
- Schrödinger Inc. (2010) QSite 5.6. LCC, New York.
- Sobrado, P. y Fitzpatrick, P.F. (2003) Solvent and primary deuterium isotope effects show that lactate CH and OH bond cleavages are concerted in Y254F flavocytochrome *b*₂, consistent with a hydride transfer mechanism. *Biochemistry* 42: 15208-15214.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T. y Chaiyen, P. (2010) Kinetic isotope effects on the noncovalent flavin mutant protein of pyranose 2-oxidase reveal insights into the flavin reduction mechanism. *Biochemistry* 49: 3753-3765.
- Sun, L.H., Petrounia, I.P., Yagasaki, M., Bandara, G. y Arnold, F.H. (2001) Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. *Protein Eng.* 14: 699-704.
- Sutcliffe, M.J., Masgrau, L., Roujeinikova, A., Johannissen, L.O., Hothi, P., Basran, J., Ranaghan, K.E., Mulholland, A.J., Leys, D. y Scrutton, N.S. (2006) Hydrogen tunnelling in enzyme-catalysed H-transfer. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 361: 1375-1386.
- van den Heuvel, R.H.H., Fraaije, M.W., Laane, C. y van Berkel, W.J.H. (1998) Regio- and stereospecific conversion of 4-alkylphenols by the covalent flavoprotein vanillyl-alcohol oxidase. *J. Bacteriol.* 180: 5646-5651.

- Walker, J.R. y Curley, R.W. (2001) Improved synthesis of (*R*)-glycine-*d*-15N. *Tetrahedron* 57: 6695-6701.
- Whittaker, M.M., Ballou, D.P. y Whittaker, J.W. (1998) Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase. *Biochemistry* 37: 8436
- Wongnate, T., Sucharitakul, J. y Chaiyen, P. (2011) Identification of a catalytic base for sugar oxidation in the pyranose-2 oxidation reaction. *ChemBioChem Online* DOI: 10.1002/cbc.201100564
- Yim, A.S.Y. y Wills, M. (2005) Asymmetric transfer hydrogenation using amino acid derivatives; further studies and a mechanistic proposal. *Tetrahedron* 61: 7994-8004.
- Yuan, B., Page, A., Worrall, C.P., Escalettes, F., Willies, S.C., McDouall, J.J.W., Turner, N.J. y Clayden, J. (2010) Biocatalytic desymmetrization of an atropisomer with both an enantioselective oxidase and ketoreductases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49: 7010-7013.
- Zhao, Y. y Truhlar, D.G. (2008) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* 120: 215-241.

CAPÍTULO 5

Caracterización cinética y química de la oxidación de aldehídos por la aril-alcohol oxidasa fúngica*

Resumen. La aril-alcohol oxidasa (AAO) fúngica genera el H_2O_2 necesario para la biodegradación de la lignina. La AAO cataliza reacciones de oxidación de alcoholes bencílicos a sus correspondientes aldehídos. Sin embargo, la formación de un mayor número de moléculas de H_2O_2 respecto a las de aldehído, durante la oxidación de algunos de los alcoholes anteriores, implica una actividad aril-aldehído oxidasa en esta enzima. En este trabajo se ha caracterizado esta actividad empleando diferentes aldehídos bencílicos, analizándose los productos de las reacciones enzimáticas mediante GC-MS. Las constantes de estado estacionario y transitorio junto a los resultados cromatográficos, revelaron que la presencia en el sustrato de sustituyentes donadores o aceptores de electrones tiene una gran influencia sobre su oxidación; encontrándose la mayor actividad frente al *p*-nitrobenzaldehído y aldehídos halogenados, y la menor actividad frente a aldehídos metoxilados. Además, esta actividad aldehído oxidasa se ha podido correlacionar con la tasa de hidratación de los aldehídos, estimada mediante $^1\text{H-NMR}$. Estos resultados junto a la ausencia en el centro activo de un residuo capaz de llevar a cabo la oxidación de los aldehídos a través de un tiohemiacetal, sugirieron que las reacciones de oxidación se producen mayoritariamente tras la hidratación de los aldehídos a su forma *gem*-diol. El mecanismo de reacción (con un efecto isotópico del solvente $^{D_{20}}k_{\text{red}}$ de ~ 1.5) sería análogo al descrito para los alcoholes, donde la semi-reacción de reducción implica la transferencia de hidruro desde el carbono- α concertada con la abstracción del protón de uno de los grupos hidroxilo de la forma *gem*-diol por una base catalítica. La existencia de dos etapas con requerimiento de polaridad opuesto (hidratación y transferencia de hidruro) explicaría algunos aspectos de la oxidación de los aldehídos por la AAO. Mediante mutagénesis dirigida se identificaron dos residuos de histidina, His502 e His546, directamente implicados en la oxidación de la forma *gem*-diol del aldehído e, inesperadamente, se identificó un residuo en el centro activo, Tyr92, que podría facilitar la oxidación de algunos aldehídos con bajas o nulas tasas de hidratación. Esta doble actividad de la AAO podría facilitar un mecanismo más efectivo de generación del H_2O_2 necesario durante la degradación de la lignina.

*Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.

1. INTRODUCCIÓN

La eliminación de la lignina es un proceso central en el reciclado del carbono fijado mediante fotosíntesis en los ecosistemas terrestres. La lignina protege a los polisacáridos de la planta frente al ataque de los microorganismos, y por otro lado su eliminación, representa un aspecto central en la utilización industrial de la biomasa lignocelulósica para la producción de materias renovables, reactivos químicos y combustibles en las futuras biorefinerías de lignocelulosa (Martínez *et al.*, 2009a). Las peroxidases de alto potencial redox son características de basidiomicetos ligninolíticos (denominados hongos de la podredumbre blanca por el color de la madera deslignificada) como se ha confirmado recientemente mediante la comparación de genomas de hongos (Martínez *et al.*, 2004; 2009b). El análisis de los genomas de hongos de podredumbre blanca actualmente disponibles, incluyendo los de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, confirmó la presencia de genes codificantes de diferentes tipos de oxidasas que son las responsables de la generación del H₂O₂ extracelular requerido durante la biodegradación de la lignina como sustrato de las peroxidases. Estas oxidasas son, entre otras, la glioxal oxidasa (EC 1.2.3.5) descrita por primera vez en *P. chrysosporium*, y la AAO (aril-alcohol oxidasa; EC 1.1.3.7) mayoritariamente investigada en especies del género *Pleurotus* (Cullen y Kersten, 2004; Martínez *et al.*, 2005).

Los basidiomicetos producen una variedad de metabolitos aromáticos extracelulares que desempeñan diferentes funciones durante la biodegradación de la lignina (de Jong *et al.*, 1994a) y son además interesantes para la industria de los aromatizantes y productos químicos, como en el caso de los aldehídos aromáticos (Gallois *et al.*, 1990). El alcohol veratrílico es sintetizado por *P. chrysosporium*, donde actúa como mediador redox de la lignina peroxidasa, mientras que la peroxidasa versátil de *Pleurotus* no lo requiere como mediador (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). Sin embargo, en las especies de *Pleurotus*, el principal metabolito extracelular es el *p*-anisaldehído, junto con los correspondientes alcohol y ácido, y algunos metabolitos clorados (como el 3-cloro-*p*-anisaldehído), mientras que el alcohol veratrílico se encuentra solo en bajos niveles (Gutiérrez *et al.*, 1994). Se ha visto que estos compuestos experimentan ciclos redox, con la participación de la AAO y deshidrogenasas miceliarias, generando de manera continua, y a expensas del poder reductor intracelular, el H₂O₂ extracelular requerido para la degradación de la lignina (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994).

La AAO es una flavoproteína extracelular miembro de la familia de oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas). Esta enzima cataliza la deshidrogenación oxidativa de una variedad de alcoholes

aromáticos (y algunos alifáticos poliinsaturados) con un hidroxilo primario en el carbono- α , con la reducción concomitante del O_2 a H_2O_2 (**Figura 1A**). Además de su característica actividad alcohol oxidasa, se había descrito cierta capacidad de la AAO para oxidar aldehídos aromáticos (Guillén *et al.*, 1992; Varela *et al.*, 2000). La obtención del gen de la AAO de *Pleurotus eryngii* (Varela *et al.*, 1999) permitió su expresión heteróloga en *Emericella nidulans* (estado conidial: *Aspergillus nidulans*) (Varela *et al.*, 2001) y más recientemente en *Escherichia coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006). La mejora en los niveles de producción ha hecho posible la caracterización detallada del mecanismo de oxidación de alcoholes por esta enzima (Ferreira *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado en detalle la oxidación de los aldehídos por la AAO.

En este trabajo se describen los estudios realizados para la caracterización del mecanismo de oxidación de aldehídos por esta enzima. Para ello se han realizado estudios cinéticos de estado estacionario y transitorio con la enzima nativa y algunas de sus variantes mutadas. Para una mejor comprensión del mecanismo de reacción, los estudios cinéticos fueron completados con análisis de GC-MS y NMR de los sustratos y los productos de la reacción.

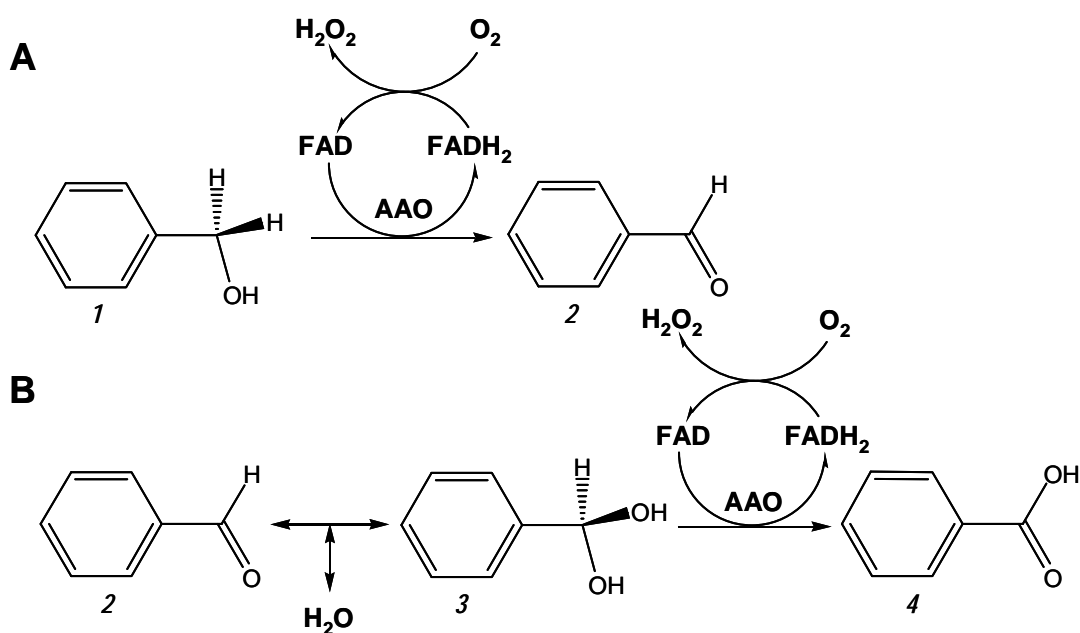


Figura 1. Esquema de las reacciones catalizadas por la AAO. (A) Durante la semi-reacción de reducción, la AAO oxida alcoholes aromáticos (1) a los correspondientes aldehídos (2) (Guillén y Evans, 1994; Ferreira *et al.*, 2009). (B) Sin embargo, se ha observado que también es capaz de oxidar aldehídos aromáticos (2) a sus correspondientes ácidos (4). En esta segunda reacción, tras la hidratación de los aldehídos, tiene lugar la oxidación de la correspondiente forma gem-diol (3). En ambas reacciones, se produce peróxido de hidrógeno durante la reoxidación del cofactor de FAD (semi-reacción de oxidación).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y enzimas comerciales

Los siguientes alcoholes, aldehídos y ácidos, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich: alcoholes *p*-metoxibencílico, veratrílico, *m*- y *p*-clorobenzílico, 3-cloro-*p*-metoxibencílico *m*- y *p*-fluorobenzílico, 2,4-hexadien-1-ol, benzaldehído, *p*-anisaldehído, veratraldehído, *m*- y *p*-clorobenzaldehído, 3,4-difluorobenzaldehído, *p*-nitrobenzaldehído, 2,4-dinitrobenzaldehído, 2,4-hexadienal, y ácidos benzoico, *p*-anisico, verátrico, *m*-clorobenzoico, 3-cloro-*p*-anisico y *m*- y *p*-nitrobenzoico.

Las enzimas glucosa oxidasa (de *Aspergillus niger*, tipo II) y la aldehído deshidrogenasa (de *Saccharomyces cerevisiae*) fueron también adquiridas a Sigma-Aldrich. El Amplex[®] Red es de Invitrogen. La HRP (peroxidasa de rábano) fue adquirida a Roche. La 5-deazariboflavina fue un regalo del Dr. G. Tollin (Universidad de Arizona, Tucson, AZ, USA.).

2.2 Producción de la AAO

La AAO de *P. eryngii* recombinante fue obtenida mediante la expresión en *E. coli* del cDNA de la AAO madura (GenBank[®] AF064069) seguido de la activación *in vitro* y purificación (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006). La concentración de enzima utilizada fue calculada usando el coeficiente de extinción molar de la AAO previamente calculado ($\epsilon_{463} = 11050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006). Las variantes de la AAO H502S, H546S y Y92F, fueron preparadas mediante PCR utilizando el kit comercial *QuikChange site-directed mutagenesis* (Stratagene). El cDNA de la AAO clonado en el vector pFLAG1 fue empleado como molde y los siguientes oligonucleótidos, incluyendo las mutaciones (subrayadas) en los correspondientes tripletes (negrita) fueron usados como cebadores (se muestran solamente las secuencias directas): Y92F, 5'-GGTCTAGCTCTG TTCACT**TT**CATGGTCATGATGCG-3'; H502S, 5'-GCCAACACGATTT TCAG**CCC**AGTTGGAACGGCC-3'; H546S, 5'-CCCTTCGCGCCCAAC GCA**AGT**ACCCAAGGACCG-3'. Los plásmidos mutados fueron aislados y el cDNA secuenciado (secuenciador GS-FLX Roche) para confirmar las mutaciones introducidas. Las variantes fueron producidas tal como se describe previamente para la AAO nativa.

2.3 Caracterización cinética en estado estacionario

Las constantes cinéticas de estado estacionario para la oxidación de los aldehídos por la AAO fueron determinadas mediante un ensayo acoplado en presencia de la HRP y el sustrato cromogénico Amplex[®] Red a 24°C, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a concentración atmosférica de oxígeno. La reacción se inició mediante la adición de la AAO a la mezcla de reacción. La HRP (6 unidades/ml), en presencia del H₂O₂ generado por la AAO, oxida el Amplex[®] Red (60 μM) a resofurina ($\epsilon_{563}= 52000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Hassan-Abdallah *et al.*, 2005). Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el ajuste de las velocidades iniciales con distintas concentraciones de aldehído a la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando el programa SigmaPlot versión 11 (Systat. Software. Inc. Richmond, CA, USA). La oxidación del *p*-nitrobenzaldehído por las variantes H502S y H546S se estimó a una concentración final de 7 mM de aldehído. Los valores de velocidad inicial así obtenidos fueron comparados con los de la enzima nativa.

Las actividades enzimáticas sobre los diferentes alcoholes se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos (Ferreira *et al.*, 2005) en tampón fosfato, pH 6, a concentración atmosférica de oxígeno. Estas actividades también se determinaron cuantificando la producción de peróxido de hidrogeno, mediante un ensayo acoplado con HRP y *o*-dianisidina a 24°C. La reacción se inició mediante la adición de AAO, cuantificándose la formación del producto de oxidación de la *o*-dianisidina a 460 nm ($\epsilon_{460}=6765 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Wagner y Jorns, 2000). Las constantes cinéticas se calculan tal y como se ha descrito previamente para las actividades aldehído oxidasa.

La actividad enzimática de la aldehído deshidrogenasa comercial de levadura sobre el benzaldehído, *p*-anisaldehído y 4-nitrobenzaldehído se determinó a 25°C en Tris/HCl 0.1 M, pH 8.0, con 1 M KCl y 1mM de EDTA, siguiendo la formación de NADH ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a partir de 5 mM de NAD⁺.

2.4 Estudios de GC-MS

Para el análisis de los productos, las reacciones enzimáticas se prepararon utilizando los aldehídos a una concentración final de 4 mM (1 mM en el caso del *p*-anisaldehído y 3-cloro-*p*-anisaldehído debido a problemas de solubilidad) y 0.3 μM de AAO en tampón fosfato 0.1 M, pH 6. Tras 3 horas de incubación a 24°C en agitación, se detuvo la reacción enzimática mediante su acidificación (pH 2-3). Tras una posterior extracción líquido-líquido con metil t-butil éter, los extractos fueron secados y re-disueltos en

cloroformo. Los análisis GC-MS se llevaron a cabo bien directamente o tras silanización con BSFA [bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida], en presencia de piridina. Se empleó un cromatógrafo VarianStar 3400 equipado con una columna DB-5HT (30 m x 0.25mm de diámetro interno; grosor de película 0.1 μm) acoplado a un detector de trampa iónica (Variun Star 2000). El horno se programó para incrementar la temperatura de 50°C a 330 °C a 6°C·min⁻¹ y la temperatura se mantuvo durante 3 min. La temperatura del inyector y el sistema de transferencia fue de 300°C. Se empleó helio como gas portador a un flujo de 2 ml·min⁻¹. La identificación de los compuestos se realizó mediante comparación de sus espectros de masas con estándares, que además fueron empleados para obtener factores de respuesta.

2.5 Espectroscopía de NMR

La tasas de hidratación de las soluciones de los aldehídos (~10 μM) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, preparados con agua deuterada (D₂O, pureza isotópica del 99.9%), fueron estimadas mediante ¹H-NMR usando un aparato Bruker Avance de 500 MHz. La señal del protón del agua residual (δ_{H} 4.701 ppm) fue empleada como referencia interna para los desplazamientos químicos. Para la estimación de la tasa de hidratación, la señal del protón $\underline{\text{H}}\text{-C}(\text{OH})_2$ en las especies *gem*-diol fue integrada y referida a la señal del protón $\underline{\text{H}}\text{-C}=\text{O}$ del aldehído. Espectros obtenidos en DMSO (pureza isotópica >99.8%), mostrando únicamente el aldehído no-hidratado, fueron usados como referencia.

2.6 Caracterización cinética de estado transitorio

Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX17.MV (Applied Photophysics) usando un detector de longitud de onda fija y de diodos (350-900 nm) y los programas SX18.MV y Xscan respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6 a 24 °C. Los experimentos de *turnover* (Gibson *et al.*, 1964) así como los análisis de la semi-reacción de reducción en anaerobiosis, fueron realizados como se describió previamente (Ferreira *et al.*, 2009) usando tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 24 °C. El estudio cinético de la evolución espectral del proceso de reducción de la enzima se realizó mediante análisis global y ajustes a modelos cinéticos A→B y A→B→C, siendo A, B y C las especies espectrales cuantificables macroscópicamente utilizando el programa de análisis *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd.). Estos modelos son equivalentes a las ecuaciones monoexponenciales y biexponenciales utilizadas para realizar el análisis cinético de la evolución de la reacción a una longitud de onda (462 nm, máximo espectral

de la AAO en estado oxidado) y poder obtener así las constantes observadas (k_{obs}) para la reacción de reducción. Los valores de k_{obs} a diferentes concentraciones de sustrato se ajustaron a las ecuaciones 1 o 2:

$$k_{obs} = \frac{k_{red}A}{K_d + A} \quad \text{Ec. 1}$$

$$k_{obs} = \frac{k_{red}A}{K_d + A} + k_{rev} \quad \text{Ec. 2}$$

donde K_d es la constante de disociación para el complejo enzima-sustrato, y k_{red} y k_{rev} , son las constantes directa y reversa de la reducción de la flavina.

El efecto isotópico del solvente en la semi-reacción de reducción de la AAO con *p*-nitrobenzaldehído fue determinado empleando H₂O y D₂O. Para los ensayos con solvente deuterado, los componentes de la reacción fueron disueltos en tampón fosfato 0.1 M deuterado, p²H 6. La AAO fue dializada exhaustivamente en el tampón deuterado para eliminar los protones intercambiables de la muestra.

2.7 Caracterización espectrofotométrica de los complejos AAO-ácido

La K_d para la formación del complejo AAO-ácido *p*-anísico fue determinada mediante técnicas de espectroscopia diferencial siguiendo los cambios en el espectro de absorción de la proteína tras sucesivas titulaciones con diferentes concentraciones de ácido en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25°C. Los cambios en el espectro de absorción de la AAO debido a la formación del complejo fueron ajustados a la ecuación 3 para un estequiometría 1:1.

$$\Delta Abs = \frac{\Delta\epsilon(E + L + K_d) - \Delta\epsilon\sqrt{\Delta\epsilon(E + L + K_d)^2 - 4EL}}{2} \quad \text{Ec. 3}$$

donde ΔAbs es la diferencia de los valores de absorbancia, E y L son las concentraciones de enzima y ligando, respectivamente, y K_d es la constante de disociación (Sancho y Gómez-Moreno, 1991). Finalmente, el complejo de la AAO reducida y el ácido *p*-anísico fue preparado mediante foto-reducción en presencia de EDTA y 5'-deazariboflavina, tal como describen Medina et al. (1998).

3. RESULTADOS

3.1 Actividad aldehído oxidasa durante la oxidación de alcoholes

La capacidad para continuar oxidando ciertos aldehídos hasta ácidos se dedujo de los perfiles de producción de H₂O₂ y aldehído durante la incubación de la AAO con diferentes alcoholes (**Figura 2**). En presencia del alcohol *p*-metoxibencílico, ambos perfiles de producción fueron similares, indicando que las concentraciones finales de ambos productos se corresponden con la estequiometría de la oxidación del alcohol a aldehído (**Figura 2A**). Sin embargo, con el alcohol 3-Cl-*p*-metoxibencílico, la concentración final de H₂O₂ fue próxima al doble de la de 3-Cl-*p*-anisaldehído, sugiriendo que una fracción del aldehído formado es posteriormente oxidado, liberándose mayor cantidad de H₂O₂ (**Figura 2B**). Esta doble actividad, alcohol y aldehído oxidasa, se ha observado también con otros alcoholes, como *m*- y *p*-fluorobencílicos (**Tabla 1**).

Tabla 1

Producción de H₂O₂ y al dehído durante la oxidación de distintos alcohol es insaturados por la AAO

Alcohol	H ₂ O ₂ (s ⁻¹)	Aldehído (s ⁻¹)
<i>p</i> -Metoxibencílico	106 ± 5	113 ± 2
Veratrílico	75 ± 2	88 ± 1
<i>m</i> -Clorobencílico	21 ± 1	21 ± 1
<i>p</i> -Clorobencílico	37 ± 1	33 ± 1
3-Cl- <i>p</i> -metoxibencílico	60 ± 1	39 ± 1
<i>m</i> -Fluorobencílico	22 ± 1	15 ± 1
<i>p</i> -Fluorobencílico	28 ± 1	20 ± 1
2,4-Hexadien-1-ol	138 ± 2	135 ± 2

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 24°C. Los resultados se muestran como ^{app}k_{cat} (moles de producto formado por mol de enzima y segundo).

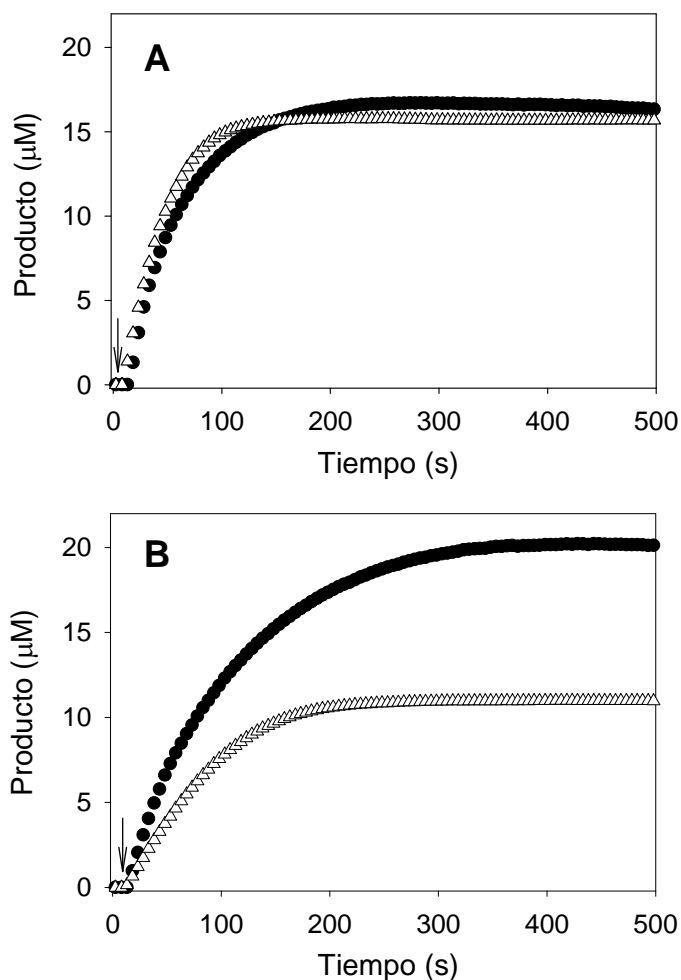


Figura 2. Producción de aldehído y H_2O_2 durante la oxidación de los alcoholes *p*-metoxibencílico y 3-cloro-*p*-metoxibencílico por la AAO. Los alcoholes *p*-metoxibencílico (A) y 3-cloro-*p*-metoxibencílico (B) (16 mM) fueron incubados con AAO 0.01 μM durante 500 s. Las concentraciones de los productos de reacción fueron determinadas espectrofotométricamente (*p*-anisaldehído a 285 nm y 3-cloro-*p*-anisaldehído a 295 nm) y mediante un ensayo acoplado en presencia de Amplex[®]Red y HRP. La flecha indica la adición de la enzima. Aldehído (Δ), H_2O_2 (\bullet).

3.2 Oxidación de los aldehídos por la AAO en estado estacionario

El estudio de la actividad aldehído oxidasa de la AAO se abordó mediante la determinación de las constantes cinéticas de estado estacionario, empleando nueve aldehídos bencílicos *para* y *meta* sustituidos, el benzaldehído y el aldehído alifático 2,4- hexadienal (**Tabla 2**). Con todos los aldehídos ensayados pudieron determinarse las constantes cinéticas de estado estacionario, a excepción de con el 2,4-dinitrobenzaldehído cuya actividad (menor del 1% de la observada con *p*-nitrobenzaldehído) y solubilidad fueron demasiado bajas. Considerando los valores de eficiencia, el *m*-clorobenzaldehído fue el mejor sustrato de tipo aldehído, mientras que el veratraldehído fue el peor. El valor de k_{cat} más alto se encontró frente al *p*-nitrobenzaldehído, mientras que los valores más bajos de k_{cat} se observaron frente a los benzaldehídos metoxilados. La mayor afinidad se encontró para el *p*-anisaldehído y el 3-Cl-*p*-anisaldehído, a pesar de su baja actividad. Para estudiar la oxidación de los aldehídos se emplearon además tres variantes mutadas en los residuos His502, His546 y Tyr92, conservados en el centro activo de la AAO y de la glucosa oxidasa (Varela *et al.*, 2000), obtenidas mediante mutagénesis dirigida. La actividad de las variantes H502S y H545S sobre el *p*-nitrobenzaldehído ($0.11 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $0.22 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, respectivamente) fue menor a la de la enzima nativa ($75 \pm 0.16 \text{ min}^{-1}$), indicando que ambos residuos de histidina son cruciales para la oxidación de los aldehídos. Por otro lado, la eliminación del grupo hidroxilo de la Tyr92 en la variante Y92F incrementó la actividad sobre el *p*-anisaldehído mientras que su actividad sobre el *p*-nitrobenzaldehído fue similar a la de la enzima nativa (**Tabla 3**).

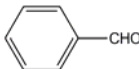
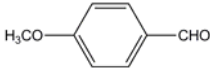
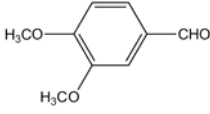
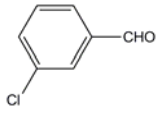
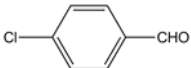
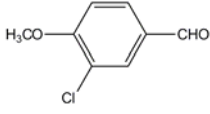
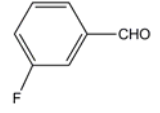
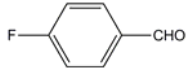
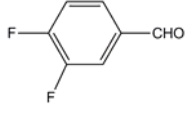

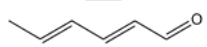
Tabla 3

Constantes cinéticas de estado estacionario para la oxidación de dos aldehídos por la variante Y92F y la AAO nativa

Aldehído	K_m (mM)	$^{app}k_{cat}$ (min^{-1})	$^{app}k_{cat}/K_m$ ($\text{mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
<i>p</i> -Anisaldehído			
Y92F	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.02	0.8 ± 0.03
Nativa	0.7 ± 0.1	3.0 ± 0.1	5.2 ± 0.4
<i>p</i> -Nitrobenzaldehído			
Y92F	2.0 ± 0.3	72.6 ± 4.3	35.8 ± 3.7
Nativa	5.0 ± 0.2	98 ± 2.0	18.9 ± 0.4

Las constantes cinéticas de la variante Y92F se obtuvieron tal y como se explica en la Tabla 2.

Tabla 2
Constantes de estado estacionario para la oxidación de distintos aldehídos por la AAO

Aldehído	Estructura	K_m (mM)	$^{app}k_{cat}$ (min^{-1})	$^{app}k_{cat}/K_m$ ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Benzaldehído		7.0 ± 0.8	30 ± 1	4.4 ± 0.4
<i>p</i> -Anisaldehído		0.7 ± 0.1	3.0 ± 0.1	5.2 ± 0.4
Veratraldehído		8.0 ± 1.0	8.0 ± 0.6	1.0 ± 0.1
<i>m</i> -Clorobenzaldehído		1.5 ± 0.1	51 ± 1	38.6 ± 3.0
<i>p</i> -Clorobenzaldehído		4.7 ± 0.3	63 ± 1	13.4 ± 0.5
3-Cl- <i>p</i> -Anisaldehído		0.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1	5.1 ± 0.4
<i>m</i> -Fluorobenzaldehído		2.2 ± 0.2	53 ± 1	24.4 ± 1.4
<i>p</i> -Fluorobenzaldehído		4.9 ± 0.2	22.0 ± 0.4	4.5 ± 0.1
3,4-Difluoro-benzaldehído		3.0 ± 0.2	52 ± 1	16.9 ± 0.7
<i>p</i> -Nitrobenzaldehído		5.0 ± 0.2	98 ± 2	18.9 ± 0.4
2,4-Hexadienal		13.0 ± 2.0	20 ± 1	1.5 ± 0.1

Los ensayos de oxidación de diferentes aldehídos se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 24°C. Los parámetros cinéticos fueron determinados midiendo la producción de peróxido usando un ensayo acoplado con HRP y ajuste no-lineal de las velocidades iniciales a la ecuación de Michaelis-Menten normalizada. Se muestran los valores medios y el error standard.

3.3 Identificación de los productos de oxidación de los aldehídos mediante GC-MS

Empleando GC-MS se analizaron los productos de oxidación de 12 aldehídos tras su tratamiento con AAO (análisis directo o tras silanización), como se muestra en la **Figura 3** para la reacción del *p*-nitrobenzaldehído que dio lugar a la formación del ácido *p*-nitrobenzónico, tal y como reveló el espectro de masas. En las reacciones con la mayoría de los aldehídos se encontraron los correspondientes ácidos tras el tratamiento con AAO (ver **Tabla 4** para observar los fragmentos más característicos de los espectros de masas, y la cuantificación de los ácidos formados). Las tasas de oxidación más altas bajo las condiciones de reacción empleadas se obtuvieron para *p*-clorobenzaldehído (48%), *p*-nitrobenzaldehído (43%), *m*-clorobenzaldehído (39%), *p*-flurobenzaldehído (20%) y *p*-anisaldehído (17%). No se detectó la formación de ácido con el veratraldehído y 2,4-dinitrobenzaldehído. Con los otros cinco aldehídos las tasas de oxidación fueron bajas (<7%).

3.4 Análisis de las formas *gem*-diol de los aldehídos mediante NMR

Para investigar la posible implicación de las especies *gem*-diol, se estimó la tasa de hidratación de los doce aldehídos empleados como sustratos de la AAO a partir del espectro de ¹H-NMR. El espectro del *p*-anisaldehído (**Figura 4A**) mostró cuatro señales (además de la señal del agua), correspondientes a los protones del grupo metoxilo, los protones aromáticos en *orto* (H₂₊₆) y *meta* (H₃₊₅) y el protón del aldehído (H_α). La ausencia de la señal del protón bencílico del *gem*-diol (δ_H 6 p.p.m.) indicaba que el *p*-anisaldehído no se encontraba en su forma hidratada. Por otro lado, el espectro del *p*-nitrobenzaldehído (**Figura 4B**) incluye la señal del *gem*-diol (H_{α'}) junto a la del aldehído (H_α), así como señales dobles de los protones de los anillos de las especies *gem*-diol (H_{2'+6'} y H_{3'+5'}) y aldehído (H₂₊₆ y H₃₊₅), revelando una hidratación parcial. Se detectaron señales similares de *gem*-diol en el resto de espectros de NMR, con la excepción del *p*-anisaldehído y el veratraldehído. Las tasas de hidratación (**Tabla 5**) se obtuvieron integrando las señales de los protones bencílicos (H_α y H_{α'}).

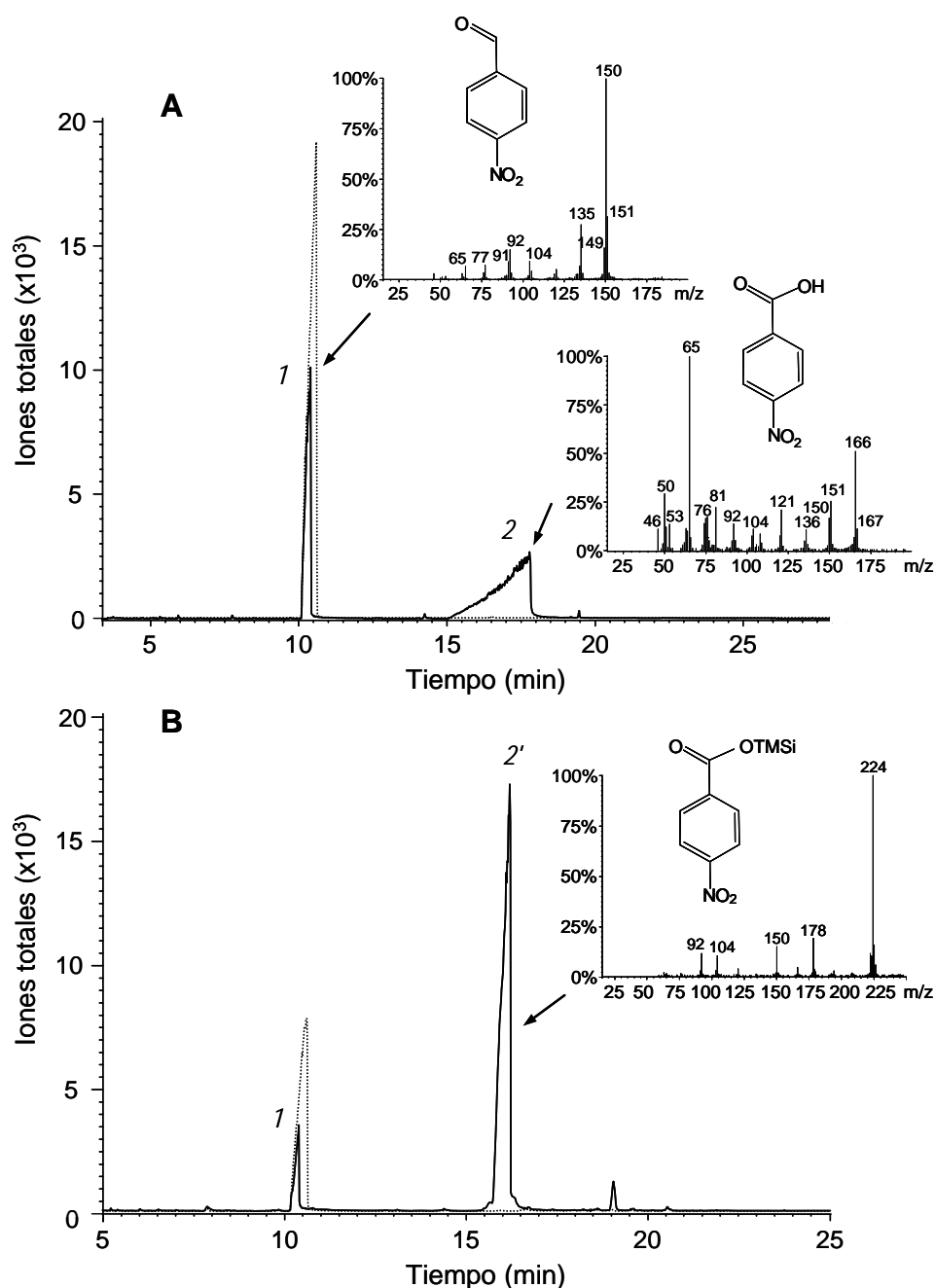


Figura 3. GC-MS de reacciones de la AAO con *p*-nitrobenzaldehído (silanzadas y sin derivatizar). Se muestran los perfiles cromatográficos (incluyendo controles, líneas discontinuas) y espectros de masas del aldehído (pico 1) y del ácido en sus formas libres y de trimetilsilil (TMSi) ester (picos 2 y 2', respectivamente). El *p*-nitrobenzaldehído (4 mM) fue incubado con AAO (3 μ M) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, durante 3 h a 24 $^{\circ}$ C. La mezcla de reacción, y el correspondiente control sin enzima, fueron extraídos y analizados por GC-MS antes (A) y después (B) de silanización. Los espectros de masas fueron obtenidos con una trampa de iones. El pequeño pico con un tiempo de retención de 19 minutos en (B) podría ser un dímero producto de la reacción. La silanización mejoró la resolución de los picos de los ácidos, debido a la formación de derivados ester más volátiles. Sin embargo, la recuperación de los diferentes ácidos fue mayor cuando las muestras fueron analizadas directamente, debido probablemente a una derivatización incompleta o a la existencia de reacciones secundarias en algunos casos.

Tabla 4
Análisis por GC-MS de la formación de ácidos durante la oxidación de diferentes aldehídos

Ácido	Fragmentos MS (m/z)	Ácido formado (%)
Benzoico	105, 122, 77, 51, 50	5
<i>p</i> -Anísico	135, 152, 77, 107, 92	17
Verátrico	n/d	0
<i>m</i> -Clorobenzoico	139, 156, 111, 75, 50	39
<i>p</i> -Clorobenzoico	139, 156, 111, 75, 50	48
3-Cl- <i>p</i> -Anísico	186, 169, 115, 63, 77	2
<i>m</i> -Fluorobenzoico	123, 140, 95, 75, 50	5
<i>p</i> -Fluorobenzoico	123, 140, 95, 75, 50	20
3,4-Difluorobenzoico	141, 113, 158, 63, 93	7
<i>p</i> -Nitrobenzoico	65, 167, 109, 121, 150	43
2,4-Dinitrobenzoico	n/d	0
2,4-Hexadienoico	97, 67, 65, 95, 112	5

Los diferentes ácidos formados, tras incubar 12 aldehídos con 0.3 μM de AAO durante 3 h, fueron extraídos y analizados por GC-MS (sin derivatizar). Se estimaron las tasas de oxidación como porcentajes molares de la concentración inicial del aldehído (1 mM o 4 mM). Se indican los fragmentos principales de los espectros de masas en orden decreciente de intensidad. n/d, no disponible porque no se formó el ácido.

Tabla 5
Estimación de la tasa de hidratación de los aldehídos por $^1\text{H-NMR}$

Aldehído	δ_{H} (ppm)		Hidratación (%)
	<i>gem</i> -Diol	Aldehído	
Benzaldehído	5.97	9.86	1.0
<i>p</i> -Anisalaldehído	n/d	9.69	0
Veratraldehído	n/d	9.66	0
<i>m</i> -Clorobenzaldehído	5.95	9.84	4.4
<i>p</i> -Clorobenzaldehído	5.96	9.84	1.0
3-Cl- <i>p</i> -Anisalaldehído	5.91	9.69	0.9
<i>m</i> -Fluorobenzaldehído	5.96	9.86	3.0
<i>p</i> -Fluorobenzaldehído	5.97	9.81	0.7
3,4-difluorobenzaldehído	5.94	9.79	3.1
<i>p</i> -Nitrobenzalaldehído	6.07	10.03	19.5
2,4-Dinitrobenzalaldehído	6.54	10.35	82.8
2,4-Hexadienal	5.73	9.31	0.4

La tasas de hidratación de los diferentes aldehídos ensayados como sustratos de la AAO fueron determinadas mediante integración de las señales de los protones bencílicos de las especies *gem*-diol [$\text{H-C}(\text{OH})_2$] y aldehído [$\text{H-C}=\text{O}$] en los espectros de $^1\text{H-NMR}$ (H_α' y H_α respectivamente en la **Figura 4**). Se indican los desplazamientos químicos (δ_{H}) de las formas *gem*-diol y aldehído.

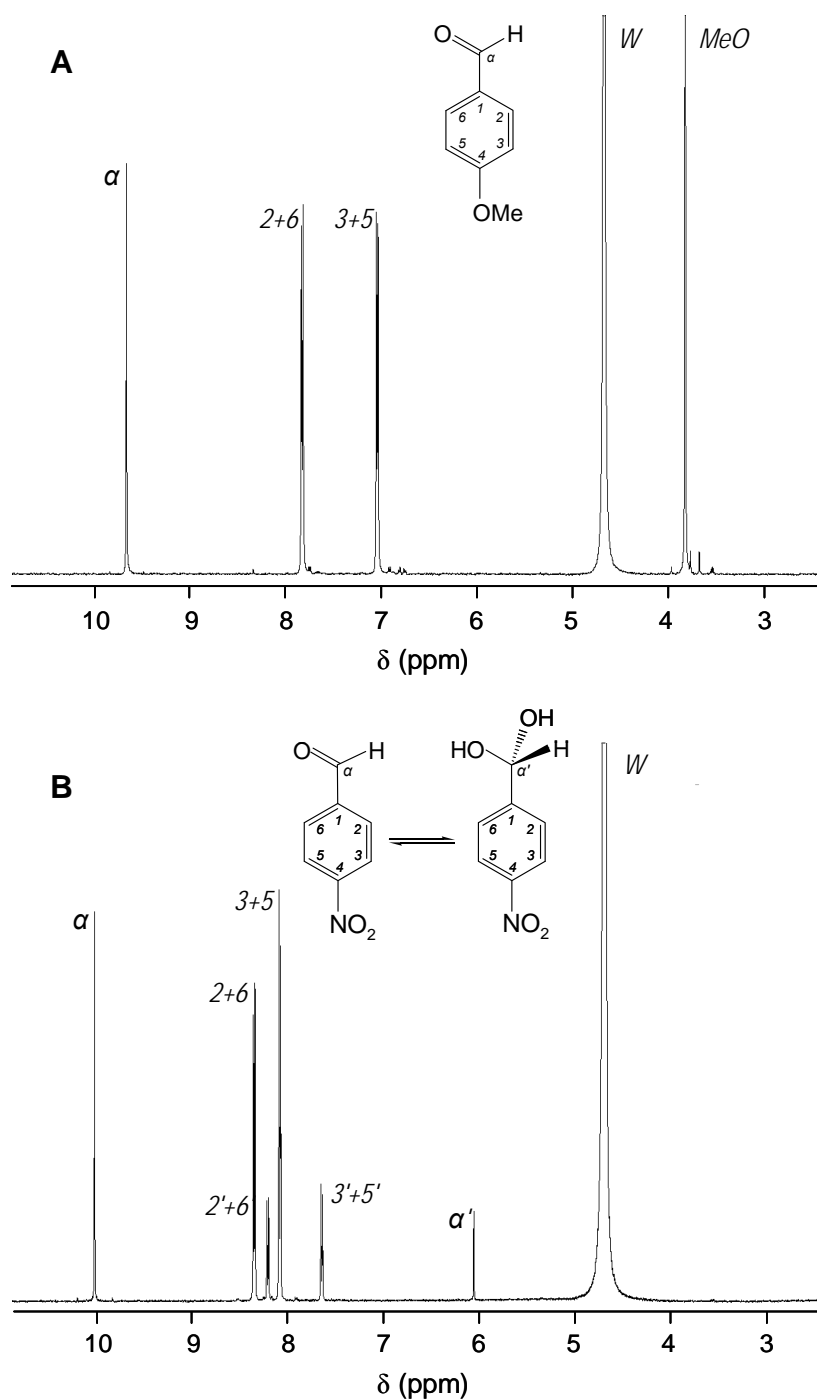


Figura 4. **Análisis de la hidratación del *p*-anisaldehído y el *p*-nitrobenzaldehído mediante NMR.** Las soluciones de *p*-anisaldehído (**A**) *p*-nitrobenzaldehído (**B**) en tampón fosfato, pH 6 (preparado con D₂O), fueron analizadas por ¹H-NMR dando lugar a señales correspondientes a: H_α en el aldehído (α) y en el *gem*-diol (α'); H_{2,6} en el aldehído (2+6) y en el *gem*-diol (2'+6'); H_{3,5} en el aldehído (3+5) y en el *gem*-diol (3'+5'); y H_{MeO} (MeO). Para estimar la tasa de hidratación, la señal α' del *gem*-diol fue integrada y referida a la señal α del aldehído. Se obtuvo un resultado similar considerando las señales de los protones aromáticos de las formas *gem*-diol (2'+6' o 3'+5') frente a las de los aldehídos (2+6 o 3+5).

Las tasas de hidratación de todos los aldehídos ensayados fueron relativamente bajas, con la única excepción del 2,4-dinitrobenzaldehído. Los mayores valores de hidratación se corresponden con los aldehídos aromáticos con sustituyentes aceptores de electrones, que facilitan la hidratación cuando están localizados en posiciones *orto* o *para*, como uno o dos grupos nitro (20% y 83% de hidratación, respectivamente) o en posición *meta*, como los átomos de cloro (4%) o flúor (3%). La presencia de halógenos en posición *para* no incrementó la tasa de hidratación respecto al benzaldehído (1%), tal como se espera de la orientación *meta* del efecto electrofílico, observándose lo mismo al comparar las tasas de hidratación del 3,4-difluorobenzaldehído y el *m*-flurobenzaldehído (ambos con un 3%). Sin embargo, la presencia de sustituyentes metoxilo, que actúan como donadores de electrones (especialmente en posición *para*) dio lugar a la ausencia completa de la forma *gem*-diol, tal y como se observó para el *p*-anisaldehído y el veratraldehído. Finalmente, el aldehído alifático poliinsaturado 2,4-hexadienal mostró una tasa de hidratación muy pequeña (menor del 1%).

3.5 Oxidación de aldehídos bencílicos por la aldehído deshidrogenasa de levadura

Se investigó la posible influencia de los diferentes sustituyentes del anillo aromático durante la oxidación de los aldehídos aromáticos por la enzima aldehído deshidrogenasa de levadura, que no es capaz de oxidar especies *gem*-diol pero actúa sobre aldehídos no hidratados. Curiosamente, aunque la eficiencia catalítica de esta enzima en presencia de benzaldehído fue mayor que con *p*-anisaldehído, no se vio incrementada por la presencia de un sustituyente aceptor de electrones como el *p*-nitrobenzaldehído (**Figura 5**), en oposición a lo observado con la AAO.

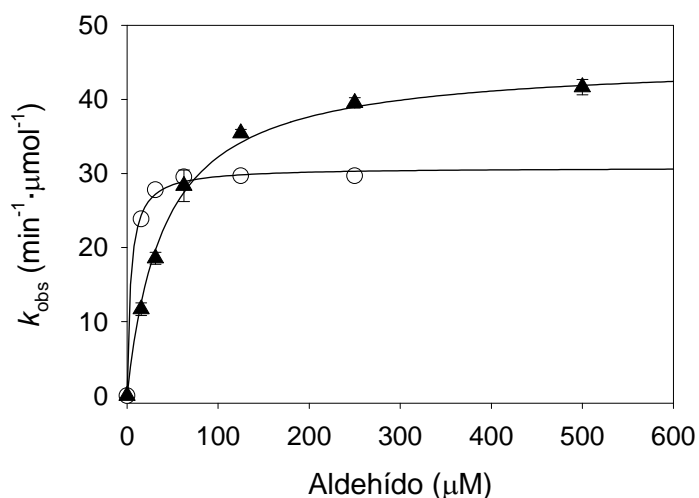


Figura 5. Cinéticas de oxidación del benzaldehído y el *p*-nitrobenzaldehído por la enzima aldehído deshidrogenasa. Las tasas de oxidación del benzaldehído (\blacktriangle) y el *p*-nitrobenzaldehído (\circ) fueron determinadas a través de la formación de NADH en tampón Tris/HCl, pH 8, conteniendo KCl 0.1 M, EDTA 1 mM y NAD^+ 5 mM, a 25 °C (valores medios \pm desviaciones estándar para k_{obs}). Las tasas de recambio para el benzaldehído y el *p*-nitrobenzaldehído fueron 45.3 ± 0.8 y $30.8 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

3.6 Estudios mediante la técnica de flujo detenido

Para estudiar el estado redox del cofactor durante la oxidación de los aldehídos se empleó un dispositivo de flujo detenido. Se hizo reaccionar una solución de la enzima con concentraciones saturantes de *p*-nitrobenzaldehído en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25°C en aerobiosis (**Figura 6**). Se observó que la enzima está totalmente oxidada en presencia de los aldehídos durante el estado estacionario. Este correspondió con el min 1-2 de la reacción (inserto en la **Figura 6**) cuando la disponibilidad del oxígeno no es aún limitante, e indicó que la semi-reacción de reducción de la AAO por los aldehídos es mucho más lenta que la semi-reacción de oxidación en presencia de oxígeno.

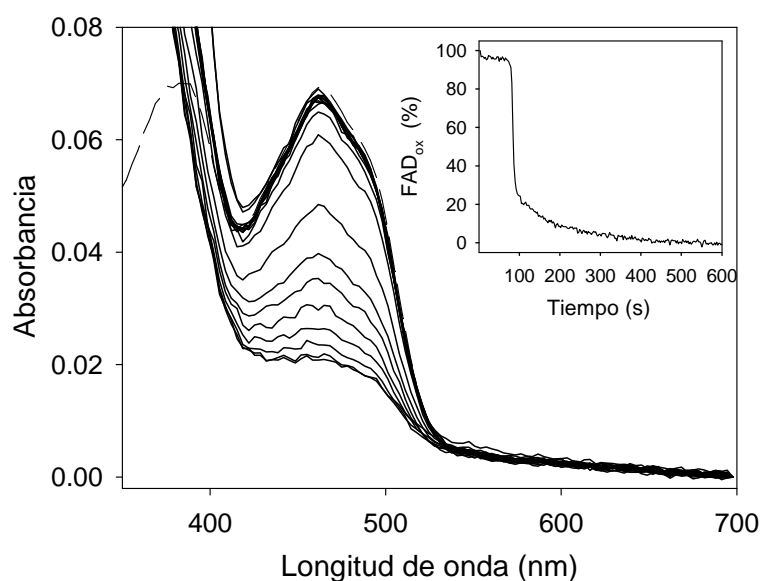


Figura 6. **Evolución del espectro de absorción durante el *turnover* de la AAO con *p*-nitrobenzaldehído.** Una solución aeróbica de AAO ($6.3 \mu\text{M}$) se hizo reaccionar con *p*-nitrobenzaldehído (2 mM) en tampón fosfato 0.1 M , pH 6 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido. En el panel principal se muestra el espectro de absorción de la AAO oxidada antes de la reacción (línea discontinua) y los espectros de absorción registrados tras 0.02, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 76, 79, 84, 87, 102, 150, 199, 300 y 400 s. El inserto muestra el porcentaje de enzima oxidada lo largo del tiempo, revelando que la enzima permanece completamente oxidada durante el *turnover*.

La reducción de la enzima (oxidada) por el *p*-anisaldehído, 3-clorobenzaldehído, veratraldehído y *p*-nitrobenzaldehído fue estudiada en anaerobiosis (**Figura 7**). El primer espectro de absorción, obtenido tras mezclar la AAO con los diferentes aldehídos fue, en general, diferente al observado en ausencia de sustrato (**Figura 7**), mostrando un desplazamiento y un incremento en el máximo de absorbancia a 462 nm . Estos cambios reflejaron la formación del complejo de la enzima oxidada con el sustrato de tipo aldehído ($\text{AAO}_{\text{ox-S}}$). La subsiguiente disminución de la absorbancia a 462 nm se correspondió con la reducción de la enzima. Cabe mencionar que durante la reacción de reducción con *p*-anisaldehído, el 3-cloro-*p*-anisaldehído y el veratraldehído se observó la formación de un complejo de transferencia de carga entre la enzima reducida y el producto de la reacción ($\text{AAO}_{\text{red-P}}$), caracterizado por un pico a 490 nm y una banda a longitudes de onda larga (**Figuras 7A, C y D**).

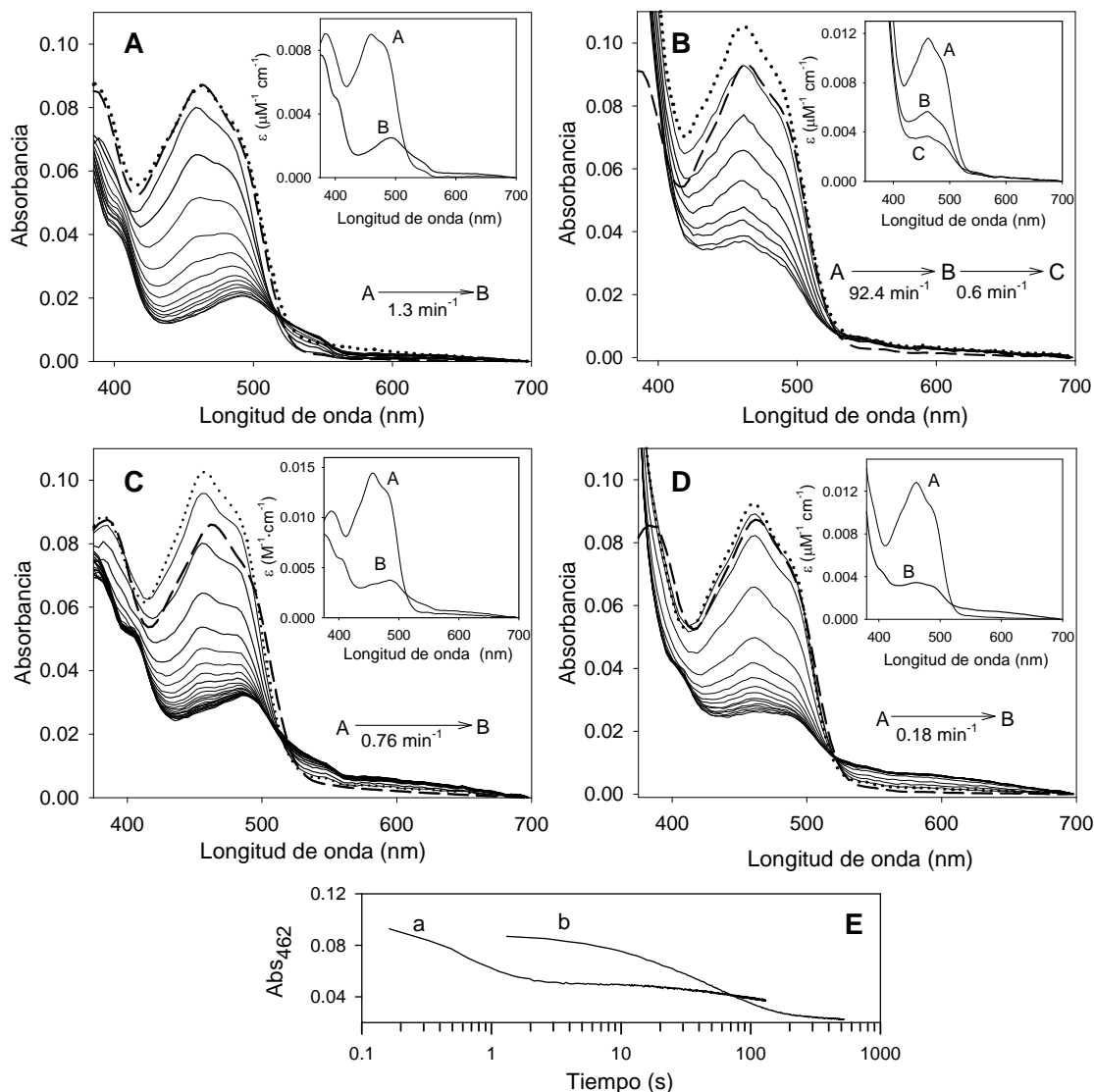


Figura 7. Cambios en el espectro de absorción de la AAO durante su reducción anaeróbica con cuatro aldehídos. La reducción de la AAO (8 μM) con 0.5 mM de *p*-anisaldehído (A), 2 mM de *p*-nitrobenzaldehído (B), 4.5 mM de 3-cloro-*p*-anisaldehído (C) y 2.5 mM de veratraldehído (D) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 24 $^{\circ}\text{C}$, fue determinada en anaerobiosis empleando un equipo de mezcla rápida con flujo detenido. En los paneles principales se muestra el espectro inicial de la enzima antes de la reacción (línea discontinua), el primer espectro una vez iniciada la reacción (línea de puntos), y los espectros a distintos tiempos: 0.5, 1, 13, 29, 52, 76, 102, 128, 152, 176, 202, 301 y 404 s en A; 0.009, 0.16, 0.5, 0.8, 1.5, 20, 50, 100 y 130 s en B; 2.6 s y luego cada 25 s durante un total de 450 s en C; 10 s y después cada 200 s durante un total de 3200 s en D. Los insertos muestran una deconvolución de los cambios espectrales tras su ajuste a un modelo de un paso (A \rightarrow B) en A, C y D y de dos pasos (A \rightarrow B \rightarrow C) en B. A, B o C son especies espectrales que reflejan la distribución de los reactantes, intermedios y/o productos, y no representan necesariamente formas intermedias de la enzima. (E) Variación de la absorbancia a 462 nm durante la reducción de la AAO en presencia de los aldehídos de A y B.

La evolución del espectro de absorción durante la reducción anaeróbica de la enzima en presencia de *p*-anisaldehído, 3-cloro-*p*-anisaldehído y veratraldehído se ajustó a un proceso irreversible $A \rightarrow B$, en el que no se observó la formación de ninguna especie intermedia de la flavina (**Figuras 7A, C y D**). Las constantes de reducción para estos aldehídos fueron 1.32, 0.76 y 0.18 min^{-1} , respectivamente. Por el contrario, la reducción de la AAO en presencia de *p*-nitrobenzaldehído se ajustó a un proceso de dos etapas, $A \rightarrow B \rightarrow C$ (**Figura 7B**), donde la etapa $A \rightarrow B$ fue considerablemente más rápida respecto a los aldehídos anteriores (superior a 90 min^{-1}). Se comparó la reducción de la enzima en presencia de *p*-nitrobenzaldehído (con 20% de hidratación y máxima tasa de recambio) y *p*-anisaldehído (no hidratado y con menor reactividad). En ambos casos, la dependencia de la k_{obs} de la concentración de aldehído se ajustó a la ecuación 1, lo que indicaba una reacción esencialmente irreversible, y permitía determinar los parámetros cinéticos de la semi-reacción de reducción para el *p*-anisaldehído ($k_{\text{red}} 1.5 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ y $K_d 0.032 \pm 0.019 \text{ mM}$) y el *p*-nitrobenzaldehído ($k_{\text{red}} 356 \pm 38 \text{ min}^{-1}$ y $K_d 5.79 \pm 0.77 \text{ mM}$). En el caso del *p*-nitrobenzaldehído, la reducción de la AAO incluía una segunda etapa más lenta ($B \rightarrow C$) con una k_{obs} de 0.74 min^{-1} . Para este sustrato se estudió además el efecto isotópico cinético del solvente con un valor de $^{D_2O}k_{\text{red}}$ de 1.5 ± 0.01 , calculado como el cociente entre la k_{red} determinada en H_2O y D_2O .

3.7 Caracterización espectrofotométrica de los complejos de la AAO con ácidos aromáticos

Se observó que los ácidos aromáticos se unen a la AAO de forma que modifican su espectro de absorción (tal y como se ilustra en la **Figura 8A** durante la titulación de la AAO con ácido 3-cloro-*p*-anísico). Se obtuvieron los correspondientes espectros diferenciales con los ácidos aromáticos *p*-anísico, verátrico, *m*-clorobenzoico, *m*-flurobenzoico y benzoico; siendo similares cualitativamente (datos no mostrados). Los ácidos que presentaron mayor afinidad (menor K_d) fueron el ácido 3-cloro-*p*-anísico ($31.5 \pm 0.1 \text{ }\mu\text{M}$) y el ácido *p*-anísico ($94 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$), mientras que la menor afinidad presentada por otros ácidos sugirió que sus valores de K_d estarían en el rango milimolar. La fotorreducción en anaerobiosis del complejo de la AAO_{ox} con ácido *p*-anísico permitió obtener el espectro de absorción del complejo de la AAO_{red} con ácido *p*-anísico (**Figura 8B**). El espectro de absorción tras la fotorreducción se caracterizó por el desplazamiento del máximo de la flavina a $\sim 490 \text{ nm}$ y el incremento de la absorbancia en la región 520-600 nm, siendo similar al espectro final observado tras la reducción con *p*-anisaldehído. Esto indica que las especies totalmente reducidas, observadas tras la reducción de la AAO con este aldehído, así

como con 3-cloro-*p*-anisaldehído, se corresponden con el complejo AAO_{red}-ácido (**Figuras 7A y B**). Los otros ácidos mostraron uniones más débiles y por tanto no se detectaron complejos AAO_{red}-ácido tras la reducción de la AAO (**Figuras 7 C y D**).

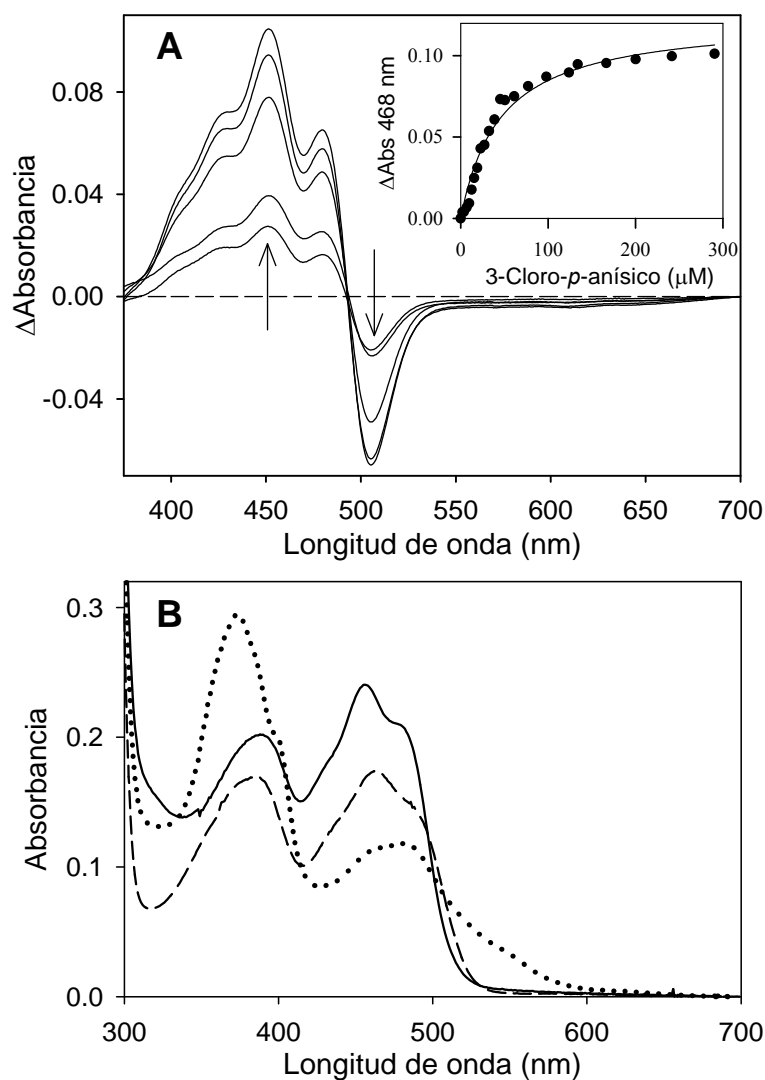


Figura 8. **Titulación de I a AAO c on di ferentes concentraciones de aldehído y fotorre ducción del complejo AAO-ácido.** (A) Espectros diferenciales obtenidos durante la titulación de la AAO (25 μM) con 19, 23, 77, 200 y 300 μM de 3-cloro-*p*-anisaldehído, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 24 $^{\circ}\text{C}$. El inserto muestra el incremento de absorbancia a 450 nm (●) en función de la concentración del ácido, ajustado a una curva hiperbólica de saturación (K_d de $45.5 \pm 5.2 \mu\text{M}$). (B) Fotorreducción del complejo de la AAO con ácido *p*-anisico. La línea de trazos corresponde al espectro de la AAO oxidada (16 μM) antes de la titulación. El espectro del complejo AAO_{ox}-(ácido *p*-anisico) (línea continua) fue obtenido tras añadir una concentración 356 μM de ácido. El espectro del complejo AAO_{red}-(ácido *p*-anisico) (línea de puntos) fue obtenido tras fotorreducción, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6 a 24 $^{\circ}\text{C}$ en anaerobiosis y en presencia de 5'-deazariboflavina.

4. DISCUSIÓN

4.1 Actividad aldehído oxidasa de la AAO: hidratación de aldehídos y oxidación enzimática

Los primeros estudios de especificidad de sustrato indicaban que la AAO de *P. eryngii* además catalizar la oxidación de alcoholes aromáticos presentaba también cierta actividad aldehído oxidasa. (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2005) (**Figura 1A**). Estos resultados fueron confirmados mediante ^{19}F -NMR, utilizando *p*-fluorobenzaldehído como sustrato (Ferreira *et al.*, 2005). En el presente trabajo los espectros de masas de los ácidos formados durante la oxidación de diferentes aldehídos han confirmado la actividad aldehído oxidasa de la AAO. Los resultados de GC-MS se correlacionan con los valores de k_{cat} , indicando en ambos casos que el *p*-nitrobenzaldehído y dos clorobenzaldehídos son los mejores sustratos (de tipo aldehído) de la AAO.

En soluciones acuosas, los compuestos con grupos carbonilo existen en equilibrio con sus formas *gem*-diol. Las tasas de hidratación de los aldehídos aromáticos comparadas con los alifáticos son generalmente bajas, y la tasa del benzaldehído es comúnmente considerada como insignificante. Sin embargo, empleando ^1H -NMR se ha demostrado que todos los aldehídos estudiados presentan tasas de hidratación cuantificables, a excepción del veratraldehído y el *p*-anisaldehído. Las tasas de hidratación se pueden correlacionar con la presencia de sustituyentes dadores o aceptores de electrones que estabilizan o desestabilizan la forma *gem*-diol.

La oxidación enzimática de los aldehídos, en sus formas deshidratadas, es frecuentemente catalizada por un residuo del centro activo que forma un aducto covalente que favorece la oxidación. Los ejemplos más clásicos son las aldehído deshidrogenasas, donde un residuo de cisteína forma un enlace tiohemiacetal con el sustrato (Marchal y Branlant, 1999). Residuos del centro activo como serina, glutamato o lisina pueden activar aldehídos formando aductos bajo condiciones específicas (Teng *et al.*, 1993). Alternativamente, metales del centro activo pueden promover la hidratación *in situ*, como se ha sugerido para la oxidación del benzaldehído por la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (Olson *et al.*, 1996) y las aldehído deshidrogenasas de mamíferos (Garattini *et al.*, 2008). La estructura del centro activo de la AAO (PDB 3FIM) no presenta residuos susceptibles de formar aductos con aldehídos, ni contiene metales (Fernández *et al.*, 2009). Esto, junto a la correlación observada entre la velocidad de oxidación y la tasa de hidratación de los aldehídos, sugiere que el agua actúa como molécula activante en la oxidación de los aldehídos por la AAO (**Figura 1B**). Se han descrito mecanismos de activación similares para la oxidación de aldehídos hidratados por la histidinol

deshidrogenasa (Teng *et al.*, 1993), dos aldehído deshidrogenasas mutadas (Corbier *et al.*, 1992; Ge *et al.*, 2004) y la colina oxidasa (Fan *et al.*, 2006). Además, en una alcohol oxidasa de *Drosophila melanogaster* se ha descrito una correlación positiva entre la hidratación del aldehído y la velocidad de oxidación (Eisses, 1989). La actividad similar de la aldehído deshidrogenasa de levadura sobre el benzaldehído y el *p*-nitrobenzaldehído, contrasta con lo encontrado en la AAO, apoyando la existencia de mecanismos de oxidación diferentes en ambas enzimas.

La actividad aldehído oxidasa de la AAO es considerablemente baja comparada con su actividad alcohol oxidasa (Ferreira *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando los valores de k_{cat} para los diferentes aldehídos estudiados son corregidos en función de sus diferentes tasas de hidratación, la mayor actividad correspondió a las formas *gem*-diol del *m*-flurobenzaldehído, *p*-flurobenzaldehído y *p*-clorobenzaldehído, con tasas de recambio ($100\text{-}300\text{ s}^{-1}$) próximas a las obtenidas para los mejores sustratos de tipo alcohol de la AAO (Ferreira *et al.*, 2009).

4.2 Mecanismo de oxidación de aldehídos por la AAO

Si, como se ha sugerido antes, la AAO presenta una preferencia por los aldehídos en su forma *gem*-diol el mecanismo de la semi-reacción de reducción (etapa limitante) será probablemente el mismo que el descrito durante la oxidación de los alcoholes por la AAO, es decir, un mecanismo concertado de transferencia de hidruro desde el carbono- α al N5 de la flavina y de protón del grupo hidroxilo a una base catalítica (Ferreira *et al.*, 2009). La baja velocidad de oxidación del 2,4-dinitrobenzaldehído por la AAO (a pesar de su alta tasa de hidratación) puede explicarse porque, aunque la hidratación es promovida por los dos grupos nitro, su papel como sustituyentes desactivantes del anillo de benceno podría dificultar la transferencia del hidruro. Se ha descrito una situación similar para la oxidación de acetaldehído clorado (en su forma *gem*-diol) por la alcohol deshidrogenasa de *D. melanogaster* (Eisses, 1989). En la ruptura de uno de los dos enlaces O-H de la forma *gem*-diol participaría un residuo como base catalítica, que podría ser la His502 o la His546 (**Figura 9**) tal y como se ha postulado durante la oxidación de los alcoholes por la AAO (Ferreira *et al.*, 2006). El papel de estos residuos en la oxidación de aldehídos ha sido confirmado mediante la caracterización cinética de las variantes H502S y H546S. Estas variantes mostraron una notable disminución en la velocidad de oxidación del *p*-nitrobenzaldehído respecto a la enzima nativa. La disminución de 340-veces en actividad para la variante H502S, fue menor a la obtenida durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Hernández-Ortega *et al.*, 2008). Sin embargo, la disminución de la mencionada actividad en la variante H564S (670 veces) fue mayor que la

descrita para la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (60 veces) (Hernández-Ortega *et al.*, 2008), sugiriendo que este residuo podría jugar un papel más relevante durante la oxidación de los *gem*-dioles, debido probablemente a la diferente orientación de los alcoholes y aldehídos hidratados en el centro activo de la AAO.

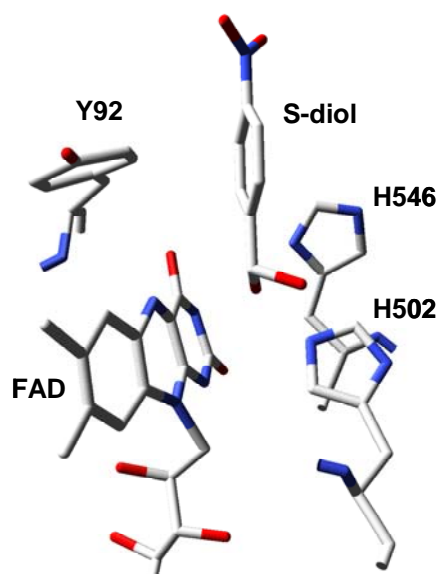


Figura 9. Localización de los residuos His502, His546 y Tyr92 en el centro activo de la AAO. La molécula de agua próxima al anillo de isoaloxazina del FAD, presente en la estructura cristalográfica de la AAO, ha sido sustituida por una molécula hidratada (*gem*-diol) de *p*-nitrobenzaldehído (S-diol). Las cadenas laterales de la His502 y la His546 se encuentran, respectivamente, a una distancia de 2.5 Å y 3.2 Å de los grupos hidroxilo del *gem*-diol, mientras que el N5 de la flavina y el grupo hidroxilo de la Tyr92 están, respectivamente, a 3.0 Å y 6.3 Å del carbono- α del *gem*-diol. Basado en la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM).

El efecto isotópico cinético de solvente obtenido durante la reducción de la AAO con *p*-nitrobenzaldehído ($^{D_2O}k_{red}$ de 1.5) sugiere un mecanismo de transferencia de hidruro concertado para la oxidación de los *gem*-dioles, similar al descrito durante su reducción con alcohol *p*-metoxibencílico y 2,4-hexadien-1-ol (Ferreira *et al.*, 2009). Este mecanismo contrasta con el secuencial descrito para la colina oxidada que implica la activación previa del alcohol a alcóxido, y en el que no se detectó ningún efecto isotópico del solvente (Fan y Gadda, 2005; Gadda, 2008).

La sustitución de la Tyr92, localizada sobre el anillo de flavina (Figura 9), por un residuo de fenilalanina no afectó severamente a la oxidación del *p*-nitrobenzaldehído, en concordancia con estudios previos (Ferreira *et al.*, 2006). Sin embargo, la variante Y92F presentó una k_{cat} 5 veces menor respecto a la enzima nativa durante la oxidación del *p*-anisaldehído,

sugiriendo que el grupo hidroxilo del fenol de la tirosina tiene algún efecto en la activación de los aldehídos que no se hidratan espontáneamente. Alternativamente, la Tyr92 podría promover la oxidación de las formas *gem*-diólicas minoritarias, no detectadas por $^1\text{H-NMR}$. Ambas hipótesis alternativas (oxidación de pequeñas fracciones molares de *gem*-dioles preformados o hidratación de aldehídos asistida por la enzima) se han propuesto para explicar la oxidación de los aldehídos por ciertas alcohol deshidrogenasas (Olson *et al.*, 1996; Winberg y McKinley-McKee, 1998) e histidinol deshidrogenasas (Barbosa *et al.*, 2002).

4.3 La AAO es una oxidasa versátil que proporciona peróxido para la biodegradación de la lignina

Una diferencia entre la AAO y otras oxidasas/deshidrogenasas que catalizan la oxidación de alcoholes a ácidos, concierne su capacidad de liberar eventualmente los aldehídos intermedios de la reacción. En la reacción de conversión de colina en glicina-betaina catalizada por la colina oxidasa, el intermediario de tipo aldehído no es liberado del centro activo de esta oxidasa bajo condiciones fisiológicas (a pesar de que la enzima es capaz de oxidarlo cuando es añadido externamente) (Gadda, 2003). Lo mismo ocurre en la reacción de la histidinol deshidrogenasa (Barbosa *et al.*, 2002). Sin embargo, el papel fisiológico de la AAO es la generación de H_2O_2 extracelular, en un doble ciclo redox (alcohol \leftrightarrow aldehído y aldehído \leftrightarrow ácido), donde los productos de oxidación no son incorporados a rutas metabólicas, sino que son reducidos de nuevo por deshidrogenasas asociadas a micelio, para mantener la producción continua del peróxido requerido para la biodegradación de la lignina (Guillén y Evans, 1994; Guillén *et al.*, 1994). Es interesante que los basidiomicetos productores de AAO, generalmente especies de *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Guillén *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 2009), sintetizan además compuestos aromáticos metoxilados y halogenados, que pueden ser detectados en el medio extracelular (como alcoholes, aldehídos y/o ácidos) (Gutiérrez *et al.*, 1994; de Jong *et al.*, 1994b). Los alcoholes *p*-metoxibencílico y 3-cloro-*p*-metoxibencílico están entre los metabolitos más abundantes en *Pleurotus* (Gutiérrez *et al.*, 1994) y *Bjerkandera* (de Jong *et al.*, 1992; Spinnler *et al.*, 1994), respectivamente. Por otro lado, a pesar de la extensa producción de compuestos haloaromáticos (de Jong y Field, 1997), algunos compuestos nitro-aromáticos son sintetizados por basidiomicetos, concretamente, se ha descrito la biosíntesis del *p*-nitrobenzaldehído (Thaller y Turner, 1972) y recientemente se ha encontrado el ácido *p*-nitrosalicílico en cultivos de *Pleurotus* (Giovanni Sannia, comunicación personal). Parece que la AAO ha evolucionado para utilizar diferentes metabolitos bencílicos sustituidos para producir H_2O_2 . Dependiendo del compuesto disponible, la AAO se

comporta básicamente como una alcohol oxidasa (en presencia de metabolitos metoxibencílicos o veratrílicos), o como una aldehído deshidrogenasa (en presencia de metabolitos *p*-nitrobenzílicos), e incluso es capaz de catalizar reacciones de oxidación mediadas por un total de cuatro electrones como una oxidasa doble transformando los alcoholes a los ácidos correspondientes (en presencia de metabolitos tipo 3-cloro-*p*-metoxibencílico) (reacciones mostradas en la **Figuras 1A y B**). Esta versatilidad de sustrato capacita a la AAO para producir la mayor cantidad posible de H₂O₂ para la biodegradación de la lignina bajo cualquier condición fisiológica o ambiental.

En el presente estudio se ha caracterizado la actividad aldehído oxidasa de la AAO combinando diferentes técnicas cinéticas y cromatográficas. Se ha observado que la actividad aldehído oxidasa se correlaciona con la tasa de hidratación del los aldehídos (y la formación de los correspondientes *gem*-dioles), que está favorecida por la presencia de sustituyentes aceptores de electrones en el sustrato, tal y como se ha observado mediante ¹H-NMR. El mecanismo de oxidación de los aldehídos sería análogo al descrito para la oxidación de alcoholes, con la semi-reacción de reducción consistente en la abstracción concertada de un protón de la forma *gem*-diol por una base catalítica (His502 o His546) y la transferencia de un hidruro desde el carbono- α al N5 de la flavina. La doble actividad de la AAO como alcohol y aldehído oxidasa contribuye a la producción continua de H₂O₂ durante la biodegradación de la lignina.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa, J.A.R.G., Sivaraman, J., Li, Y.G., Larocque, R., Matte, A., Schrag, J.D. y Cygler, M. (2002) Mechanism of action and NAD(+)-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1859-1864.
- Corbier, C., Della, S.F. y Branlant, G. (1992) A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. Biochemistry 31: 12532-12535.
- Cullen, D. y Kersten, P.J. (2004) Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology. (Eds.: Brambl, R. y Marzluf, G.A.), Springer, Berlin, pp. 249-273.
- de Jong, E. y Field, J.A. (1997) Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by basidiomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 51:375-414: 375-414.
- de Jong, E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994a) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Rev. 13: 153-188.

- de Jong, E., Field, J.A., Dings, J.A.F.M., Wijnberg, J.B.P.A. y de Bont, J.A.M. (1992) De novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Formation of 3-chloro-anisaldehyde from glucose. FEBS Lett. 305: 220-224.
- de Jong, E., Field, J.A., Spinnler, H.E., Wijnberg, J.B.P.A. y de Bont, J.A.M. (1994b) Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 60: 264-270.
- Eisses, K.T. (1989) On the oxidation of aldehydes by alcohol-dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* - Evidence for the *gem*-diol as the reacting substrate. Bioorg. Chem. 17: 268-274.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005) On the catalytic mechanism of choline oxidase. J. Am. Chem. Soc. 127: 2067-2074.
- Fan, F., Germann, M.W. y Gadda, G. (2006) Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. Biochemistry 45: 1979-1986.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. J. Biol. Chem. 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. Biochem. J. 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. FEBS J. 273: 4878-4888.
- Gadda, G. (2003) Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. Biochim. Biophys. Acta 1646: 112-118.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. Biochemistry 47: 13745-13753.

- Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H.-E. y Brunerie, P. (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. *Mycol. Res.* 94: 494-504.
- Garattini, E., Fratelli, M. y Terao, M. (2008) Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 1019-1048.
- Ge, X., Penney, L.C., van de Rijn, I. y Tanner, M.E. (2004) Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 271: 14-22.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209: 603-611.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 465-470.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Hassan-Abdallah, A., Bruckner, R.C., Zhao, G.H. y Jorns, M.S. (2005) Biosynthesis of covalently bound flavin: Isolation and in vitro flavinylation of the monomeric sarcosine oxidase apoprotein. *Biochemistry* 44: 6452-6462.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, M.J., Romero, A. y Martínez, A.T. (2008) Discriminating the role of His502 and His546 in the catalysis of aryl-alcohol oxidase. En: *Flavins and flavoproteins 2008*. (Eds.: Frago, S., Gómez-Moreno, C. y Medina, M.), Prensas Universitarias, Zaragoza, pp. 303-308.
- Marchal, S. y Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38: 12950-12958.

- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009a) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D.S., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuña, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R. y Cullen, D. (2009b) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.
- Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. y Rokhsar, D. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22: 695-700.
- Medina, M., Martínez-Julvez, M., Hurley, J.K., Tollin, G. y Gómez-Moreno, C. (1998) Involvement of glutamic acid 301 in the catalytic mechanism of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119. *Biochemistry* 37: 2715-2728.
- Olson, L.P., Luo, J., Almarsson, O. y Bruice, T.C. (1996) Mechanism of aldehyde oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 35: 9782-9791.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.

- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Sancho, J. y Gómez-Moreno, C. (1991) Interaction of ferredoxin-NADP+ reductase from *Anabaena* with its substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 231-238.
- Spinnler, H.E., de Jong, E., Mauvais, G., Semon, E. y Le Quéré, J.-L. (1994) Production of halogenated compounds by *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 212-221.
- Teng, H., Segura, E. y Grubmeyer, C. (1993) Conserved cysteine residues of histidinol dehydrogenase are not involved in catalysis - Novel chemistry required for enzymatic aldehyde oxidation. *J. Biol. Chem.* 268: 14182-14188.
- Thaller, V. y Turner, J.L. (1972) Natural acetylenes. Part XXXV. Polyacetylenic acid and benzenoid metabolites from cultures of the fungus *Lepista diemii* Singer. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1.2032-2034.
- Varela, E., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 107-113.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Wagner, M.A. y Jorns, M.S. (2000) Monomeric sarcosine oxidase: 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry* 39: 8825-8829.
- Winberg, J.O. y McKinley-McKee, J.S. (1998) *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase: mechanism of aldehyde oxidation and dismutation. *Biochem. J.* 329: 561-570.

CAPÍTULO 6

Modulación de la reactividad del O₂ en una flavoenzima fúngica: implicación de la Phe501 de la aril-alcohol oxidasa contigua a la histidina catalítica*

Resumen. La aril-alcohol oxidasa (AAO) es una flavoenzima responsable de la activación del O₂ a H₂O₂ durante la degradación fúngica de la lignina. Su estructura cristalográfica muestra que el centro activo (encerrado dentro de la estructura de la AAO) está conectado con el solvente a través de un canal hidrofóbico con forma de embudo, donde la Phe501 y otros dos residuos aromáticos forman un estrecho cuello de botella que impide el acceso directo de los sustratos reductores (alcoholes). Sin embargo, las simulaciones de difusión de ligando han mostrado que el O₂ accede al centro activo a través de este canal. Estudios de mutagénesis dirigida de la Phe501 dieron lugar a la variante F501A con una reactividad reducida frente al O₂. Por contra, su sustitución por triptófano dio lugar a una variante más reactiva frente al O₂, tal y como muestran las constantes cinéticas y el grado de oxidación del cofactor durante el estado estacionario. El incremento en la eficiencia catalítica frente al O₂, ~2 veces respecto a la AAO nativa y ~120 veces respecto a la variante F501A, está relacionado con una mayor afinidad frente al O₂, ya que la tasa de recambio sólo está ligeramente afectada respecto a la enzima nativa. Las simulaciones de difusión libre del O₂ dentro de la cavidad del centro activo de la AAO (y las variantes *in silico* de la Phe501), dieron lugar a un 60% de la población de moléculas de O₂ a 3-4 Å del C4a de la flavina en la variante F501W, frente al 44% en la AAO nativa y sólo el 14% en la variante F501A. Paradójicamente, la reactividad de la AAO frente al O₂ se ve reducida cuando se ensancha el canal de acceso, y se incrementa cuando se reduce a través de la introducción de un residuo de triptófano. Esto se debe a que la cadena lateral de la Phe501, contiguo a la histidina catalítica (His502), ayuda al posicionamiento del O₂ en las proximidades del C4a de la flavina (y el Nε de la histidina). La sustitución de esta fenilalanina por un residuo voluminoso, como el triptófano, produce el incremento de la reactividad frente al O₂ de esta flavoenzima.

*Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V., y Martínez, A.T. (2011) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. J. Biol. Chem. 286, 47:41105-41114

1. INTRODUCCIÓN

La degradación de la madera y otros residuos lignocelulósicos es un paso clave para el reciclado del carbono fijado por fotosíntesis, y además representa un aspecto clave para el empleo industrial de la biomasa renovable para la producción sostenible de combustibles, materiales derivados y productos químicos (Ragauskas *et al.*, 2006). Dos tipos de hongos basidiomicetos, los denominados hongos de podredumbre blanca y parda, son los únicos organismos vivos capaces de degradar eficientemente los materiales lignificados altamente recalcitrantes (Martínez *et al.*, 2005). La activación del O₂ molecular a peróxido de hidrógeno por oxidasas extracelulares representa un paso común en ambos patrones de degradación, tal y como se ha visto a través de evidencias bioquímicas (Martínez *et al.*, 2005; Baldrian y Valaskova, 2008) y genómicas (Martínez *et al.*, 2004; 2009b). Los hongos de podredumbre parda reducen el peróxido mediante el ión ferroso produciendo el radical hidroxilo que depolimeriza la celulosa, dando lugar a un residuo enriquecido en lignina. Por el contrario, la estrategia empleada por los hongos de podredumbre blanca se basa en la activación por peróxido de hemo-peroxidasas fúngicas de alto potencial redox que depolimerizan la lignina dando lugar a un residuo enriquecido en celulosa (Martínez *et al.*, 2011). Debido a su interés biotecnológico, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de ataque enzimático a la lignina en este último grupo de hongos (Hammel y Cullen, 2008; Martínez *et al.*, 2009a).

La aril-alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7) es una flavoenzima de la superfamilia de oxidorreductasas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas) responsable de la activación del O₂ en hongos de podredumbre blanca, junto a la metanol oxidasa y la piranosa-2 oxidasa (otras dos oxidorreductasas GMC) y la glioxal oxidasa (una oxidasa de tipo cobre-radical) entre otras enzimas (Kersten y Cullen, 2007; Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). La AAO se ha encontrado en hongos de los géneros *Pleurotus* (Bourbonnais y Paice, 1988; Guillén *et al.*, 1990) y *Bjerkandera* (Muheim *et al.*, 1990). La enzima de *Pleurotus eryngii*, una especie que degrada la lignina selectivamente (Martínez *et al.*, 1994), ha sido la más intensamente estudiada (Varela *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2005; 2006). Los hongos anteriores secretan además metabolitos bencílicos 4-metoxilados (Gutiérrez *et al.*, 1994) y 3-clorado-4-metoxilados (de Jong *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1994) que dan lugar a un ciclo-redox por la acción de la AAO y deshidrogenasas (de aldehídos y ácidos) asociadas a micelio (Guillén y Evans, 1994). Esto da lugar a una producción continua de H₂O₂ extracelular como sustrato de las peroxidasas, como la peroxidasa versátil producida por este hongo (Martínez, 2002; Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009).

Los primeros estudios estructura-función de la AAO de *P. eryngii* fueron llevados a cabo tras el modelado estructural por homología (Varela *et al.*, 2000). Más recientemente, se ha publicado la estructura cristalográfica de la AAO, mostrando dos motivos estructurales únicos que limitan el acceso de los sustratos al centro activo (Fernández *et al.*, 2009). El mecanismo de oxidación de alcoholes aromáticos y alifáticos poliinsaturados (con un hidroxilo primario conjugado) se ha estudiado empleando cinéticas de estado estacionario y transitorio en combinación con efectos isotópicos cinéticos del sustrato y del solvente (Ferreira *et al.*, 2009) y su capacidad de oxidar aldehídos aromáticos (tras su hidratación dando lugar a *gem*-dioles) se ha demostrado recientemente (Ferreira *et al.*, 2010). El mecanismo es similar al propuesto para otras oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008), donde la oxidación del alcohol tiene lugar a través de una transferencia de hidruro a la flavina ayudada por una base catalítica (His502 en la AAO de *P. eryngii*). Sin embargo la transferencia de hidruro y protón en la AAO es concertada y no se forma un intermediario alcóxido estable (Hernández-Ortega *et al.*, 2011). El mecanismo de reducción de O₂ en el centro activo de las oxidorreductasas GMC no se ha comprendido de forma definitiva (Massey, 1994; Roth y Klinman, 2003; Mattevi, 2006; Klinman, 2007). El acceso del O₂ al centro activo de las flavoenzimas se ha estudiado recientemente (Chen *et al.*, 2008; Piubelli *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2009; Saam *et al.*, 2010). Sin embargo, sólo se han llevado a cabo estudios preliminares sobre la reactividad de la AAO frente al O₂ (Hernández-Ortega *et al.*, 2008), a pesar de que el papel fisiológico (medioambiental) de esta enzima es la activación del O₂ durante la biodegradación de la lignina.

En el presente estudio, en primer lugar, se utilizó la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) para investigar el acceso del O₂ al centro activo empleando el algoritmo *PELE* (*Protein Energy Landscape Exploration*) para simular la difusión de ligando (Borrelli *et al.*, 2005). En segundo lugar, se llevaron a cabo estudios de mutagénesis dirigida (basados en la caracterización de la variantes obtenidas mediante cinéticas de estado estacionario y transitorio, y ensayos de *turnover*), en combinación con cálculos computacionales (a través de la difusión libre del O₂, mediante *PELE*, dentro de la cavidad del centro activo de la AAO nativa y sus variantes mutadas *in silico*), para demostrar el papel clave de la Phe501 ayudando al O₂ a alcanzar una posición catalítica cerca del C4a de la flavina, implicado en su reducción (Mattevi, 2006), y el Ne de la His502 contigua, implicada en las semi-reacciones de reducción y oxidación (Hernández-Ortega *et al.*, 2008).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzima nativa y variantes mutadas

La AAO recombinante de *P. eryngii* fue obtenida mediante expresión heteróloga del cDNA que codifica para la proteína madura en la cepa W3110 de *E. coli* (GenBank™ AF064069). La proteína producida en forma insoluble, fue replegada *in vitro* en presencia del cofactor, y purificada a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico, según el protocolo descrito por Ruiz-Dueñas et al. (2006). Las variantes de la AAO, fueron preparadas mediante PCR utilizando el kit comercial *QuikChange site-directed mutagenesis* (Stratagene). El cDNA de la AAO clonado en el vector pFLAG1 fue empleado como molde y los siguientes oligonucleótidos, incluyendo las mutaciones (subrayadas) en los correspondientes tripletes (negrita) fueron usados como cebadores (se muestran solamente las secuencias directas): i) F501A, 5'-CAACGCCAA CACGATTGCCCACCCAGTTGGAACG-3'; ii) F501Y, 5'-CAACGCCA ACACGATTTACCACCCAGTTGGAACG-3'; iii) F501W, 5'-CAACGC CAACACGATTTGGCACCCAGTTGGAACG-3'. Los plásmidos mutados fueron aislados y el cDNA secuenciado (Secuenciador GS-FLX Roche) para confirmar las mutaciones introducidas. Las variantes fueron producidas como se indica arriba para la AAO nativa. Las concentraciones de enzima fueron determinadas empleando los coeficientes de extinción molar de la AAO y sus variantes F501A, F501Y y F501W (ϵ_{463} 11050, 10389, 10729 y 9944 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, respectivamente) estimadas mediante desnaturalización térmica, como se describe a continuación. La muestra de enzima (10-15 μM) se disuelve en tampón fosfato 0.01 M, pH 6, y se registra la absorbancia a 463 nm. A continuación se incuba durante 5 min a 100 °C, y posteriormente se centrifuga para eliminar la proteína desplegada. Se recupera el sobrenadante, y se estima la concentración de FAD libre empleando el valor ϵ_{450} de 11300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (Macheroux, 1999).

2.2 Cinéticas de estado estacionario

Las actividades enzimáticas en estado estacionario se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Sigma-Aldrich) a *p*-anisaldehído (ϵ_{285} 16950 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) (Ferreira *et al.*, 2005). Las constantes cinéticas máximas en estado estacionario para la enzima nativa y sus variantes fueron determinadas mediante cinéticas bisustrato en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C, variando simultáneamente las concentraciones de alcohol (en el rango 10-2000 μM) y O₂ (concentraciones finales 61, 152, 319, 668 y 1520 μM obtenidas mediante burbujeo del tampón con diferentes mezclas comerciales de O₂/N₂ durante

15 min). Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el ajuste de las velocidades iniciales (k_{obs}) para distintas concentraciones de alcohol a la ecuaciones 1 o 2 (según la calidad del ajuste) que describen un mecanismo de tipo ternario o un mecanismo ping-pong, respectivamente. En estas ecuaciones, e representa la concentración de enzima; k_{cat} es la constante catalítica; S es la concentración de alcohol; B es la concentración de O_2 ; $K_{\text{m(Al)}}$ y $K_{\text{m(Ox)}}$ son las constantes de Michaelis para S y B , respectivamente; y K_{d} es la constante de disociación de S .

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{\text{cat}}SB}{K_{\text{m(Ox)}}S + K_{\text{m(Al)}}B + SB + K_{\text{d}}K_{\text{m(Ox)}}} \quad \text{Ec.1}$$

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{\text{cat}}SB}{K_{\text{m(Ox)}}S + K_{\text{m(Al)}}B + SB} \quad \text{Ec. 2}$$

2.3 Medidas de estado transitorio

Para los estudios cinéticos de estado transitorio, se utilizó un equipo de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX17.MV (Applied Photophysics) usando un detector de longitud de onda fija y de diodos (350-900 nm) y los programas SX18.MV y Xscan respectivamente.

Las semi-reacciones de reducción fueron estudiadas en anaerobiosis. Las soluciones del sustrato y la enzima se prepararon por separado en tonómetros de vidrio, eliminando el oxígeno mediante ciclos sucesivos de vacío y argón. Para garantizar las condiciones de anaerobiosis durante las medidas, antes de conectar los tonómetros a las jeringas del sistema se les adicionó una solución de glucosa oxidasa ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) y glucosa (10 mM). La anaerobiosis del equipo de mezcla rápida con flujo detenido se consiguió con una solución anaeróbica saturada de ditionito y posteriores lavados del sistema con el tampón anterior en anaerobiosis (Fraaije y van Berkel, 1997). Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C. El estudio cinético de la evolución espectral durante la reducción de las enzimas se realizó mediante análisis global y ajustes a un modelo cinético $A \rightarrow B$ utilizando el programa de análisis *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd.), siendo A y B las especies espectrales correspondientes a las formas oxidada y reducida. Este modelo es equivalente a la ecuación monoexponencial utilizada para realizar el análisis cinético de la evolución de la reacción a una longitud de onda (462 nm). Los valores de k_{obs} fueron ajustados posteriormente a la ecuación 3, donde k_{red} y K_{d} son las constantes de reducción y disociación, respectivamente.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{red}}S}{K_{\text{d}} + S} \quad \text{Ec. 3}$$

Las reacciones de oxidación fueron estudiadas en el mismo dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido. Las constantes observadas fueron en este caso determinadas a partir del incremento de absorbancia a 462 nm (a 12 °C), resultado de la mezcla de la enzima reducida en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, en anaerobiosis, con el mismo tampón equilibrado a diferentes concentraciones de O₂ (mediante burbujeo de diferentes mezclas de O₂/N₂ durante 15 min). Previamente, las muestras de AAO fueron reducidas en anaerobiosis, empleando un tonómetro modificado con un brazo lateral que contenía una solución de alcohol *p*-metoxibencílico, con una relación molar alcohol/AAO de 1.1:1.0 tras mezclar ambos. Las evoluciones espectrales fueron ajustadas a un modelo de un solo paso (A→B), como se ha descrito antes, o un modelo de dos pasos (A→B→C). Las constantes de estado transitorio de segundo orden para la reoxidación de la flavina fueron estimadas empleando la ecuación 4, donde la k_{obs} es la constante observada para la reoxidación de la flavina a cualquier concentración dada de O₂, y $k_{\text{ox}}^{\text{app}}$ es la constante aparente de segundo orden.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{ox}}^{\text{app}} [\text{O}_2] \quad \text{Ec. 4}$$

Para los experimentos de *turnover* se monitorizó la evolución del estado redox del cofactor de flavina a través del espectro de absorción de la enzima (Gibson *et al.*, 1964), tras mezclar las soluciones de la enzima y el sustrato (a concentración atmosférica de oxígeno) en un dispositivo de flujo detenido.

2.4 Exploración dinámica de proteína y ligando

La estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) se preparó empleando la aplicación correspondiente de la suite de programas *Maestro* (Schrödinger Inc, 2011b). Se añadieron los átomos de hidrógeno al sistema, y las cadenas laterales ionizables se protonaron asumiendo un pH de 7.4. Posteriormente, se utilizó el programa *SiteMap* (Halgren, 2007) para identificar cualquier cavidad donde pudieran unirse los ligandos y el programa *GLIDE* (Friesner *et al.*, 2004) para localizar los sitios de acoplamiento (*docking*) más favorables. Se obtuvieron los potenciales electrostáticos adecuados para las cargas del alcohol *p*-metoxibencílico mediante optimización cuanto-mecánica, empleando la teoría del funcional de densidad (DFT): el híbrido B3LYP junto al set básico 6-31G* disponible en *Jaguar* (Schrödinger Inc, 2011a). Posteriormente se utilizó el programa *PELE* para estudiar la migración de ligando (Borrelli *et al.*, 2005). Este programa combina una aproximación estocástica dirigida con métodos de predicción estructural, capaces de proyectar la migración dinámica de ligandos en proteínas (Guallar *et al.*, 2009; Borrelli *et al.*, 2010).

Las simulaciones se realizaron empleando la enzima nativa y las variantes de Phe501 tras su mutagénesis *in silico* por tirosina, triptófano y alanina. Los ligandos, alcohol *p*-metoxibencílico y O₂, fueron colocados sobre la superficie de la proteína en los lugares previamente determinados. Se realizaron varias simulaciones, donde los ligandos fueron migrados hacia el *locus* C4a-N5 de la flavina. Esto se realizó empleando múltiples procesadores que comparten la información de la coordenada de reacción. Para una descripción más extensa sobre el método *PELE* consultar el trabajo de Borreli et al. (2005). De esta forma se han podido identificar las posibles rutas de migración hacia el centro activo de ambos ligandos. Además, se simuló con *PELE* la difusión libre del O₂ dentro del centro activo para todas las estructuras. Para estas simulaciones se tomó como estructura inicial aquella obtenida en las simulaciones anteriores donde el O₂ quedaba dentro del centro activo. Posteriormente, se permitió al O₂ moverse libremente dentro del centro activo, empleando pequeñas perturbaciones para evitar la salida del ligando.

3. RESULTADOS

3.1 Difusión del sustrato al centro activo de la AAO

En la **Figura 1** se muestra el cofactor FAD en el centro de la estructura de la AAO, y el canal hidrofóbico con forma de embudo que conecta el solvente con la pequeña cavidad del centro activo, situada frente a la parte superior del cofactor. Los dos residuos de histidina conservados (His502 e His546) orientan sus cadenas laterales hacia la cavidad anterior. El acceso al canal está restringido por un cuello de botella formado por la Phe501 y otros dos residuos aromáticos (Tyr92 y Phe397). El resultado de la migración al centro activo del sustrato reductor de la AAO (alcohol *p*-metoxibencílico) y del oxidante (O₂) desde la entrada del canal (identificada mediante *SiteMap*), obtenido con *PELE*, difirió sustancialmente para cada uno de ellos.

El canal de acceso al centro activo de la AAO (**Figura 1A**) es demasiado estrecho para permitir la difusión del alcohol *p*-metoxibencílico. Para el acceso del alcohol se requiere una considerable reorganización de la cadena lateral de la Phe397, la cadena lateral con mayor movilidad respecto a los tres residuos aromáticos que forman el cuello de botella (**Figura 2A**). La cadena lateral de la Phe397 interacciona con el anillo aromático del alcohol y ambos se desplazan para permitir el acceso de este al centro activo, donde finalmente el alcohol alcanza una posición catalíticamente relevante. Esta última posición incluye el hidrógeno del grupo hidroxilo y uno de los hidrógenos del carbono- α del alcohol a una distancia de 2.4-2.5 Å del N ϵ de la His502 y del N5 de la flavina oxidada, respectivamente. Dicha

posición es consistente con el mecanismo catalítico consenso de las oxidorreductasas GMC que implica una transferencia de protón a la base catalítica (Hi502 en la AAO) y una transferencia de hidruro al cofactor de FAD (Gadda, 2008). La ruta de migración del alcohol *p*-metoxibencílico determinada mediante *PELE* se produce por encima de la cadena lateral de la Tyr92, que experimenta algunos reajustes ayudando al alcohol a alcanzar su posición final, lejos de la cadena lateral de la Phe501.

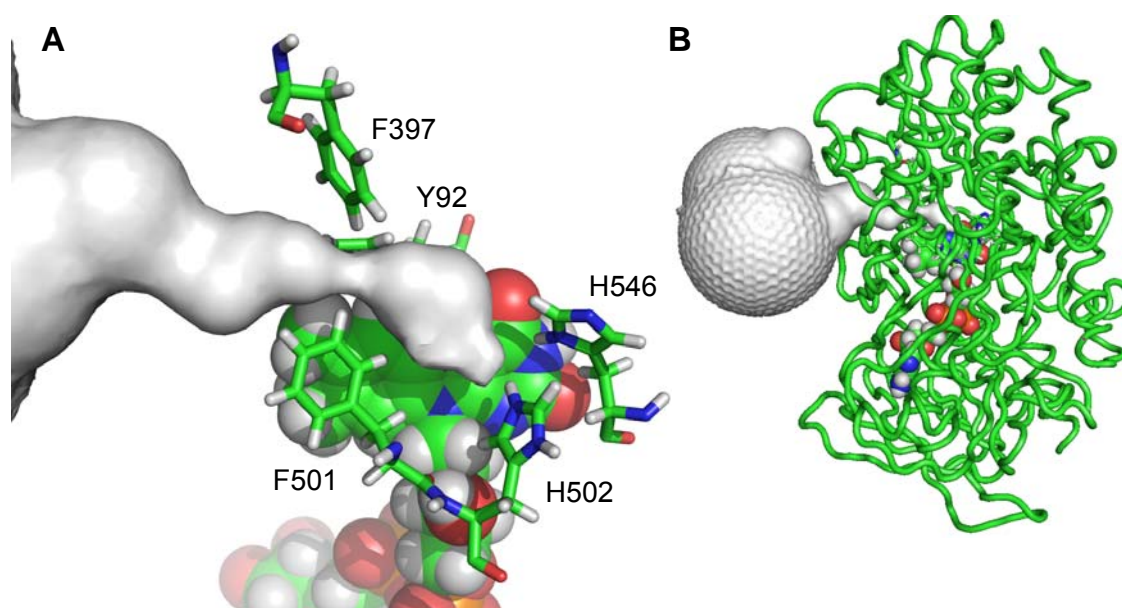


Figura 1. **Canal de acceso conectando la cavidad del centro activo de la AAO con el solvente.** (A) Detalle mostrando el cuello de botella próximo a la entrada al centro activo al que contribuyen Phe501, Phe397 y Tyr92, y posición de los residuos conservados His502 e His546 (lado *re* del anillo de flavina). (B) Cadena de carbonos- α de la AAO mostrando el cofactor de FAD aislado del solvente, y el canal de acceso al centro activo. Basado en la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM). El canal de acceso al centro activo fue determinado empleando el programa *CAVER* (2006). El cofactor se muestra como esferas de van der Waals, y los aminoácidos como barras (colores CPK).

En contraste con lo observado para el alcohol *p*-metoxibencílico, el programa *PELE* predice que el O_2 accede al centro activo de la AAO reducida siguiendo el canal hidrofóbico observado en la estructura cristalográfica (**Figura 1A**). Así, la ruta de migración tiene lugar próxima a la Phe501, por debajo de la Phe397, y frente a la Tyr92, cuyas cadenas laterales no sufren un desplazamiento significativo durante la primera fase de la difusión (**Figura 2B**). Una vez alcanzado el centro activo, la molécula de O_2 explora esta cavidad (como se describe posteriormente para la AAO nativa y las variantes de la Phe501) produciéndose algunos desplazamientos de la cadena lateral de la Phe397 durante esta etapa.

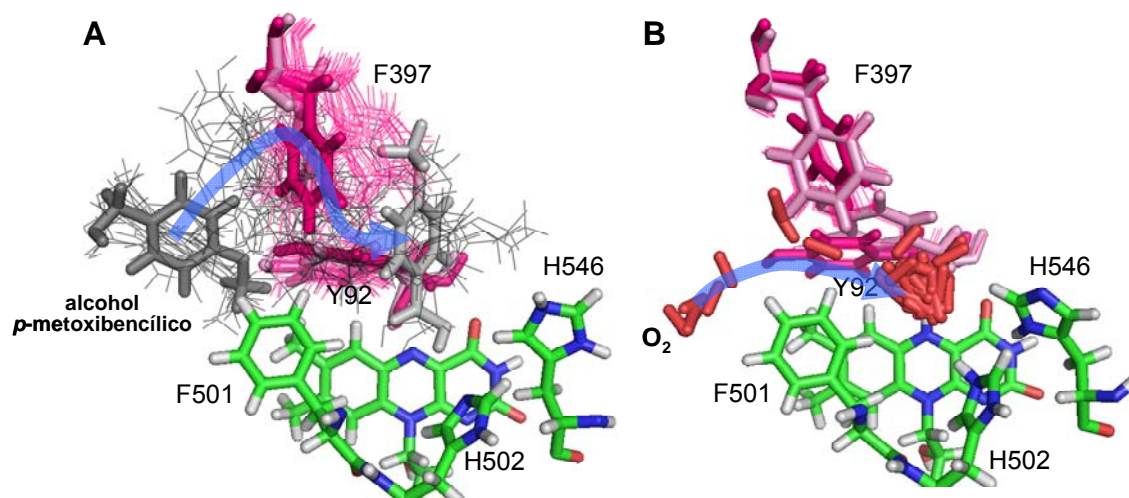


Figura 2. Comparación de las rutas de migración del sustrato oxidante y reductor al centro activo de la AAO.

(A) La entrada del alcohol *p*-metoxibencílico al centro activo requiere reajustes significativos de las cadenas laterales de la Phe397 y la Tyr92 (el alcohol en la primera y última posición se muestra como barras grises en tonos oscuros y claros, respectivamente, y como líneas grises en otros momentos de la migración). (B) El O₂ accede directamente al centro activo de la AAO sobre la cadena lateral de la Phe501. Los pequeños reajustes de las cadenas laterales se producen una vez que el O₂ está dentro del centro activo (se muestra el O₂ como barras rojas). Las migraciones de los sustratos se realizaron utilizando el programa *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005) y la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM). Las rutas de migración del alcohol y el O₂ se indican mediante flechas azules. Los residuos Phe397 y Tyr92 en la primera y última posición se muestran como barras en color magenta y rosa, respectivamente, mientras que en el resto de posiciones se muestra como líneas magenta. Los residuos His502, His546 y Phe501, y el cofactor de FAD se muestran como barras en colores CPK.

En la **Figura 3** se muestra una posición del O₂ catalíticamente relevante para la reoxidación de la flavina. En esta posición los átomos de O₂ están a una distancia de 2.5 Å y 3.7 Å, respectivamente, del Hε de la His502 y el C4a de la flavina reducida, ambos implicados en la reducción del O₂, y a 2.8 Å del átomo de hidrógeno de la cadena lateral de la Phe501 más próximo, cuya contribución a la semi-reacción de oxidación se discute más adelante.

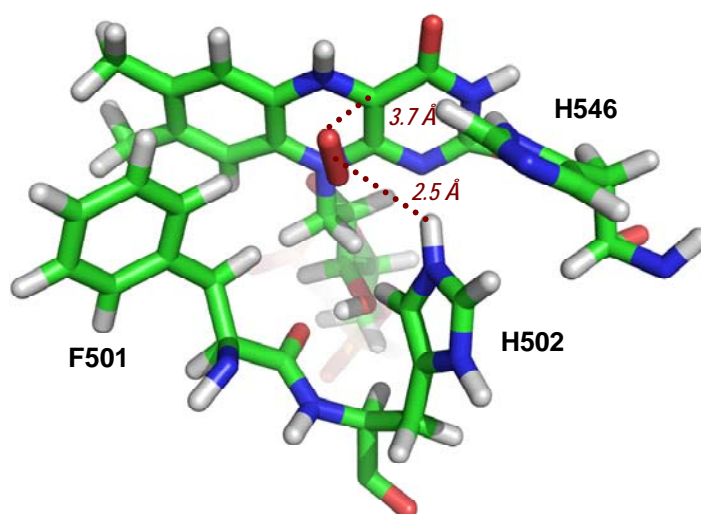


Figura 3. **Localización del O₂ en el centro activo de la AAO**. Tras la migración del O₂ desde el solvente al centro activo de la AAO reducida, empleando el programa *PELE*, el O₂ adopta una posición catalíticamente relevante cerca del C4a de la flavina y el H ϵ de la His502 protonada (se muestran todos los elementos como barras en colores CPK). Obtenido empleando *PELE* y la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM).

3.2 Cinéticas de estado estacionario de las variantes mutadas en la Phe501

Se prepararon las diferentes variantes en el residuo Phe501 mediante mutagénesis dirigida para investigar su contribución durante la catálisis de la AAO. Los espectros de absorción de las variantes F501A, F501Y y F501W fueron característicos de la AAO, con uno de los máximos del FAD a 463 nm (**Figura 4**), lo que indicaba que estas variantes se replegaron *in vitro* y unieron el cofactor de forma correcta.

Las constantes cinéticas de estado estacionario de la enzima nativa y las tres variantes anteriores se muestran en la **Tabla 1**. Las cinéticas bisustrato permitieron determinar la tasa de recambio máxima (k_{cat}) (obtenida por extrapolación a concentración saturante de ambos sustratos), así como las constantes de Michaelis para el alcohol (Al) y el O₂ (Ox) y las correspondientes eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m). Las constantes cinéticas para el alcohol y el O₂ de la variante F501Y son sólo ligeramente diferentes respecto a la AAO nativa, indicando que la eliminación del hidroxilo fenólico en la cadena lateral de la Phe501 no afecta significativamente a la catálisis.

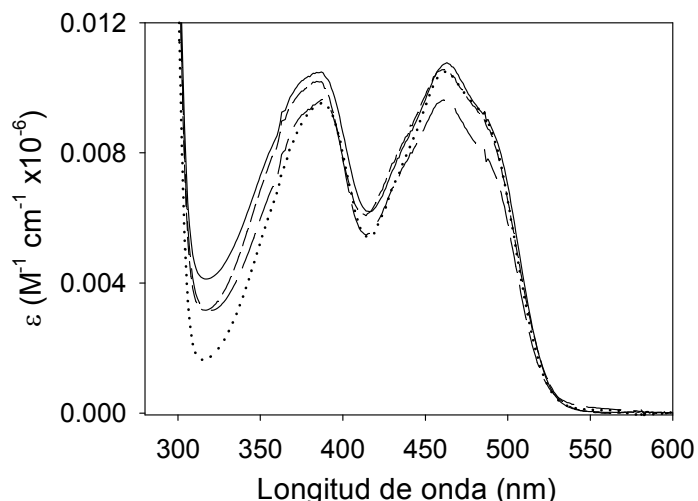


Figura 4. **Espectros de absorción molar de la enzima nativa y las variantes en la Phe501.** Se muestran los espectros de absorción molar de la AAO nativa (línea continua), y las variantes F501Y (trazos cortos), F501A (puntos) y F501W (trazos largos) en el rango 280-600 nm (tampón fosfato 0.05 M, pH 6).

Por contra, la mutación F501A dio lugar a una variante cuyas eficiencias catalíticas para el alcohol *p*-metoxibencílico (15 veces menor) y especialmente para el O₂ (70 veces menor) estaban severamente afectadas. Considerando que la tasa de recambio de la variante F501A fue 3 veces menor, podemos concluir que el mayor efecto de la mutación concierne a la unión de los sustratos (alcohol y O₂). Finalmente, la mutación F501W produjo un incremento (2 veces) de la eficiencia catalítica frente al O₂, debido al descenso de la $K_{m(Ox)}$ (~3 veces) sugiriendo un aumento de la afinidad por el O₂, en contraste con la disminución de la afinidad por el alcohol, observada tanto en estado estacionario como transitorio.

Tabla 1

Constantes de estado estacionario de la AAO nativa y las variantes en la Phe501 empleando alcohol *p*-metoxibencílico y O₂ como sustratos

	k_{cat} (s ⁻¹)	$K_{m(Al)}$ (μM)	$k_{cat}/K_{m(Al)}$ (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	$K_{m(Ox)}$ (μM)	$k_{cat}/K_{m(Ox)}$ (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
AAO	105 ± 1	29 ± 1	3620 ± 80	134 ± 3	784 ± 20
F501Y	87 ± 1	17 ± 1	5120 ± 310	180 ± 5	483 ± 13
F501W	64 ± 1	249 ± 5	257 ± 6	46 ± 2	1390 ± 50
F501A	40 ± 1	167 ± 5	240 ± 9	3600 ± 110	11 ± 0.5

Las constantes cinéticas de estado estacionario fueron determinadas variando simultáneamente las concentraciones de alcohol *p*-metoxibencílico (Al) y O₂ (Ox) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C. Las constantes observadas fueron ajustadas a las Ec. 1 o 2. Se muestran los valores medios y el error standar.

A continuación se determinó el estado redox del cofactor de la enzima nativa y las variantes Phe501 durante el *turnover*, siguiendo la reacción de la enzima oxidada en presencia del alcohol *p*-metoxibencílico a concentración atmosférica de O₂ empleando un dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido (**Figura 5A-C**). El porcentaje de enzima oxidado durante el *turnover* de la AAO nativa y las variantes se estimó a 462 nm, tal y como se muestra en la **Figura 5D**, empleando una escala de tiempo logarítmica. Tras un periodo de latencia de 4 ms, en el que la variante F501A experimenta un ligero incremento de absorbancia debido a la formación del complejo E:S (visible gracias a la lentitud de la reacción), se observa una rápida caída de la absorbancia, seguida de un periodo latencia en el que se alcanza la condición de estado estacionario. En la enzima nativa y sus variantes F501W y F501Y cerca del 75-80% de la enzima está oxidada durante este periodo (da comienzo tras ~20 ms de reacción), indicando que la semi-reacción de reducción es la etapa limitante durante la catálisis. Por el contrario, en la variante F501A la semi-reacción de oxidación es la etapa limitante, ya que sólo un 20% de la enzima está oxidada durante el periodo estacionario (que en este caso comienza tras 200 ms de reacción). En las variantes F501Y y F501W bajo condiciones de estado estacionario se observó un complejo de transferencia de carga, tal y como ocurre en la enzima nativa (Ferreira *et al.*, 2009).

3.3 Cinéticas de estado transitorio de las variantes mutadas en la Phe501

Las diferencias en las variantes de la Phe501 se investigaron también a través de la determinación de las constantes cinéticas de estado transitorio para las semi-reacciones de reducción y oxidación. En el primer caso, se hicieron reaccionar muestras de enzima oxidada con el sustrato reductor (alcohol *p*-metoxibencílico) bajo condiciones estrictas de anaerobiosis, empleando un dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido, y se siguió la evolución del espectro de absorción gracias a un detector de diodos (**Figura 6**) tal y como se ha descrito previamente para la AAO nativa (Ferreira *et al.*, 2009). Las constantes de reducción observadas (k_{obs}) fueron obtenidas a partir de los cambios en la absorbancia a 462 nm y ajustadas a la Ec. 3 para obtener las constantes de estado transitorio de la semi-reacción de reducción (k_{red} y K_{d}) (**Tabla 2**).

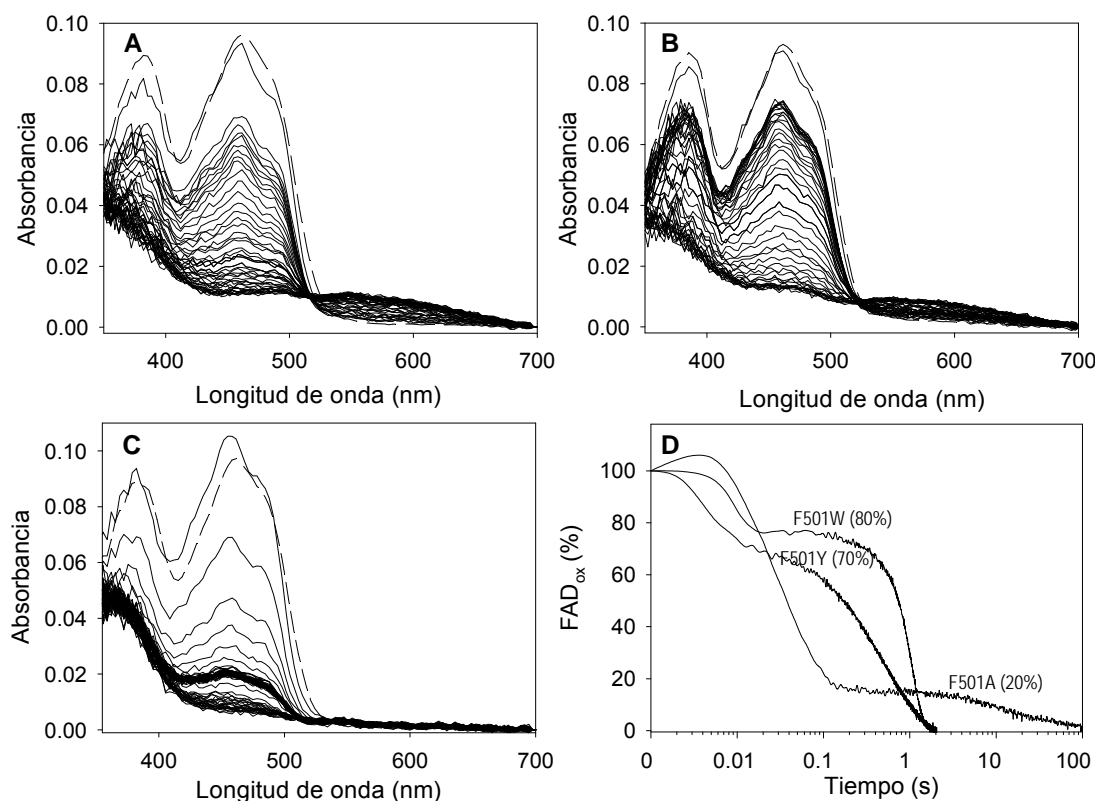


Figura 5. Cambios en el espectro de absorción durante el *turnover* de F501Y (A), F501W (B) y F501A (C) con alcohol *p*-metoxibencílico a concentración atmosférica de oxígeno, y la evolución temporal de las reacciones anteriores (D). Se hizo reaccionar en un dispositivo de flujo detenido una muestra de enzima ($\sim 10 \mu\text{M}$) con alcohol *p*-metoxibencílico (0.6 mM) en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12°C y concentración atmosférica de oxígeno. El espectro de absorción de la enzima oxidada antes de la reacción se muestra mediante una línea discontinua. El primer espectro se registró tras 2 ms de reacción. Posteriormente, se muestran los espectros de absorción cada 20 ms en el rango 1-162 ms, y cada 50 ms en el rango 0.162-2 s (y cada 5 s de 2-125 s en C). La enzima nativa y la variante F501Y (A) mostraron cambios similares en el espectro de absorción. La evolución temporal de la reacción, mostrada como el porcentaje de enzima oxidada en escala de tiempo logarítmica (D), reveló diferentes porcentajes de enzima en estado oxidado (20-80%) en condiciones de estado estacionario. Estas se alcanzaron tras diferentes tiempos de reacción, y antes del agotamiento del oxígeno de la muestra, de acuerdo con las diferentes reactividades frente al oxígeno.

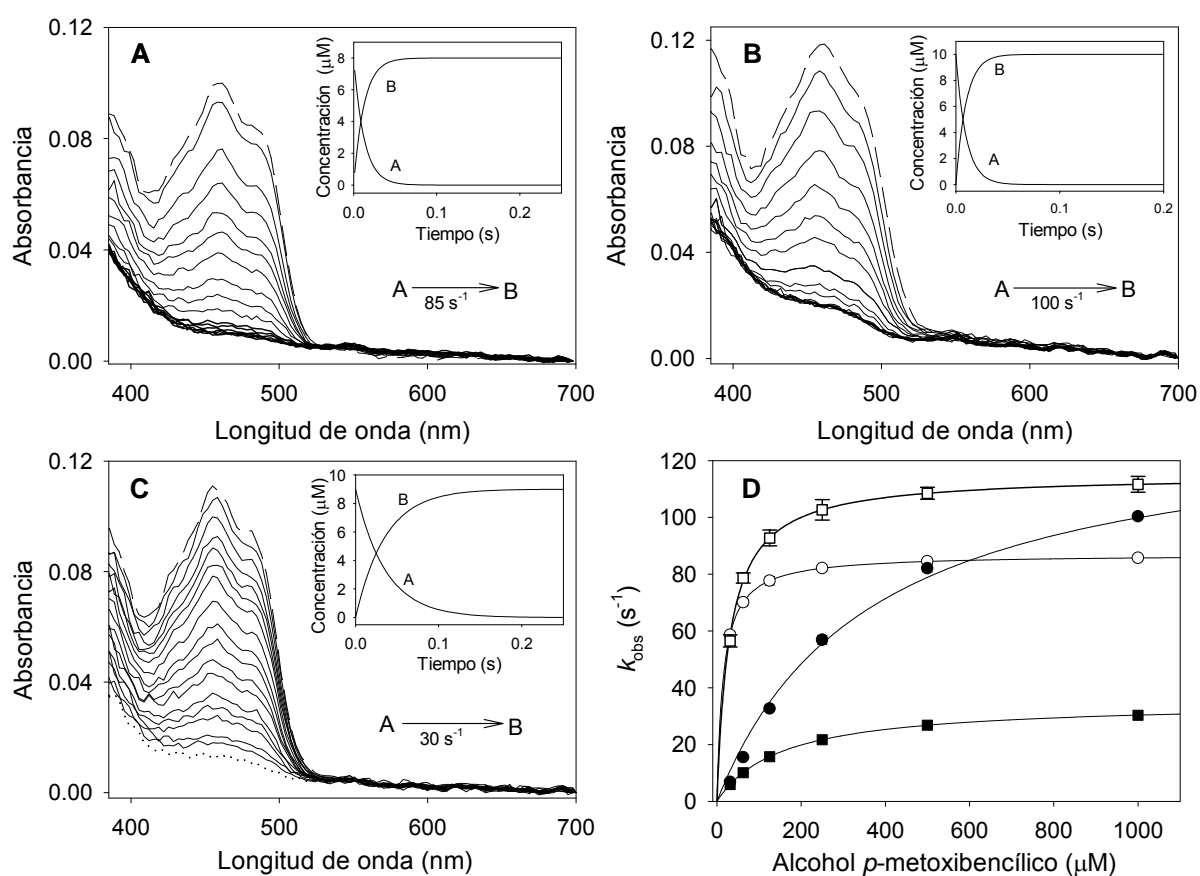


Figura 6. **Semi-reacción de reducción: cambio s en los espectros de absorción durante la reducción de las variantes F501Y (A), F501W (B) y F501A (C) de la AAO y de dependencia de las velocidades de reducción de la concentración de alcohol *p*-metoxibencílico (D).** (A-C) Los ensayos se realizaron mediante la reacción en anaerobiosis de 8-10 μM de enzima con alcohol *p*-metoxibencílico (1 mM), empleando un dispositivo de flujo detenido a 12 °C. Se muestran los espectros de absorción a diferentes tiempos de reacción (1, 4, 6, 9, 12, 14, 17, 22, 27, 32, 45, 55, 63, 70, 86, 101, 109 y 186 ms). Los cambios en el espectro de la AAO nativa (Capítulo 3) fueron similares a los de la variante F501Y (A). Los insertos muestran la evolución de la concentración de las diferentes especies espectrales obtenidas tras el ajuste global de los datos experimentales a un modelo monoexponencial ($A \rightarrow B$), donde A (línea discontinua) y B (línea de puntos, que se superponen con los tiempos finales de reacción en A y B) se corresponden con los espectros de la enzima oxidada y reducida, respectivamente. (D) Dependencia de las constantes de reducción observadas de la concentración de alcohol *p*-metoxibencílico en la enzima nativa (—□—), y sus variantes F501Y (—○—), F501W (—●—) y F501A (—■—).

Tabla 2

Parámetros de estado transitorio de la AAO nativa y las variantes de la Phe501 empleando alcohol *p*-metoxibencílico y oxígeno como sustratos

	Semi-reacción de reducción		Semi-reacción de oxidación
	$k_{\text{red}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{d}} (\mu\text{M})$	$^{\text{app}}k_{\text{ox}} (\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$
AAO	139 ± 16	26 ± 5	657 ± 30
F501Y	87 ± 1	15 ± 1	401 ± 9
F501W	136 ± 6	362 ± 45	1524 ± 1
F501A	35 ± 5	153 ± 2	8 ± 0.1

Las constantes cinéticas de estado transitorio se determinaron en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C. Las constantes observadas fueron ajustadas a las Ec. 3 y 4 para las semi-reacciones de reducción y oxidación, respectivamente. Se muestran los valores medios y el error standar.

En general, los valores de las constantes k_{red} y K_{d} de estado transitorio son similares a los valores de k_{cat} y K_{m} de estado estacionario. Sin embargo, se observó un valor doble de la k_{red} respecto a la k_{cat} en la variante F501W, sugiriendo la existencia de una etapa diferente a la de reducción que está limitando la velocidad de la reacción, probablemente relacionada con otras etapas del ciclo catalítico incluyendo la liberación del producto.

Los cambios en el espectro de absorción durante la reoxidación de las variantes Phe501 (tras su reducción en anaerobiosis en presencia del alcohol *p*-metoxibencílico) se muestran en la **Figura 7**. En la enzima nativa (datos no mostrados) y las variantes F501Y (con cambios en el espectro de absorción similares a la enzima nativa) y F501W, se ha definido un proceso de dos etapas (A→B→C), donde B corresponde a una especie espectral obtenida tras el ajuste global realizado pero que necesariamente no representa una especie intermedia distinguible durante la catálisis. Mientras, se ha definido un modelo de un solo paso (A→B) para la variante F501A cuyo significado se relaciona con la extremadamente baja reactividad frente al O₂ de esta variante. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente (Ferreira *et al.*, 2005; 2009) (no se encontró ninguna especie intermedia de tipo semiquinona de la flavina. En los tres casos donde se observaba un proceso con dos etapas (enzima nativa y variantes F501Y y F501W), la primera etapa (A→B) es la más rápida y donde tiene lugar la mayor amplitud del cambio espectral. Además, la k_{obs} para la etapa A→B (en el proceso de una y dos etapas) depende de la concentración de O₂ (**Figura 7D**), mientras que la k_{obs} de la etapa lenta (B→C) es independiente de la concentración de O₂. En ningún caso las k_{obs} mostraron una saturación a las concentraciones más altas de O₂ y, por tanto, sólo puede calcularse una constante de reoxidación aparente de segundo orden ($^{\text{app}}k_{\text{ox}}$) cuyos valores para las diferentes variantes se incluyen en la **Tabla 2**.

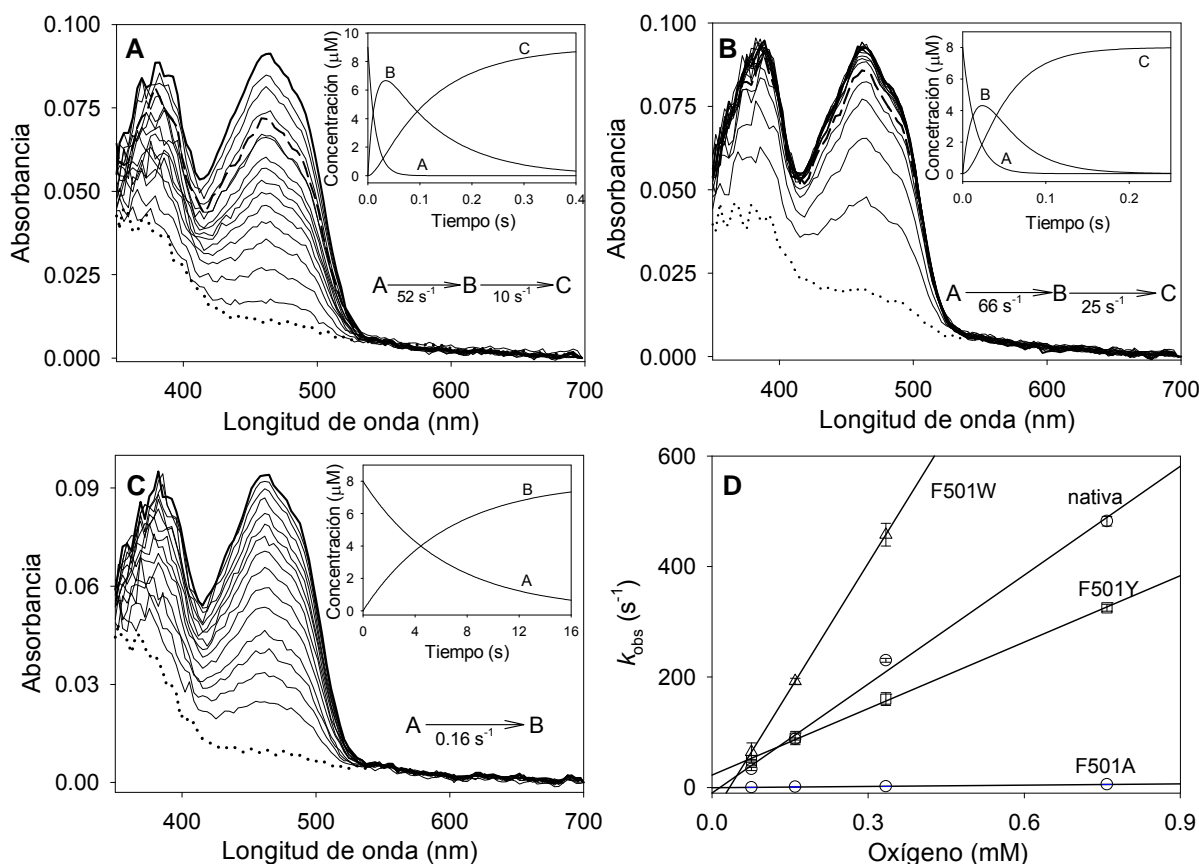


Figura 7. Semi-reacción de oxidación: cambios en el espectro de absorción durante la reacción con O_2 de las variantes F501Y (A), F501W (B) y F501A (C), y dependencia de la velocidad de reoxidación de la concentración de O_2 (D). Se siguieron los cambios en el espectro de absorción tras hacer reaccionar $\sim 18 \mu\text{M}$ de enzima reducida con una solución aeróbica ($76 \mu\text{M}$ de O_2) de tampón fosfato 0.1 M pH 6, empleando un dispositivo de mezcla rápida con flujo detenido a 12°C . Se muestran los espectros de absorción tras diferentes tiempos de reacción (2, 9, 17, 24, 32, 40, 47, 55, 63, 70, 86, 93, 109, 117, 125, 150, 175, 200 y 250 ms en A y B; y 40, 860, 1680, 2450, 3320, 4140, 5780, 6590, 7410, 8230, 9050, 10700, 12330, 13970 y 15600 ms en C). Los insertos muestran la evolución de la concentración de las diferentes especies espectrales obtenidas tras el ajuste global de los datos experimentales a un modelo mono-exponencial ($A \rightarrow B$) o biexponencial ($A \rightarrow B \rightarrow C$). Se indican los espectros donde las especies A (línea de puntos), B (línea discontinua en A y B) y C (línea gruesa superior) fueron predominantes. Los cambios en el espectro de la AAO nativa fueron similares a los de la variante F501Y (A). Para estudiar la dependencia del O_2 de la velocidad de reoxidación (D), las muestras reducidas se hicieron reaccionar con el tampón equilibrado a diferentes concentraciones de O_2 (76 , 160 , 334 y $760 \mu\text{M}$) en la mismas condiciones descritas antes, y se estimaron las tasas de reoxidación de la etapa rápida (k_{obs} correspondientes al proceso $A \rightarrow B$).

Los cambios en las constantes de reoxidación de estado transitorio confirman las tendencias observadas bajo condiciones de estado estacionario (en los valores de $k_{cat}/K_{m(Ox)}$) e indican una fuerte disminución de la $^{app}k_{ox}$ (superior a 80 veces) en la variante F501A, y un incremento (superior a 2 veces) en la variante F501W, mientras que para la variante F501Y el valor es ligeramente inferior al de la AAO nativa.

3.4 Mutaciones de la Phe501 y difusión del O₂ dentro del centro activo

Empleando el programa *PELE* se estudió la difusión libre del O₂ dentro del centro activo de la estructura cristalográfica de la AAO y sus variantes F501A, F501Y y F501W (mutadas *in silico*) buscando las diferencias en la población de O₂ tras las diferentes mutaciones. Se computaron alrededor de mil posiciones en cada caso, y se estimaron las distancias entre los átomos de la molécula de O₂ y el C4a de la flavina, distribuyendo dichas distancias en clases de frecuencia (**Figura 8**). Las frecuencias de distribución de las distancias flavina-O₂ fueron similares en la enzima nativa y la variante F50Y, aunque la distancia media fue inferior en la enzima nativa (4.1 Å comparado con 4.4 Å). Sin embargo, se obtuvieron frecuencias de distribución diferentes para las variantes F501A y F501W. La primera fue claramente bimodal (con posiciones predominantes a 4.5 y 8.1 Å) mientras que la segunda mostró un 60% de posiciones del O₂ a 3-4 Å de distancia del C4a.

4. DISCUSIÓN

4.1 Difusión del O₂ hasta el centro activo de la AAO

El centro activo de otras oxidorreductasas GMC está expuesto al solvente, tal y como se observa en la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa (Hecht *et al.*, 1993), sin embargo en estructuras diméricas existe una segunda subunidad que limita parcialmente el acceso al centro activo. La situación es similar en la estructura del tetrámero de la piranosa-2 oxidasa (Hallberg *et al.*, 2004). Por el contrario, en el monómero de la AAO el centro activo está profundamente enterrado y es inaccesible al solvente debido a la presencia de dos nuevos motivos estructurales, que están ausentes en otras enzimas relacionadas (Fernández *et al.*, 2009). El primer motivo estructural incluye dos hélices que no aparecen en la estructura de la glucosa oxidasa y la colina oxidasa, mientras que el segundo motivo sólo está presente en la colina oxidasa cuyo centro activo está menos expuesto respecto a la glucosa oxidasa, pero es más accesible que el de la AAO.

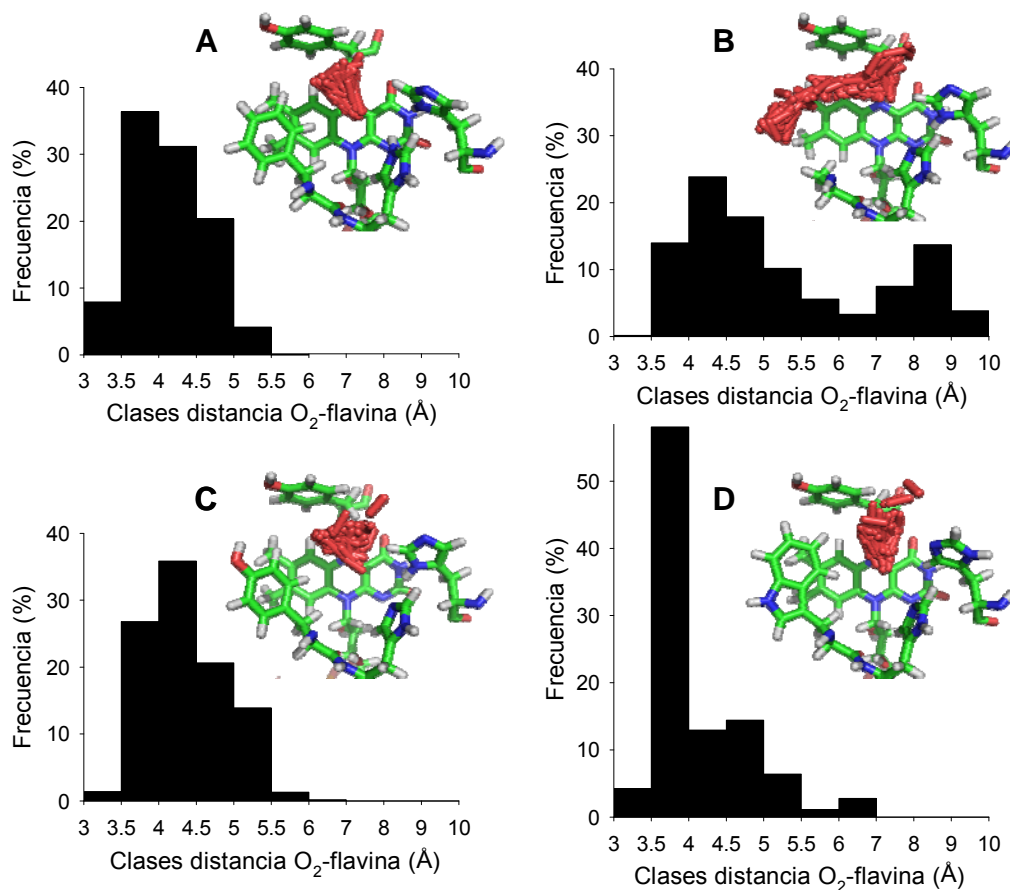


Figura 8. Distribuciones en el as de las distancias O₂-flavina tr as l a difusión del oxígeno (barras r ojas) en el centro acti vo de la AAO nativa (A) y las variantes F 501A (B), F501Y (C) y F501W (D) (obtenidas *in silico*). Se colocó la molécula de oxígeno en el centro activo cerca del C4a de la flavina y se empleó el software *PELE* para simular su difusión libre en la cavidad del centro activo (utilizando bajas temperaturas y pequeñas perturbaciones). Se estimaron las distancias entre el C4a de la flavina y los átomos de oxígeno en un millar de posiciones, los valores obtenidos se distribuyeron en diez clases de frecuencia. La distribución del oxígeno junto al anillo de flavina y los residuos Tyr92 (arriba), His546 (derecha), His502 (medio) y Phe/Ala/Tyr/Trp501 (izquierda) se muestra en las diferentes imágenes (barras en colores CPK).

Los anteriores motivos estructurales de la AAO delimitan un canal con forma de embudo, caracterizado por un estrecho cuello de botella formado por las cadenas laterales de los residuos Tyr92, Phe397 y Phe501, que limitan la difusión de los sustratos al centro activo de la AAO. Durante el acceso de los alcoholes aromáticos al centro activo, la Phe397 (homóloga a la Phe357 de la colina oxidas) juega un papel crucial interaccionando con el anillo aromático del sustrato y permitiéndole alcanzar el centro activo a través de oscilaciones de su cadena lateral, tal y como se ha descrito previamente (Hernández-Ortega *et al.*, 2011). De forma paralela, se han descrito las oscilaciones de las cadenas laterales de ciertos residuos (Phe357) durante la apertura del centro activo en la colina oxidasa (Xin *et al.*, 2009).

Las simulaciones de difusión del O₂ utilizando el programa *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005) han revelado que esta molécula diatómica difunde a través del estrecho canal, previamente descrito en la estructura cristalográfica de la AAO (Fernández *et al.*, 2009), en contraste con la difusión del alcohol que, tras reajustes de las cadenas laterales, supera el cuello de botella pasando sobre la cadena lateral de la Tyr92. Por tanto, los desplazamientos de la cadena lateral de la Phe397 no son necesarios durante la difusión del O₂, en comparación con la difusión del alcohol.

Los resultados mostrados, en donde el O₂ accede al centro activo de la AAO a través de un (estrecho) canal hidrófobo son similares a otros estudios recientes donde se describen canales específicos (únicos o múltiples) para la difusión del O₂ en la colesterol oxidasa (Chen *et al.*, 2008; Piubelli *et al.*, 2008), D-aminoácido oxidasa (Saam *et al.*, 2010) y otras flavoenzimas (Baron *et al.*, 2009), frente a la hipótesis tradicional que asume que el O₂ difunde libremente a través de las proteínas. Así mismo, en algunas de las flavoenzimas anteriores se ha descrito la existencia de residuos que actúan como puertas de acceso a los canales, como por ejemplo en la colesterol oxidasa (Coulombe *et al.*, 2001). Además, en otras flavoenzimas se ha propuesto la existencia de residuos que colectan y guían el O₂ hacia el centro activo, como en el caso de la Phe266 localizado en la entrada del centro activo de la *p*-hidroxifenilacetato hidroxilasa (Baron *et al.*, 2009).

En la D-aminoácido oxidasa, el O₂ y el sustrato reductor (aminoácido) reaccionan con el anillo de flavina en lados opuestos (*si* y *re*, respectivamente) y acceden al cofactor a través de diferentes rutas de migración (Saam *et al.*, 2010). Por contra, en la AAO (y la glucosa oxidasa) ambos sustratos oxidante y reductor ocuparían una posición casi idéntica durante la catálisis (en el lado *re* de la flavina). Sin embargo, las predicciones obtenidas con *PELE* en la AAO, han revelado que ambos sustratos únicamente comparten la parte más exterior de la ruta de entrada. Así, para el acceso de los alcoholes al centro activo se requieren

modificaciones transitorias del canal, que implican grandes oscilaciones de la cadena lateral de la Phe397, mientras que no se han observado oscilaciones significativas de las cadenas laterales durante el acceso del O₂ al centro activo (se incluye la **Película 4** en el CD adjunto a la tesis mostrando la difusión consecutiva del 2,4-hexadien-1-ol y el O₂ al centro activo de la AAO, tal como la ha mostrado el programa *PELE*). Si el producto de la primera reacción permanece unido al centro activo, cuando el O₂ llega (mecanismo ternario) se requiere cierta movilidad de la molécula de producto para permitir la reoxidación de la flavina por el O₂ (tal y como se muestra en la película).

4.2 Implicación de la Phe501 en la reoxidación de la flavina

Al eliminar o sustituir el anillo aromático de la Phe501, tienen lugar cambios significativos en las constantes cinéticas de estado estacionario y transitorio, mostrando la implicación directa de este residuo en la reoxidación de la flavina. En la variante F501A, la oxidación del alcohol estaba afectada negativamente (eficiencia ~15 veces menor) debido a un efecto en la unión del sustrato. Sin embargo, la mutación F501A produce un efecto mayor sobre la reactividad con el O₂, mostrando una disminución de 70-80 veces en las constantes cinéticas $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Ox)}}$ y $^{\text{app}}k_{\text{ox}}$. Esta severa disminución de la reactividad frente al O₂ se refleja en el menor porcentaje de enzima oxidada durante el *turnover* en estado estacionario (sólo ~20% para la variante F501A). Estos resultados, junto con la reactividad frente al O₂ que es similar en la variante F501Y y está incrementada en la variante F501W (comparada con la enzima nativa), sugieren que se requiere un residuo voluminoso en esta posición para reoxidar eficientemente el cofactor de la AAO. La presencia de un residuo aromático en esta posición también contribuye, aunque en menor medida, a la oxidación del alcohol, tal y como revela la similar eficiencia de la variante F501Y y la menor eficiencia de la variante F501A. Resulta significativo que los residuos homólogos a la Phe501 en la glucosa oxidasa y la colina oxidasa pertenecientes a la misma superfamilia de oxidorreductasas, sean dos residuos de tirosina aunque su implicación durante la reoxidación de la flavina no ha sido descrita hasta el momento.

En relación con la variante F501W, la menor reactividad frente al alcohol se debe a su menor afinidad por este sustrato (K_{d} 14 veces mayor) debido probablemente a impedimentos estéricos provocados por la cadena lateral del triptófano. Curiosamente, esta variante mostró una reactividad frente al O₂ dos veces superior (tanto en estado estacionario como transitorio) respecto a la enzima nativa, que posee de hecho una de las velocidades de reoxidación más altas descritas hasta el momento para flavooxidasa (Mattevi, 2006). Este aumento de la reactividad frente al O₂ ocurre a pesar

de que la difusión al centro activo en la variante F501W es más difícil debido a la presencia del anillo indólico de la cadena lateral. Recientemente se ha caracterizado una AAO perteneciente a otro hongo de la podredumbre blanca que posee un residuo de triptófano en la posición equivalente a la Phe501 de la AAO (Romero *et al.*, 2009; 2010) demostrando la existencia de variantes naturales con otros residuos aromáticos en esta posición.

A pesar de que se han descrito alteraciones en el potencial redox de la AAO en estudios previos de mutagénesis dirigida de la Phe501 (Munteanu *et al.*, 2008), estas variaciones (± 40 mV) no son suficientes para explicar los cambios de reactividad presentados en el presente estudio. Sin embargo, los datos cinéticos de estado estacionario y transitorio, sugieren que el incremento en la reactividad frente al O₂ en la variante F501W, y la fuerte disminución en la variante F501A, dependen en gran medida de la habilidad incrementada o disminuida de la enzima para posicionar apropiadamente el O₂ durante la semi-reacción de oxidación. Mediante simulaciones computacionales se ha estudiado la forma en la que la presencia de residuos de fenilalanina, tirosina o triptófano en la posición 501 afecta al posicionamiento del O₂ en el centro activo de la AAO, tal y como se discute a continuación.

Se han encontrado diferencias significativas en la distribución del O₂ en el centro activo utilizando *PELE*. Así, el porcentaje de los átomos de oxígeno ocupando la región a 3-4 Å del C4a de la flavina varía significativamente en la AAO nativa (44%) y las variantes F501A (14%), F501Y (28%) y F501W (61%). Esto sugiere que, una vez que el O₂ alcanza el centro activo, la voluminosa cadena lateral de los residuos en la posición 501 en la AAO nativa y sus variantes F501Y y F501W ayuda al O₂ a alcanzar una posición catalíticamente relevante frente al C4a de la flavina y el H ϵ de la His502 implicado en la reoxidación (**Figura 9**) (Hernández-Ortega *et al.*, 2008). La gran reactividad frente al O₂ en la variante F501W ($k_{ox}^{app} \sim 1500 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), está relacionada con la elevada población de átomos de O₂ a 3.5-4.0 Å del C4a de la flavina, tal y como se ha determinado mediante *PELE*.

Curiosamente, la principal diferencia entre el centro activo del flavocitocromo *b2* (PDB 1FCB) que no presenta prácticamente reactividad frente al O₂, y la glicolato oxidasa (PDB 1A17) con una elevada velocidad de reoxidación ($10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) es la presencia de un residuo de leucina en lugar de un residuo de triptófano en las proximidades de la flavina (Mattevi, 2006). Además, en la colina oxidasa se ha sugerido que la Val464, localizado a dos residuos de distancia (V464-Y465-H466) de la His466, homóloga a la His502 de la AAO, e implicada en la catálisis (Gadda, 2008; Hernández-Ortega *et al.*, 2011), proporciona un sitio apolar guiando el O₂ hacia la flavina tal y como revela la disminución de la reactividad frente al O₂ de la variante V464A (Finnegan *et al.*, 2010).

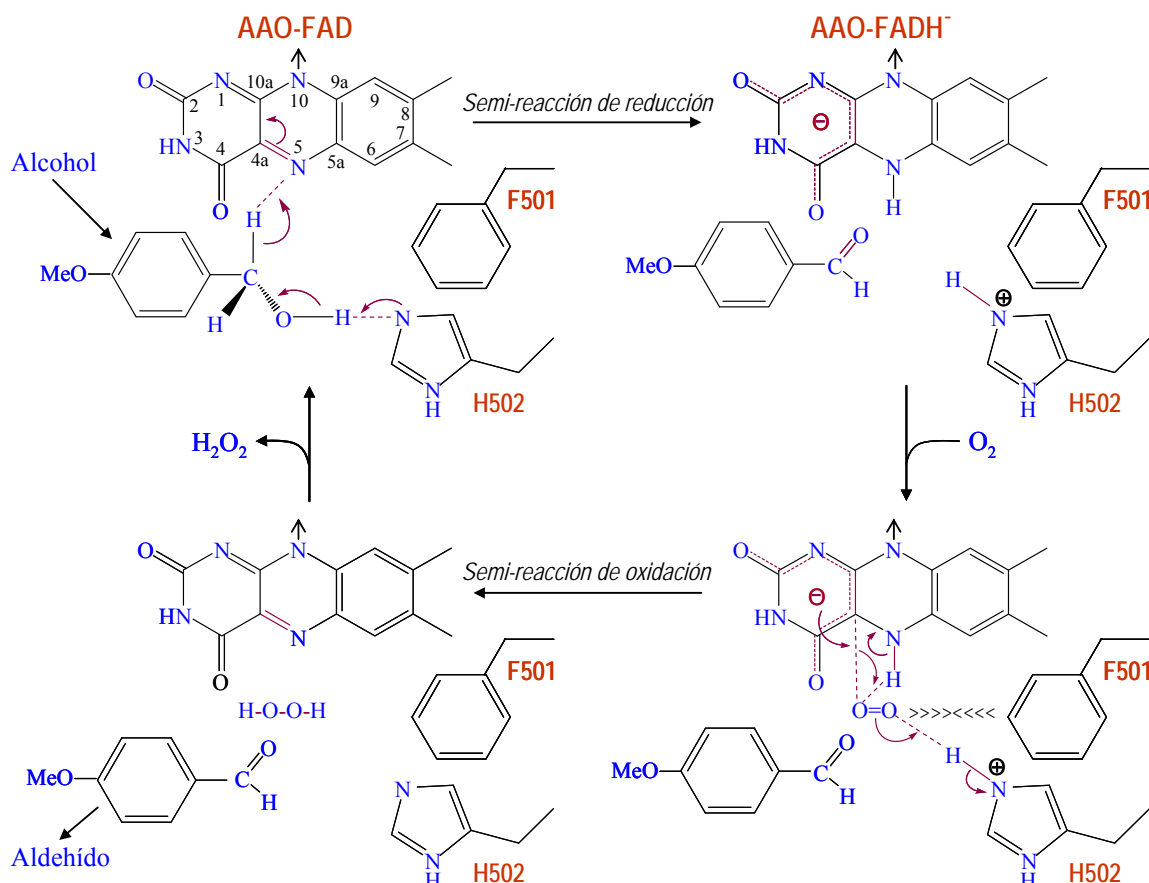


Figura 9. **Esquema de las semi-reacciones del ciclo catalítico de la AAO.** En la primera semi-reacción el FAD oxidado abstrae un hidruro del alcohol ayudado por la His502 que actúa como base catalítica (Hernández-Ortega *et al.*, 2011), dando lugar al aldehído y al FAD reducido. Durante la semi-reacción de oxidación el O₂ es reducido por la flavina (C4a), con la contribución de la Phe501 (que aproxima el O₂ al C4a de la flavina y a la His502) dando lugar a la formación del H₂O₂ y la flavina reoxidada.

En el presente trabajo se ha mostrado como un canal hidrofóbico permite acceso del O₂ hasta el centro activo de la AAO, sin que se requieran reajustes significativos de las cadenas laterales de los residuos para superar el cuello de botella formado por la Phe501 y otros dos residuos aromáticos. Este residuo juega un papel clave en la reoxidación de la enzima, tal y como se ha observado a través de los estudios de mutagénesis dirigida, constantes cinéticas y análisis computacionales. Estos estudios muestran como se puede incrementar la reactividad frente al O₂ en una oxidorreductasa GMC mediante la introducción de un residuo en la posición contigua a la histidina catalítica (His502 en la AAO) capaz de mejorar el posicionamiento del O₂ en la cavidad del centro activo, tal y como ocurre en la variante F501W de la AAO.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Baldrian, P. y Valaskova, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 501-521.
- Baron, R., Riley, C., Chenprakhon, P., Thotsaporn, K., Winter, R.T., Alfieri, A., Forneris, F., van Berkel, W.J., Chaiyen, P., Fraaije, M.W., Mattevi, A. y McCammon, J.A. (2009) Multiple pathways guide oxygen diffusion into flavoenzyme active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10603-10608.
- Borrelli, K., Cossins, B. y Guallar, V. (2010) Exploring hierarchical refinement techniques for induced fit docking with protein and ligand flexibility. *J. Comp. Chem.* 31: 1224-1235.
- Borrelli, K.W., Vitalis, A., Alcantara, R. y Guallar, V. (2005) PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. *J. Chem. Theory Comput* 1: 1304-1311.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255: 445-450.
- Chen, L., Lyubimov, A.Y., Brammer, L., Vrieland, A. y Sampson, N.S. (2008) The binding and release of oxygen and hydrogen peroxide are directed by a hydrophobic tunnel in cholesterol oxidase. *Biochemistry* 47: 5368-5377.
- Coulombe, R., Yue, K.Q., Ghisla, S. y Vrieland, A. (2001) Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *J. Biol. Chem.* 276: 30435-30441.
- de Jong, E., Field, J.A., Dings, J.A.F.M., Wijnberg, J.B.P.A. y de Bont, J.A.M. (1992) De novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Formation of 3-chloro-anisaldehyde from glucose. *FEBS Lett.* 305: 220-224.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010)

- Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Finnegan, S., Agniswamy, J., Weber, I.T. y Gadda, G. (2010) Role of valine 464 in the flavin oxidation reaction catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 49: 2952-2961.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. y Shenkin, P.S. (2004) Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47: 1739-1749.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Guallar, V., Lu, C.Y., Borrelli, K., Egawa, T.Y. y Yeh, S.R. (2009) Ligand migration in the truncated hemoglobin-II from *Mycobacterium tuberculosis*: The role of G8 tryptophan. *J. Biol. Chem.* 284: 3106-3116.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 465-469.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase

- activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1783-1788.
- Halgren, T. (2007) New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. Chem. Biol. Drug Design 69: 146-148.
- Hallberg, B.M., Leitner, C., Haltrich, D. y Divne, C. (2004) Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin- degrading enzyme pyranose 2-oxidase. J. Mol. Biol. 341: 781-796.
- Hammel, K.E. y Cullen, D. (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 349-355.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. J. Mol. Biol. 229: 153-172.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. Biochem. J. 436: 341-350.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, M.J., Romero, A. y Martínez, A.T. (2008) Discriminating the role of His502 and His546 in the catalysis of aryl-alcohol oxidase. En: Flavins and flavoproteins 2008. (Eds.: Frago, S., Gómez-Moreno, C. y Medina, M.), Prensas Universitarias, Zaragoza, pp. 303-308.
- Kersten, P. y Cullen, D. (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Fungal Genet. Biol. 44: 77-87.
- Klinman, J.P. (2007) How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? Account. Chem. Res. 40: 325-333.
- Macheroux, P. (1999) UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. En: Flavoprotein protocols. (Eds.: Chapman, S.K. y Reid, G.A.), Humana Press, Totowa, USA, pp. 1-7.
- Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb. Technol. 30: 425-444.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Rev. 13: 265-274.

- Martínez, A.T., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2011) Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by *in situ* structural analyses. *Environ. Microbiol.* 13: 96-107.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009a) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D.S., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuña, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R. y Cullen, D. (2009b) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.
- Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. y Rokhsar, D. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22: 695-700.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Mattevi, A. (2006) To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* 31: 276-283.
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1990) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 204-209.
- Munteanu, F.D., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T. y Cavaco-Paulo, A. (2008) Bioelectrochemical investigations of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*. *J. Electroanal. Chem.* 618: 83-86.

- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. y Damborsky, J. (2006) CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* 7: 316-320.
- Piubelli, L., Pedotti, M., Molla, G., Feindler-Boeckh, S., Ghisla, S., Pilone, M.S. y Pollegioni, L. (2008) On the oxygen reactivity of flavoprotein oxidases - An oxygen access tunnel and gate in *Brevibacterium sterolicum* cholesterol oxidase. *J. Biol. Chem.* 283: 24738-24747.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. y Tschaplinski, T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.
- Romero, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2010) Molecular characterization of a new flavooxidase from a *Bjerkandera adusta* anamorph. Proc. OESIB, Santiago de Compostela, 14-15 September (Eds, G. Feijoo and M.T. Moreira; ISBN-13: 978-84-614-2824-3) pp 86-91.
- Roth, J.P. y Klinman, J.P. (2003) Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 62-67.
- Ruiz-Deñás, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Deñás, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Saam, J., Rosini, E., Molla, G., Schulten, K., Pollegioni, L. y Ghisla, S. (2010) O₂ reactivity of flavoproteins: Dynamic access of dioxygen to the active site and role of a H⁺ relay system in D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 285: 24439-24446.
- Schrödinger Inc. (2011a) Jaguar 7.8. LCC, New York.
- Schrödinger Inc. (2011b) Maestro 9.2. LCC, New York.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.

- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Xin, Y., Gadda, G. y Hamelberg, D. (2009) The cluster of hydrophobic residues controls the entrance to the active site of choline oxidase. *Biochemistry* 48: 9599-9605.

CAPÍTULO 7

Discriminando la función de dos residuos de histidina del centro activo en la catálisis de la AAO: un estudio mediante mutagénesis dirigida, efectos isotópicos y cálculos QM/MM*

Resumen. La estructura cristalográfica de la aril-alcohol oxidasa (AAO) de *Pleurotus eryngii*, una flavoenzima implicada en la degradación de lignina, presenta dos residuos de histidina en el centro activo. Para determinar su papel durante la catálisis, ambos residuos fueron sustituidos por alanina y serina mediante mutagénesis. Mientras que la AAO nativa estaba un 20-30% reducida durante el *turnover*, las variantes estaban completamente oxidadas indicando la implicación de los residuos de histidina durante la semi-reacción de reducción. La eficiencia catalítica frente al alcohol y la constante de reducción disminuyeron de 2-3 (His546) a 5 órdenes de magnitud (His502) confirmando lo anterior; mientras que las constantes para el oxígeno solo disminuyeron un orden de magnitud en estas variantes. Estos resultados también confirmaron el papel de la His502 como base catalítica, tal y como sugerían las simulaciones computacionales y los perfiles de actividad frente al pH. Durante la reacción con alcohol se observó un efecto isotópico cinético del solvente (KIE), indicando que la abstracción del protón del grupo hidroxilo del alcohol por la His502 limita parcialmente la reacción. Ambas histidinas contribuyen también a la unión del alcohol (la K_d aumentó tras mutarla). Respecto a la reacción con el oxígeno, los resultados de mutagénesis muestran que únicamente está implicada la His502. Las simulaciones QM/MM revelaron que la enzima disminuye (en ~ 10 kcal·mol⁻¹) la diferencia de energía entre el estado triplete y singlete de los reactivos, y confirmaron que la producción del H₂O₂ tiene lugar sin que se forme un intermediario flavina-hidroperóxido. Se observó un KIE para la eficiencia catalítica frente al oxígeno en las oxidaciones de los alcoholes (*R*)-[α -²H] y [α -²H₂]-*p*-metoxibencílico. Durante estas reacciones en estado estacionario el (*R*)-²H es transferido a la flavina dando lugar al KIE observado para la semi-reacción de oxidación. Pudiéndose concluir que la transferencia del protón desde el N5H de la flavina limita parcialmente la reducción del oxígeno; mientras que la contribución de la His502H⁺, observable en los estudios de mutagénesis, consistiría en la estabilización del intermediario superóxido. Finalmente, no se observó un KIE del solvente para la reducción del oxígeno confirmando que la transferencia de protón adicional desde la His502H⁺, mostrada en las simulaciones, no es limitante en la reacción.

*Aitor Hernández-Ortega, Fátima Lucas, Patricia Ferreira, Milagros Medina, Victor Guallar, y Angel T. Martinez. Discriminating the role of two active site histidines in aryl-Alcohol oxidase catalysis: a mutagenesis, isotope effect and QM/MM study. Biochemistry. En preparación.

1. INTRODUCCIÓN

La aril-alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7) cataliza la oxidación de alcoholes primarios aromáticos, y algunos alifáticos poliinsaturados, a sus correspondientes aldehídos y simultáneamente reduce el O_2 a H_2O_2 , durante las semi-reacciones de reducción y oxidación, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2005). El H_2O_2 extracelular producido es necesario para la degradación de la lignina actuando como sustrato de las peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). La eliminación de la lignina es un paso clave durante el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres, así como para el empleo a nivel industrial de la biomasa vegetal en las biorefinerías de la lignocelulosa, donde la biotecnología podría contribuir a la producción sostenible de biocombustibles, productos químicos y otros productos (Martínez *et al.*, 2009).

Tras la clonación del gen (Varela *et al.*, 1999), el modelado por homología (Varela *et al.*, 2000), y la obtención de la estructura cristalográfica de la AAO de *Pleurotus eryngii* (PDB 3FIM) (Fernández *et al.*, 2009) la enzima mostró características en común con los otros miembros de la superfamilia de las oxidorreductas GMC (glucosa-metanol-colina oxidasas). Una de las semejanzas con estas flavoenzimas es la presencia de dos residuos conservados en el centro activo en la proximidad del cofactor de FAD. Estos dos residuos pueden ser dos histidinas, como en la AAO y la glucosa oxidasa (**Figura 1A y B**) o un residuo de histidina y otro de asparagina, como en la piranosa 2-oxidasa, la colesterol oxidasa, la colina oxidasa, y el domino de flavina de la celobiosa deshidrogenasa (**Figura 1C-F**).

El ciclo catalítico de las flavoenzimas incluye dos semi-reacciones correspondientes a la reducción y oxidación sucesivas del cofactor de FAD. El mecanismo catalítico comúnmente aceptado para la semi-reacción de reducción en las oxidasas GMC comienza con la abstracción de un protón desde el grupo hidroxilo del sustrato por una base catalítica, seguido de la abstracción de un hidruro por el N5 de la flavina (Gadda, 2008). La reacción continúa con la reducción del O_2 a H_2O_2 por el FAD durante la segunda semi-reacción. Los estudios de mutagénesis sobre las parejas His-His e His-Asn han intentado asignar su papel durante la catálisis. Se ha propuesto que el residuo de histidina conservado en todas ellas (His502 en la AAO de *P. eryngii*) actúa como base catalítica en la glucosa oxidasa (Wohlfahrt *et al.*, 2004), la piranosa 2-oxidasa (Wongnate *et al.*, 2011), y la celobiosa deshidrogenasa (Rotsaert *et al.*, 2003). Sin embargo, otros estudios en la colesterol oxidasa y la colina oxidasa han puesto en duda el papel de esta histidina como base catalítica (Ghanem y Gadda, 2005; Lyubimov *et al.*, 2006).

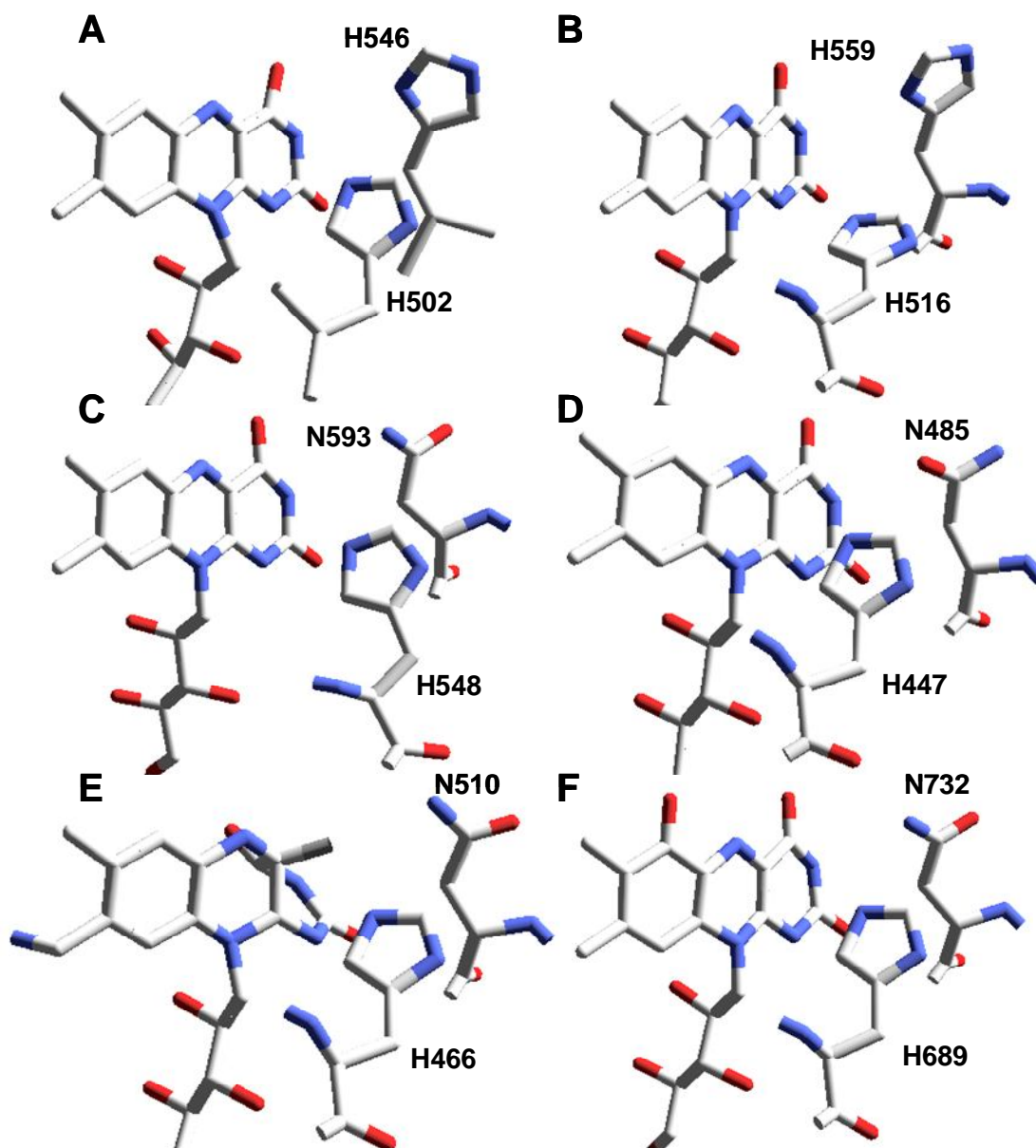


Figura 1. **Residuos His-His o His-Asn conservados en el centro activo de las flavooxidinas GMC.** (A) AAO de *P. eryngii*, (B) glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, (C) piranosa 2-oxidasa de *Trametes ochracea*, (D) colesterol oxidasa de *Brevibacterium sterolicum*, (E) colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis*, (F) dominio de flavina de la celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium*. Referencias PDB: 3FIM, 1CF3, 1TTO, 1COY, 2JBV y 1KGD, respectivamente.

En las oxidorreductasas GMC aún no se han determinado por completo ni el mecanismo ni los residuos que participan durante la semi-reacción de oxidación. En general se acepta que el primer paso en la reoxidación es la transferencia de un electrón desde la flavina al oxígeno, lo que da lugar al par de radicales superóxido y semiquinona de la flavina (Massey, 1994; Mattevi, 2006). Estos radicales pueden colapsar sobre el C4a de la flavina para dar lugar al intermediario flavina-hidroperóxido, que participa en las

reacciones de transferencia de oxígeno o bien dar lugar directamente al H₂O₂ y a la flavina oxidada. Alternativamente, el segundo electrón se puede transferir directamente desde la forma semiquinona de la flavina al superóxido formando el H₂O₂ y la flavina oxidada. La capacidad de estabilizar el intermediario flavina-hidroperóxido, generalmente ausente en oxidasas pero típica de las monooxigenasas, define la diferente reactividad frente al O₂ de ambos tipos de flavoenzimas.

En el presente estudio se ha comparado el papel de los residuos de histidina conservados en el centro activo de la AAO de *P. eryngii* (His502 e His546) para discriminar sus contribuciones durante las semi-reacciones de reducción y oxidación, empleando distintas técnicas experimentales y computacionales. Entre ellas, la mutagénesis dirigida en combinación con estudios cinéticos de estado estacionario y transitorio, ayudan a evaluar su implicación en la catálisis, mientras que los efectos isotópicos de estado estacionario y transitorio indican qué etapas son limitantes durante ambas semi-reacciones. Por último, los cálculos cuanto mecánicos/mecánico moleculares (QM/MM) contribuyen a explicar el mecanismo de la reacción en términos energéticos, y la presencia eventual de especies intermedias durante la reacción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzima y variantes mutadas

La AAO recombinante de *P. eryngii* fue obtenida mediante expresión heteróloga del cDNA que codifica para la proteína madura en la cepa W3110 de *E. coli* (GenBank™ AF064069). La proteína producida en forma insoluble, fue replegada *in vitro* en presencia del cofactor, y se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico según el protocolo descrito por Ruiz-Dueñas et al. (2006). Las variantes H502S/A y H546S/A, fueron preparadas mediante PCR utilizando el kit comercial *QuikChange site-directed mutagenesis* (Stratagene). El cDNA de la AAO clonado en el vector pFLAG1 fue empleado como molde y los siguientes oligonucleótidos, incluyendo las mutaciones (subrayado) en los correspondientes tripletes (negrita) fueron usados como cebadores (se muestran solamente las secuencias directas): H502S, 5'-GCCAACACG ATTTTCAGCCCAGTTGGAACGGCC-3'; H502A, 5'-GCCAACACGAT TTTCGCCCAGTTGGAACGGCC-3'; H546S, 5'-CCCTTCGCGCCCAA CGCAAGTACCCAAGGACCG-3'; H546A, 5'-CCCTTCGCGCCCAAACG CAGCTACCCAAGGACCG-3'. Los plásmidos mutados fueron aislados y el cDNA secuenciado (Secuenciador GS-FLX Roche) para confirmar las mutaciones introducidas. Las variantes fueron producidas como se indica arriba para la AAO nativa. Las concentraciones de enzima utilizadas fueron

determinadas empleando los coeficientes de extinción molar: AAO, ϵ_{463} 11050 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$; H502S, ϵ_{468} 9980 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$; H502A, ϵ_{467} 9800 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$; H546S ϵ_{463} 12400 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$; y H546A, ϵ_{467} 9669 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$; calculados tras desnaturalización térmica y estimación del FAD libre (ϵ_{450} 11300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) (Macheroux, 1999).

2.2 Cinéticas de estado estacionario y dependencia del pH

Las actividades enzimáticas en estado estacionario se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico (Sigma-Aldrich) a *p*-anisaldehído (ϵ_{285} 16950 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) (Ferreira *et al.*, 2005). Las constantes cinéticas de estado estacionario para la enzima nativa y las variantes H546S y H546A fueron determinadas en cinéticas bisustrato variando las concentraciones de alcohol (4-2000 μM) y oxígeno (51, 128, 273, 566 y 1279 μM). Los ensayos se realizaron en cubetas selladas con un septo de silicona donde se equilibra la mezcla de reacción a la concentración de oxígeno deseada mediante burbujeo de la correspondiente mezcla comercial de O_2/N_2 durante 10-15 min. Las reacciones se inician mediante la inyección de la enzima, en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el ajuste de las velocidades iniciales (k_{obs}) para distintas concentraciones de alcohol a la ecuación 1 (empleando SigmaPlot v11), que describe un mecanismo cinético ternario; donde e representa la concentración de enzima, k_{cat} es la constante catalítica, S es la concentración de alcohol, B es la concentración de O_2 , $K_{m(Al)}$ y $K_{m(Ox)}$ son las constantes de Michaelis para S y B , respectivamente y K_d es la constante de disociación de S .

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}SB}{K_{m(Ox)}S + K_{m(Al)}B + SB + K_d K_{m(Ox)}} \quad \text{Ec. 1}$$

Las constantes de estado estacionario de las variantes H502S y H502A fueron determinadas variando únicamente la concentración de alcohol (62-5000 μM) a concentración atmosférica de oxígeno, debido a que la tasa de recambio en estas variantes es independiente de la concentración de oxígeno. Las constantes cinéticas fueron obtenidas ajustando las k_{obs} a la ecuación de Michaelis-Menten.

La dependencia de la actividad en función del pH (4-9) fue estudiada a 25°C empleando alcohol *p*-metoxibencílico como sustrato y concentración atmosférica de oxígeno. Las medidas de actividad se realizaron en tampón citrato fosfato 0.1 M para el rango de pH 4-7 y pirofosfato 0.1 M para el rango de pH 8-9. La dependencia de las constantes cinéticas, $^{app}k_{cat}$ y $^{app}k_{cat}/K_m$, del pH fue determinada ajustando las k_{obs} a las ecuaciones 2-4.

Los datos que mostraban una pendiente de +1 y -1 fueron ajustados a las ecuaciones 2 y 3, donde los valores pK_{a1} y pK_{a2} representan los valores de pK_a de los residuos ácidos y básicos, respectivamente. Los perfiles de pH de tipo campana se ajustaron a la ecuación 4, donde C es el valor independiente de pH del parámetro cinético de interés.

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{a1}}}} \right) \quad \text{Ec. 2}$$

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pK_{a2}}}{10^{-pH}}} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

$$\log k = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{a1}}} + \frac{10^{-pK_{a2}}}{10^{-pH}}} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

2.3 Calculo del KIE para las constantes cinéticas de estado estacionario

Se determinó el KIE del sustrato en estado estacionario para la constante catalítica, y las eficiencias catalíticas frente al alcohol y el O_2 , empleando la forma dideuterada y los enantiómeros monodeuterados (R) y (S) del alcohol p -metoxibencílico. Los valores de KIE fueron obtenidos mediante cinéticas bisustrato en tampón fosfato 0.1 M a 25 °C, a través del ajuste de las velocidades iniciales a la ecuación 5. Esta ecuación describe un mecanismo con efectos isotópicos separados en la k_{cat} y la k_{cat}/K_m ; donde S es la concentración de sustrato, F_i es la fracción atómica de deuterio en el sustrato (0.98 en este caso), y E_{k_{cat}/K_m} y $E_{k_{cat}}$ son los efectos isotópicos menos 1.

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}S}{K_m(1 + F_i E_{k_{cat}/K_m}) + S(1 + F_i E_{k_{cat}})} \quad \text{Ec. 5}$$

También se investigó el KIE del solvente para los parámetros cinéticos de estado estacionario. Para ello, los componentes de la reacción fueron disueltos en tampón fosfato 0.1 M deuterado, pD 6. La AAO fue exhaustivamente dializada frente este tampón con objeto de eliminar los protones intercambiables. El efecto de la viscosidad del solvente se evaluó

en presencia de glicerol al 30% (v/v), y se calculó como el cociente entre las constantes obtenidas en presencia y ausencia de glicerol.

2.4 Cinéticas de estado transitorio y estado redox durante el *turnover*

Para los estudios cinéticos de estado transitorio y la monitorización estado redox durante el *turnover*, se utilizó un equipo de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX17.MV (Applied Photophysics) usando un detector de longitud de onda fija o de diodos (350-900 nm) y los programas SX18.MV y Xscan, respectivamente.

Durante los ensayos de *turnover* (Gibson *et al.*, 1964) se mezclaron volúmenes idénticos de AAO nativa y las variantes H502S, H502A y H546A (la variante H546S fue demasiado inestable para obtener suficiente cantidad de enzima) y sustrato a concentración saturante en condiciones aeróbicas siguiendo la evolución del estado redox del cofactor a los máximos de 462 nm (AAO nativa) o 467 nm (variantes) en función del tiempo.

Para estudiar la semi-reacción de reducción, las soluciones del sustrato y la enzima se prepararon por separado en tonómetros de vidrio, eliminando el oxígeno mediante ciclos sucesivos de vacío y argón. Para garantizar las condiciones de anaerobiosis durante las medidas, antes de conectar los tonómetros a las jeringas del sistema se les adicionó una solución de glucosa oxidasa ($10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) y glucosa (10 mM). La anaerobiosis del equipo de mezcla rápida con flujo detenido se obtuvo con una solución anaeróbica saturada en ditionito y posteriores lavados del sistema con el tampón anterior en anaerobiosis (Fraaije y van Berkel, 1997). Las medidas se realizaron en tampón fosfato, pH 6, a 25°C para las variantes H502S, H502A y H546A, y a 12°C para la enzima nativa debido a su rápida reducción. El estudio cinético de la evolución espectral del proceso de reducción se realizó mediante análisis global y ajustes a un modelo cinético $A \rightarrow B$ o $A \rightarrow B \rightarrow C$ utilizando el programa de análisis *Pro-Kineticist* (Applied Photophysics Ltd). Estos modelos son equivalentes a las ecuaciones monoexponencial y biexponencial utilizadas para realizar el análisis cinético de la evolución de la reacción a una longitud de onda (462 o 467 nm, máximos espectrales de AAO y las variantes H502S, H502A y H546A en estado oxidado, respectivamente) y poder obtener así las constantes observadas (k_{obs}) para la reacción de reducción. Los valores de k_{obs} a diferentes concentraciones de sustrato se ajustaron la ecuación 6, donde k_{red} y K_d son las constantes de reducción y disociación, respectivamente.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{red}}S}{K_d + S} \quad \text{Ec. 6}$$

Las constantes de reoxidación se determinaron de forma similar a lo descrito anteriormente, tras mezclar la enzima reducida en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, con el mismo tampón equilibrado a diferentes concentraciones de oxígeno (mediante burbujeo de diferentes mezclas de O₂/N₂ durante 15 min). La reducción de las muestras de la AAO se realizó en anaerobiosis empleando un tonómetro modificado con un brazo lateral que contenía una solución de alcohol *p*-metoxibencílico, que dio lugar a una relación molar alcohol/AAO de 1.1:1.0 tras el mezclado. Las evoluciones espectrales durante la semi-reacción de oxidación fueron ajustadas a uno de los dos modelos anteriores. Las constantes de reoxidación fueron calculadas empleando la ecuación 7, donde la k_{obs} es la constante observada para la reoxidación de la flavina a cualquier concentración dada de O₂, y $^{\text{app}}k_{\text{ox}}$ es la constante aparente de segundo orden.

$$k_{\text{obs}} = ^{\text{app}}k_{\text{ox}}[\text{O}_2] \quad \text{Ec. 7}$$

2.5 Configuración del sistema para los estudios computacionales

Se tomaron las coordenadas atómicas de la AAO a partir de la estructura cristalográfica de la enzima (PDB 3FIM) y se prepararon convenientemente utilizando la herramienta *Protein preparation wizard* disponible en el programa *Maestro* (Schrödinger Inc, 2011b). Se difundieron ambos ligandos, alcohol *p*-metoxibencílico y O₂, empleando el programa *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005) con el resultado previamente publicado (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a; 2011b). Se modificó la estructura final obtenida mediante *PELE* cambiando el alcohol a su aldehído correspondiente (*p*-metoxibenzaldehído) y reduciendo la flavina. La estructura obtenida se empleó para realizar los cálculos de QM/MM descritos a continuación.

2.6 Simulaciones QM

Los cálculos QM del sistema modelo aislado, incluyendo la flavina reducida y el O₂, se realizaron con el programa *Jaguar* (Schrödinger Inc, 2011a). Para analizar el perfil de energía de esta reacción, fue necesario realizar un análisis de transito lineal, donde se variaron progresivamente las coordenadas de los núcleos de los átomos de la molécula de oxígeno aproximándolos al átomo C4a de la molécula de FAD. Cada una de las estructuras obtenidas fue optimizada en los estados singlete y triplete.

Se obtuvieron las energías potenciales en función de la distancia O-C4, siguiendo el esquema general de la **Figura 2. E1** corresponde a la diferencia de energía entre los reactivos en estado triplete y singlete. El estado electrónico más favorable para el sistema libre se corresponde con el estado triplete para la molécula de oxígeno y el estado singlete para los

productos. **E2** establece la barrera energética de activación necesaria para la reacción y el punto donde ocurre la inversión de *spin*. **E3** establece la diferencia de energía entre el estado triplete de los reactivos y el estado singlete de los productos. Esta diferencia de energía determina la afinidad del sistema por cada estado inicial.

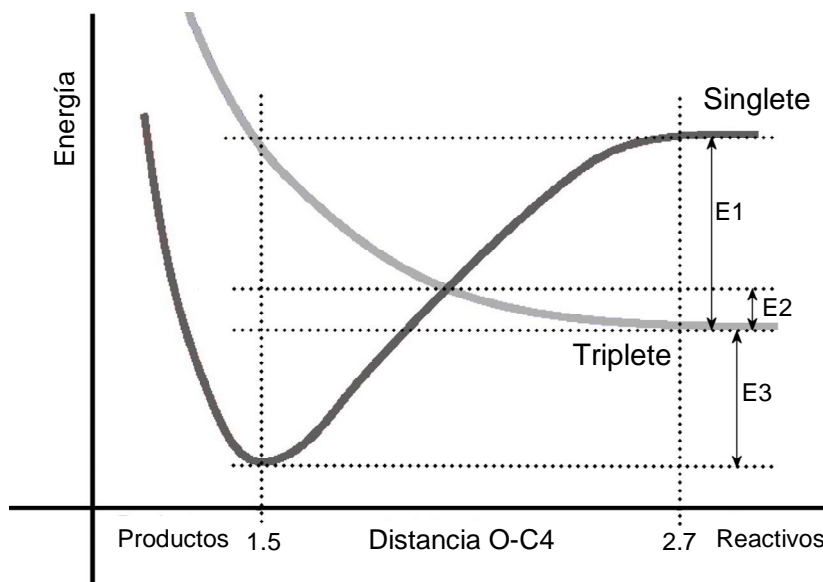


Figura 2. **Perfiles de energía potencial en función de la distancia O (O₂)-C4a (FAD)**. Cada curva corresponde a la energía potencial para el estado singlete y triplete.

Los cálculos QM/MM se realizaron empleando el funcional de densidad no-restringido M06. Las pruebas con los distintos set básicos 6-31G(d,p) y 6-311G(d,p) y 6-311G(3df,3pd)++ (el último incluyendo solo cálculos puntuales) mostraron que las geometrías son independientes del set empleado y que las diferencias de energía observadas se encuentran dentro del error del método (observar los resultados con los diferentes set básicos). Por esta razón se utilizó un set básico 6-31G** para todas las optimizaciones.

2.7 Simulaciones QM/MM

Los cálculos QM/MM estuvieron basados en las estructuras de la AAO tras la difusión del O₂ al centro activo. Todas las estructuras fueron optimizadas al nivel M06/6-31G(d,p)/OPLS. Al igual que en los cálculos QM, se realizaron análisis de tránsito lineal empleando como variable de reacción la distancia desde uno de los oxígenos al C4a del FAD. Estos cálculos se realizaron para una serie de sistemas donde la región cuántica fue aumentada de forma progresiva. El sistema más pequeño fue similar al utilizado para los cálculos de QM, donde se incluyó el anillo de flavina y la

molécula de O₂. Además se investigaron dos sistemas adicionales donde se añadieron primero la His502 y posteriormente también la His546. De esta forma se prepararon 3 sistemas con un total de 33, 45 y 56 átomos en la región QM.

3. RESULTADOS

3.1 Producción y características espectrales de las variantes de histidina

Las variantes H502S, H502A, H546S y H546A fueron generadas mediante mutagénesis con PCR y purificadas a homogeneidad como holoenzimas, tras el replegado *in vitro* de los cuerpos de inclusión y la incorporación del cofactor (las variantes de His→Arg adicionales ensayadas no pudieron ser activadas *in vitro*). Las variantes purificadas mostraron una relación A_{280}/A_{463} de ~ 10 , similar a la de la enzima nativa. El espectro de absorción UV-visible de las cuatro variantes anteriores presentó el típico pico de flavina entorno a 465 nm (**Figura 3**) indicando que el cofactor se incorporó correctamente en su estado oxidado. El espectro de la variante H546S fue similar al de la enzima nativa, con máximos a 387 y 463 nm. Sin embargo, los máximos de absorción de las variantes H502S, H502A y H546A se situaron a 390 y 467 nm, con un hombro desplazado a 498 nm y 494 nm para las variantes H502S/A y H546A, respectivamente (comparado con el hombro a 474 nm de la enzima nativa).

3.2 Constantes de estado estacionario para el alcohol y el oxígeno

Se determinaron los valores máximos de las constantes de estado estacionario para la AAO nativa y las cuatro variantes de los residuos His502 e His546 en cinéticas bisustrato (**Tabla 1**).

Las variantes H502S y H502A mostraron una fuerte disminución en la tasa de recambio (con una k_{cat} ~ 2500 veces menor), mientras que las variantes H546S y H546A mostraron disminuciones más modestas (de 10 a 50 veces, respectivamente). Todas las sustituciones provocaron también un incremento en la K_m para el alcohol, mayor para las variantes H502S y H502A (27 y 80 veces, respectivamente) que para las variantes H546S y H546A (7 y 25 veces, respectivamente).

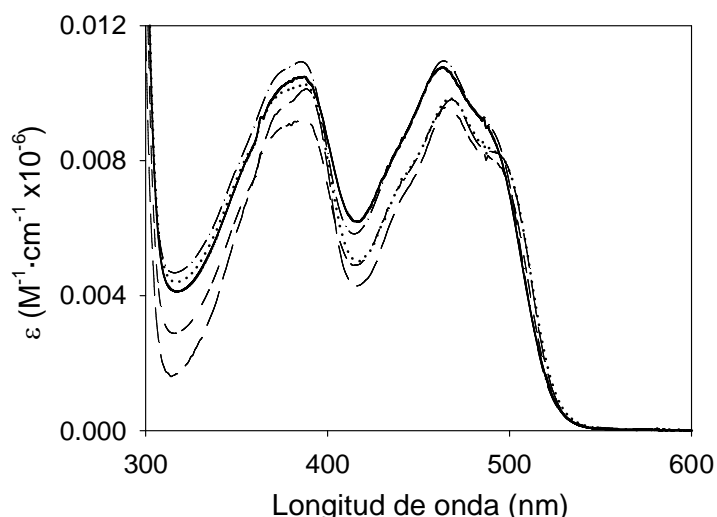


Figura 3. **Espectros de absorción molar de la AAO y las variantes de la His502 y la His546.** Los espectros de absorción molar de las variantes H502S (línea de puntos), H502A (trazos largos), H546S (puntos/trazos) y H546A (trazos cortos) y la AAO nativa (línea continua) fueron obtenidos en tampón fosfato 0.05 M, pH 6, y normalizados a la misma concentración, dando lugar a los coeficientes de extinción molar en el rango 280-600 nm.

Tabla 1

Constantes cinéticas de estado estacionario para el alcohol y el oxígeno durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO nativa y sus variantes^a

	k_{cat} (s^{-1})	$K_{m(Al)}$ (μM)	$k_{cat}/K_{m(Al)}$ ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	$K_{m(Ox)}$ (μM)	$k_{cat}/K_{m(Ox)}$ ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
AAO	174 ± 2	46 ± 1	3780 ± 89	144 ± 3	1209 ± 31
H502S	0.069 ± 0.005	1290 ± 250	0.054 ± 0.010	$(\sim 1)^b$	nd ^c
H502A	0.072 ± 0.002	3820 ± 230	0.019 ± 0.001	$(< 1)^b$	nd
H546S	16.6 ± 1.4	310 ± 56	53 ± 11	18 ± 2.5	923 ± 149
H546A	3.5 ± 0.1	1160 ± 30	3.0 ± 0.1	6 ± 1	590 ± 103
F501A ^d	66 ± 2	265 ± 8	250 ± 9	3850 ± 120	13 ± 1

^aLas constantes cinéticas fueron determinadas variando simultáneamente las concentraciones de ambos sustratos (alcohol y O₂) en fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. ^bLos valores de $K_{m(Ox)}$ entre paréntesis son estimaciones basadas en las constantes de reoxidación mostradas en la **Tabla 2** (ver ^c). ^cnd, no determinado porque no se detectaron diferencias experimentales a las diferentes concentraciones de O₂. ^dAdaptado de Hernández-Ortega et al. (2011b).

Los cambios anteriores hacen que las variantes H546S, H546A, H502S y H502A sean, respectivamente, 71, 1250, 70000 y 199000 veces menos eficientes oxidando el alcohol *p*-metoxibencílico, que la enzima nativa (tal y como muestran los valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$).

Las variantes H502S y H502A no mostraron una dependencia del O₂ en condiciones de estado estacionario, lo que permitió determinar sus constantes cinéticas a concentración atmosférica de O₂. Por esta razón, únicamente puede determinarse la reactividad frente al oxígeno de estas variantes en condiciones de estado transitorio (ver más adelante). Sin embargo, se puede estimar una $K_{\text{m(Ox)}} \leq 1 \mu\text{M}$ basándonos en los valores de la $^{\text{app}}k_{\text{ox1}}$ de estado transitorio. Por el contrario, fue posible determinar en condiciones de estado estacionario la reactividad frente al oxígeno de las variantes H546S y H546A, obteniendo unos valores de $K_{\text{m(Ox)}}$ 8 y 24 veces menores, respectivamente, respecto a la AAO nativa (estas variantes fueron ~1.3 y 2 veces menos eficientes reduciendo el O₂, respectivamente). Esta aparente mayor afinidad por el O₂ se relaciona con la mayor contribución de la semi-reacción de oxidación a la tasa de recambio de estas variantes, tal y como se describe más adelante.

3.3 Dependencia de la actividad respecto al pH

Se investigó la dependencia de los parámetros cinéticos de estado estacionario respecto al pH durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO y las cuatro variantes de la His502 y la His546 a concentración atmosférica de oxígeno. La enzima nativa no mostró una dependencia clara del pH durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico, tal y como se había descrito previamente (Ferreira *et al.*, 2009). Debido a la escasa actividad residual de las dos variantes de la His502 (ver **Tablas 1 y 2**) no se pudo determinar el efecto del pH sobre la eficiencia catalítica, y únicamente pudo observarse un efecto del pH para la k_{cat} (**Figura 4A**). La actividad de estas variantes fue estable en el rango de pH 3-6 y disminuyó a valores más básicos, con valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ de 8.2-8.7, que corresponde con un residuo que debe estar protonado durante el *turnover*.

La sustitución de la His546 dio lugar a un efecto del pH sobre la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico más claramente observable. El perfil de pH para la $^{\text{app}}k_{\text{cat}}$ de las variantes en la His546 mostró forma de campana (**Figura 4B**), consistente con la implicación de dos grupos ionizables en el centro activo. Un grupo con un $\text{p}K_{\text{a}}$ de 2.8-3.2 debe estar desprotonado durante la catálisis y el segundo grupo con un $\text{p}K_{\text{a}}$ de 8.9-9.0 debe estar protonado. La información sobre los residuo/s específicamente implicados en la oxidación de los alcoholes por la AAO proviene del perfil de pH para la eficiencia catalítica ($^{\text{app}}k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$) de las variantes en la

His546. Los perfiles de pH obtenidos (**Figura 4C**) muestran que un residuo en la enzima libre con un $pK_a \sim 3.8$ debe estar desprotonado durante la oxidación del alcohol.

Respecto a la reacción con el O_2 , no se pudo obtener un perfil de pH para la $k_{cat}/K_{m(Ox)}$ que hubiera permitido estimar los valores de pK_a para la AAO nativa (Ferreira *et al.*, 2009), aunque se observó (mediante cinéticas bisustrato a 25 °C) una disminución de la eficiencia catalítica a pH 7 ($835 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), pH 8 ($626 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) y pH 9 ($387 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), con respecto al máximo valor obtenido a pH 5-6 ($1200\text{-}1300 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$). En las dos variantes de His502 tampoco se pudo determinar el valor de $k_{cat}/K_{m(Ox)}$ debido a los pequeños valores de $K_{m(Ox)}$ (**Tabla 1**), y no pudo obtenerse un valor de pK_a a pesar de que para la variante H546S se observó una tendencia idéntica respecto a la enzima nativa.

3.4 Cambios en el estado redox del cofactor durante el *turnover*

Para identificar el estado redox del cofactor durante la catálisis se hizo reaccionar, empleando un equipo de mezcla rápida con flujo detenido, la AAO nativa y las variantes H502S, H502A y H546A (la variante H546S fue demasiado inestable para ser empleada en estos ensayos) con una solución saturante de alcohol *p*-metoxibencílico, bajo concentración atmosférica de oxígeno, y se determinaron los cambios en el espectro de absorción utilizando un detector de diodos (**Figura 5**).

La evolución del estado redox del cofactor, mostrada en los cambios de absorbancia a 462 nm (enzima nativa) y 467 nm (variantes), se muestra en la **Figura 6**. Tal y como se había descrito previamente (Ferreira *et al.*, 2009), durante los primeros milisegundos de la reacción se produjo una rápida disminución de la absorbancia antes de alcanzarse una fase estacionaria donde la AAO está en continuo *turnover* ($\sim 10\text{-}80$ ms), en la que el porcentaje de enzima oxidado es un 80%. Sin embargo, en las variantes de las histidinas se observó que la absorbancia inicial a 467 nm fue estable (H546A) o incluso se incrementó (H502S y H502A). Los incrementos observados fueron mayores cuando se utilizaron las concentraciones más altas de alcohol, debido a la formación del complejo enzima-sustrato. Además, la fase estacionaria (caracterizada por una absorbancia estable a 467 nm) fue mucho más larga en las variantes (10-300 s) que en la AAO nativa (menos de 0.1 s) y las variantes se mantuvieron completamente oxidadas durante todo el tiempo. En todos los casos, tras el agotamiento del oxígeno se observó la reducción de la flavina a su forma hidroquinona.

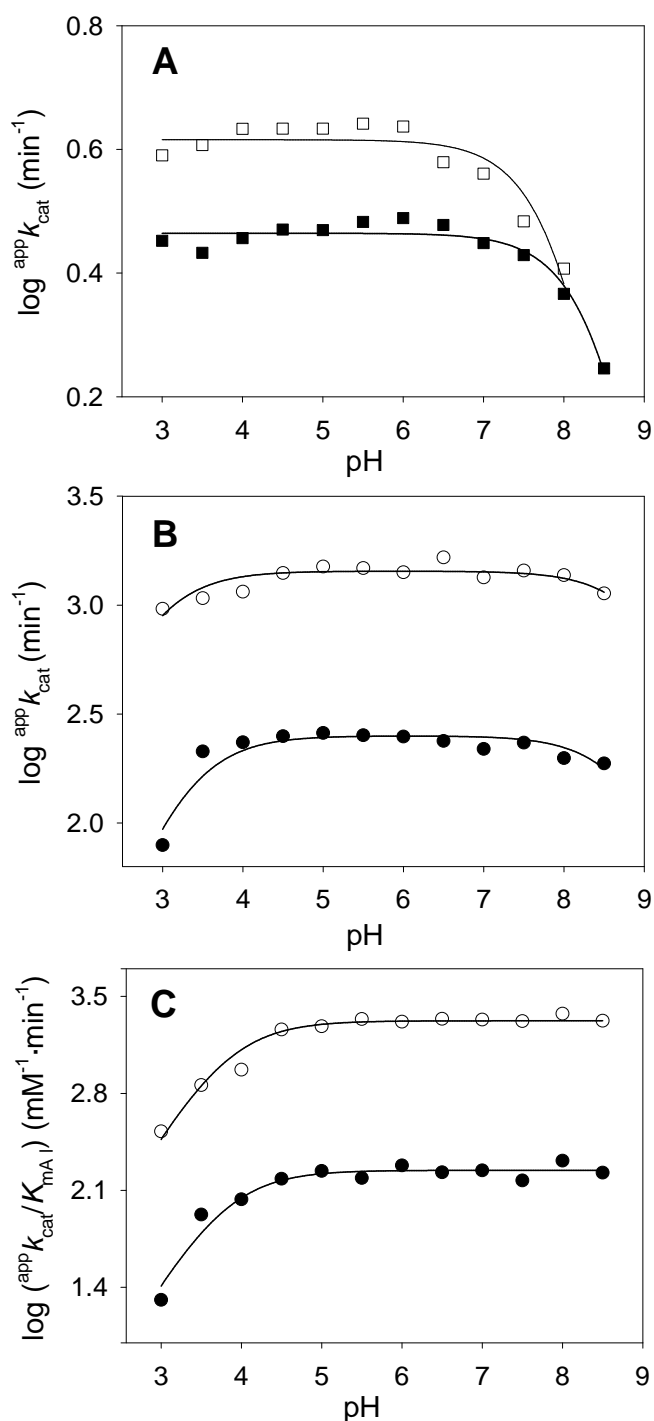


Figura 4. Dependencia del pH para las constantes cinéticas de las variantes en la His502 y la His546. (A) Dependencia de la $^{app}k_{cat}$ del pH durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por las variantes H502A (■) y H502S (□). Dependencia de la $^{app}k_{cat}$ (B) y la $^{app}k_{cat}/^{app}K_{m(A)}$ (C) del pH durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por las variantes H546A (●) y H546S (○). Todas las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C bajo concentración atmosférica de oxígeno, empleando diferentes tampones para obtener el pH deseado.

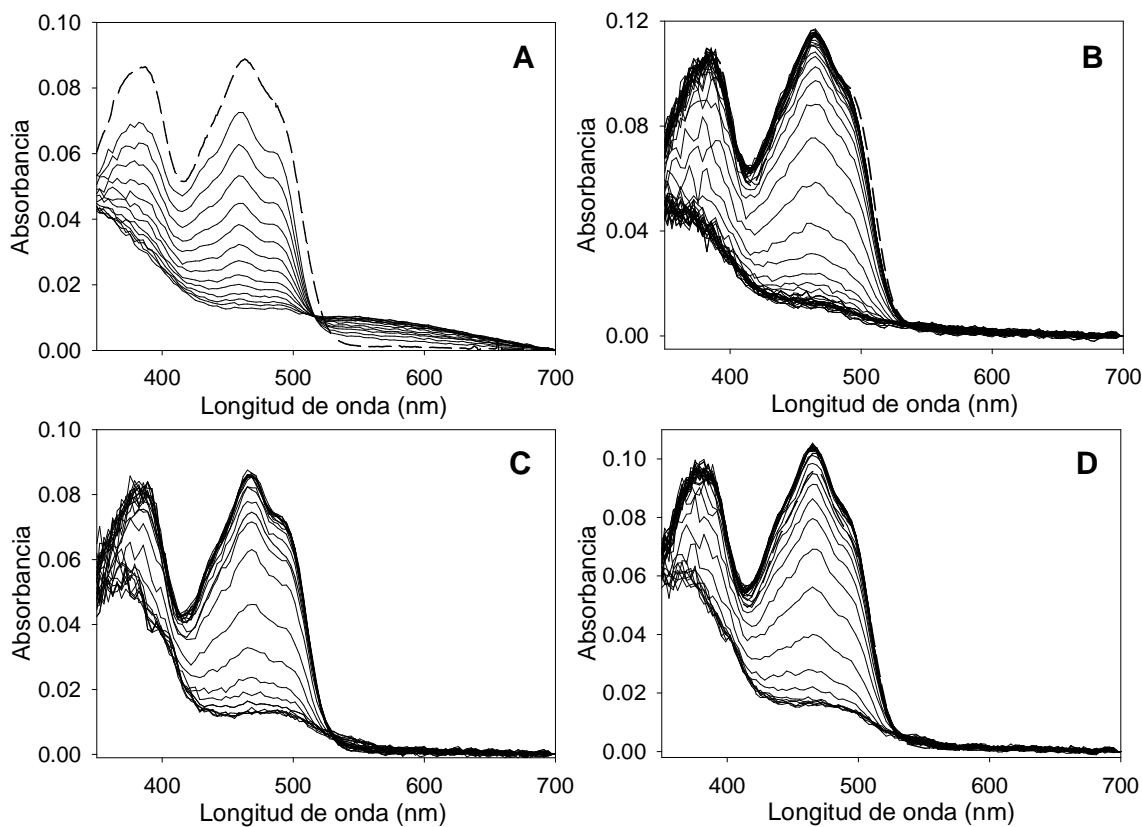


Figura 5. Cambios en el espectro de absorción durante el *turnover* de la AAO y las variantes en la His546 y la His502. Se hicieron reaccionar soluciones aerobias de la AAO y sus variantes H546A, H502S y H502A ($\sim 10 \mu\text{M}$) con concentraciones saturantes del alcohol *p*-metoxibencílico (1-10 mM) en fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C, en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido. **(A)** AAO nativa, primer espectro tras 9 ms, seguido de espectros cada 100 ms en el rango 9-1300 ms. **(B)** H546A, primer espectro tras 8 ms, seguido de espectros cada segundo en el rango 8-20000 ms. **(C)** H502S, primer espectro tras 1 s, seguido de espectros cada 4 s en el rango 0.65-262 s. **(D)** H502A, primer espectro tras 1 s, seguido de espectros cada 20 s en el rango 1-652 s.

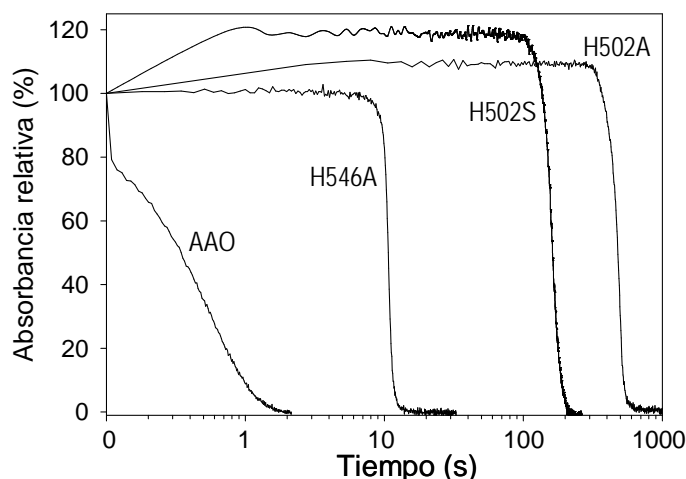


Figura 6. Estado redox de la AAO y sus variantes en la His546 y la His502 durante el *turnover*. Se muestra el porcentaje de FAD oxidado durante las reacciones mostradas en la Figura 5, seguidas a 462 nm (AAO nativa) o 467 nm (variantes H546A, H502S y H502A) en escala de tiempo logarítmica. Las medidas fueron realizadas en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido empleando una solución aerobia de enzima ($\sim 10 \mu\text{M}$) y concentración saturante de alcohol *p*-metoxibencílico, en fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C.

Por otro lado, los cambios en el espectro de absorción durante el *turnover* con el alcohol *p*-metoxibencílico sugieren la formación de un complejo de transferencia de carga, con un máximo alrededor de 550 nm, similar al descrito en otras flavoproteínas (Abramovitz y Massey, 1976). Curiosamente, no se encontró este complejo de transferencia de carga durante el *turnover* de las variantes H502S, H502A y H546A, sugiriendo que la acomodación del sustrato en el centro activo está afectada por las mutaciones.

3.5 Semi-reacción de reducción

Se investigó la semi-reacción de reducción para las variantes H502S, H502A y H546A, en anaerobiosis empleando un equipo de mezcla rápida con flujo detenido. Los espectros obtenidos indican una reducción completa de la AAO y sus variantes (Figura 7). En la AAO nativa, la ausencia de oxígeno evitó la formación del complejo de transferencia de carga observado durante el *turnover*. El análisis global de la reducción de la AAO nativa se ajustó a un modelo de dos etapas (donde la etapa A→B fue rápida, mientras que la etapa B→C fue independiente de la concentración de alcohol y muy lenta para ser catalíticamente relevante). Sin embargo, la reducción de las variantes H502S, H502A y H546A se ajustó mejor a un modelo de una etapa (con velocidades de reducción muy lentas). Los valores de las constantes de reducción observadas (k_{obs}), a las distintas

concentraciones de alcohol *p*-metoxibencílico, obedecen la ecuación de Michaelis-Menten, permitiendo la determinación de las constantes de reducción (k_{red}) y disociación (K_{d}) (**Tabla 2**). Estos valores están relacionados con los valores de k_{cat} y K_{m} de estado estacionario, confirmando que la semi-reacción de reducción es la etapa limitante durante la catálisis de la AAO. Los valores de la k_{red} para las variantes H546A, H502S y H502A fueron 35, 1250 y 1830 veces menores, respectivamente, respecto a la AAO nativa. También se observó una notable disminución de la afinidad (con unos valores de K_{d} de 50 a 200 veces más altos).

3.6 Semi-reacción de oxidación

Empleando la técnica anterior se estudió también la semi-reacción de oxidación. Tal y como muestra la **Figura 8**, la oxidación de la flavina desde la forma hidroquinona a la forma oxidada se ajusta a un modelo de dos etapas. En la AAO y la variante H546A la etapa A→B fue rápida y dependiente de la concentración de O_2 , y la etapa B→C fue más lenta e independiente de la concentración de O_2 ; mientras que en las variantes H502S y H502A ambas etapas rápida (A→B) y lenta (B→C) fueron dependientes de la concentración de O_2 , sugiriendo que durante la reoxidación de estas variantes tienen lugar dos procesos diferentes. Las constantes de reoxidación observadas se estimaron a partir del incremento a las mismas longitudes de onda mencionadas anteriormente (462 o 467 nm), para las diferentes concentraciones de O_2 . En todos los casos, al representar las constantes observadas de reoxidación (k_{obs}) para la etapa rápida (A→B), frente a la concentración de oxígeno se observó una dependencia lineal de las velocidades de reoxidación frente a la concentración de oxígeno (**Figura 9**), calculándose unas constantes de reoxidación de segundo orden ($^{\text{app}}k_{\text{ox1}}$) que se resumen en la **Tabla 2**. La $^{\text{app}}k_{\text{ox1}}$ para la variante H546A fue 1.3 veces menor respecto a la AAO nativa, mientras que los valores de $^{\text{app}}k_{\text{ox1}}$ de las variantes H502S y H502A fueron 12 y 6 veces menores, respectivamente.

Tabla 2

Constantes cinéticas de estado transitorio para la reducción por el alcohol *p*-metoxibencílico y su reoxidación por el O₂ de la AAO nativa y las variantes de la His502 e His546^a

	Reducción			Reoxidación	
	k_{red} (s ⁻¹)	K_{d} (μM)	$k_{\text{red}}/K_{\text{d}}$ (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	^{app} k_{ox1} (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	^{app} k_{ox2} (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
AAO	139 ± 16	26 ± 5	5350 ± 1200	657 ± 24	nd ^b
H502S	0.111 ± 0.002	4740 ± 184	0.023 ± 0.001	56 ± 1	18 ± 2
H502A	0.076 ± 0.001	3180 ± 74	0.024 ± 0.001	115 ± 1	8 ± 1
H546A	3.96 ± 0.01	1308 ± 30	3.03 ± 0.07	491 ± 8	nd
F501A ^c	35 ± 5	153 ± 2	229 ± 33	8 ± 1	nd ^d

^aLas constantes de estado transitorio para la reducción de la AAO por el alcohol (incluyendo las constantes de primer orden y las constantes aparentes de segundo orden) y reoxidación por el O₂ (constantes de segundo orden), las últimas incluyen dos constantes (^{app} k_{ox1} y ^{app} k_{ox2}) correspondientes a la etapa rápida (A→B) y lenta (B→C) de la reacción de reoxidación, fueron determinadas en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, a 12 °C. ^bnd, no determinado debido a que no hay dependencia del O₂. ^cDe Hernández-Ortega et al. (2011b). ^dno determinado porque no se observó la segunda etapa. Se muestran los valores medios y el error standard.

3.7 Estudios de KIE

La **Figura 10** (y la **Tabla 3**) muestran el KIE del sustrato para las constantes cinéticas aparentes obtenidas durante la oxidación de los alcoholes α-dideuterado (²H₂) y α-monodeuterados (*R*-²H y *S*-²H) estimados para cada una de las nueve concentraciones ensayadas. Previamente se describió un comparación similar para los valores de KIE a diferentes concentraciones de O₂ (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b). En ambos casos, el KIE para la k_{cat} aparente (estimado para cada concentración de O₂ o alcohol) se incrementa hasta alcanzar una concentración saturante. La **Figura 10** muestra también como los valores de ^D(^{app} $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) son mayores a las concentraciones de alcohol más bajas, mientras que los valores de ^D(^{app} $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}}$) fueron constantes a todas las concentraciones de O₂ utilizadas (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b).

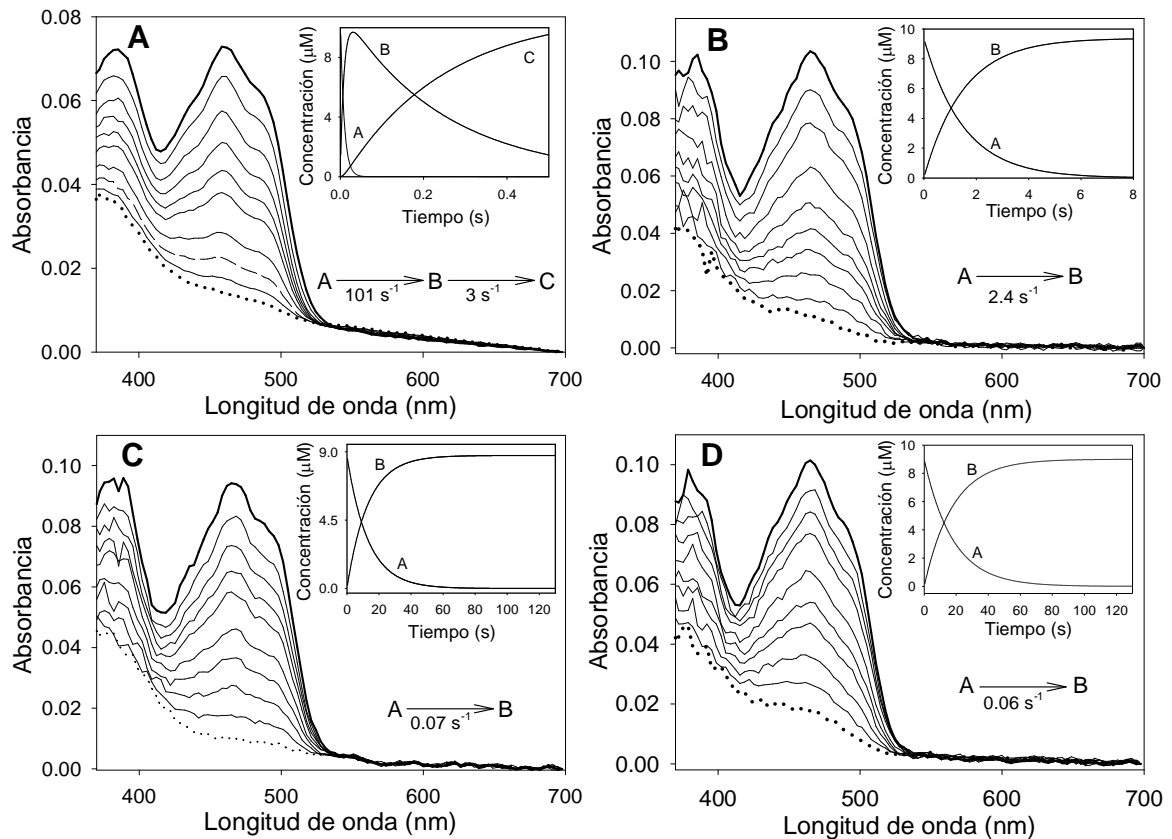


Figura 7. Cambios en el espectro de absorción durante la reducción de la AAO y las variantes en la His546 y la His502 por el alcohol *p*-metoxibencílico. Se registraron los espectros a diferentes tiempos durante la reducción en anaerobiosis de la enzima ($\sim 9 \mu\text{M}$) con el alcohol *p*-metoxibencílico (a concentración saturante 1-10 mM) en un equipo de mezcla rápida con flujo detenido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o a $12 \text{ }^\circ\text{C}$ para la AAO nativa. **(A)** AAO nativa, espectros a 1, 4, 6, 9, 12, 15, 22, 32, 93 y 255 ms. **(B)** H546A, espectros a 40, 240, 450, 860, 1270, 1680, 2080, 2700, 4000 y 8000 ms. **(C)** H502S, espectros a 0.33, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 22, 32 y 60 s. **(D)** H502A, espectros a 0.33, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 26, 42 y 80 s. Los insertos muestran la concentración de las especies espectrales obtenidas tras el ajuste global de los datos experimentales a un modelo de una ($A \rightarrow B$) o dos etapas ($A \rightarrow B \rightarrow C$). Los espectros inicial y final corresponden a la enzima oxidada y reducida, mostrados en la figura principal con línea gruesa o punteada, respectivamente, mientras que la línea de trazos en **A** muestra el espectro con mayor concentración de la especie B.

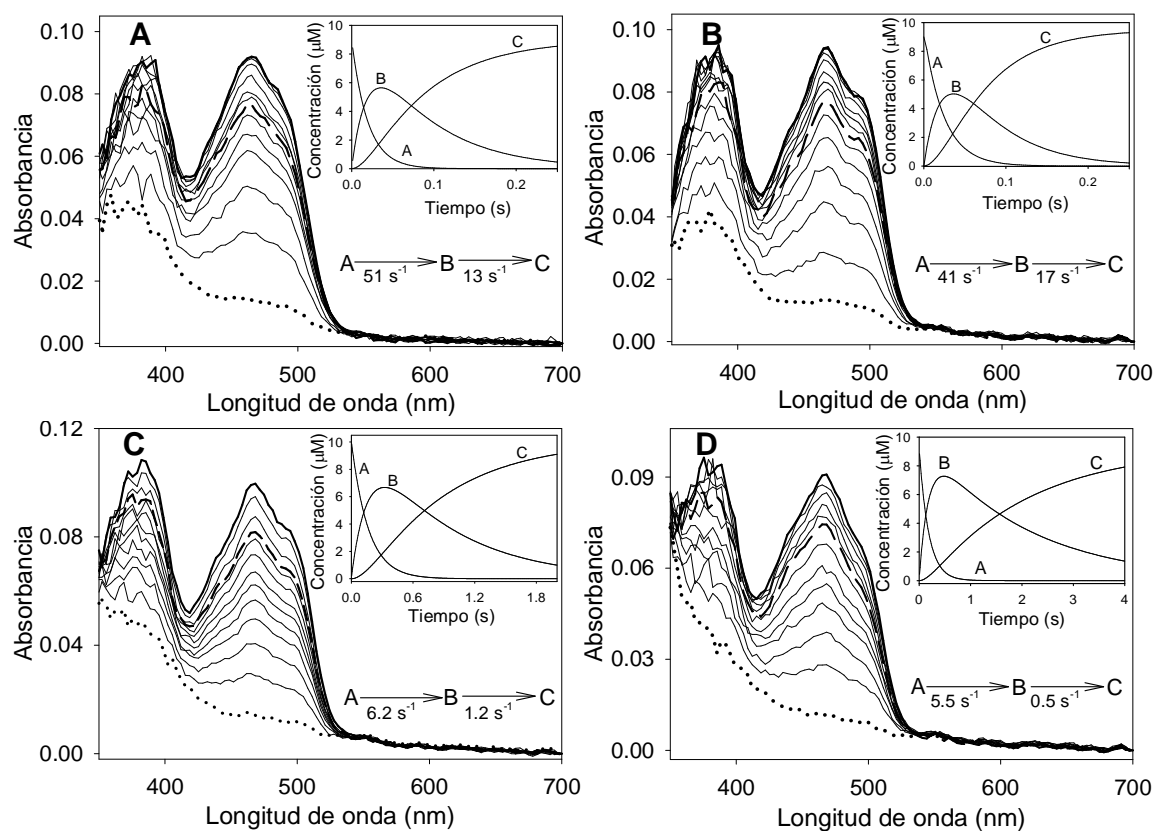


Figura 8. Cambios en el espectro de absorción durante la oxidación de la AAO nativa y las variantes de la His546 y la His502 en presencia de O₂. Se registraron los espectros a diferentes tiempos de reoxidación de la enzima reducida (~9 μM) con una concentración de O₂ 75 μM en tampón fosfato 0.1 M, pH 6, empleando un equipo de mezcla rápida con flujo detenido a 12 °C. (A y B) Espectros de la AAO y la variante H546A, respectivamente, a 2, 9, 17, 24, 32, 40, 47, 55, 63, 70, 93, 125, 150 y 175 ms. (C) H502S, espectros a 9, 60, 112, 163, 214, 265, 316, 419, 520, 620, 830, 1230 y 1650 ms. (D) H502A, espectros a 9, 60, 112, 163, 214, 265, 370, 520, 620, 830, 1650, 2470 y 3900 ms. Los insertos muestran la concentración de las especies espectrales obtenidas tras el ajuste global de los datos experimentales a un modelo de una (A→B) o dos etapas (A→B→C). En el panel principal se indican los espectros con mayores contribuciones de: A (línea punteada), B (línea discontinua) y C (línea gruesa superior).

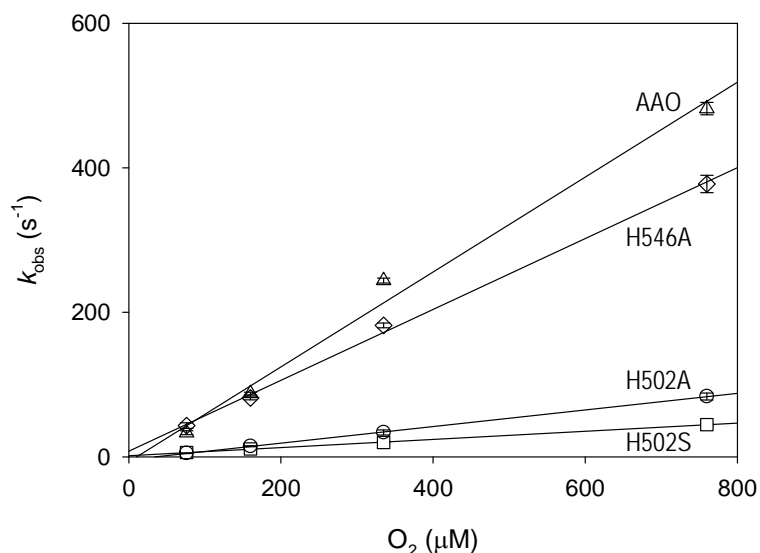


Figura 9. **Velocidades de oxidación de la AAO y sus variantes en la His546 y la His502 a diferentes concentraciones de oxígeno.** Para estudiar la dependencia de la reoxidación respecto a la concentración de O₂, se mezclaron las muestras de enzima previamente reducidas con el tampón equilibrado a concentraciones de O₂ 76, 160, 334 y 760 μM, en las mismas condiciones descritas en la **Figura 8**. Las velocidades de reoxidación observadas (k_{obs} correspondientes a la etapa A→B) se estimaron a partir del incremento de absorbancia a 462 nm (AAO nativa) o 467 nm (variantes). Los ensayos se llevaron a cabo a 12 °C y los datos se ajustaron a la Ec. 7.

Tabla 3

KIE del sustrato y del solvente para las constantes cinéticas aparentes de estado estacionario - $^{app}k_{cat}$, $^{app}K_{m(Ox)}$ y $^{app}k_{cat}/K_{m(Ox)}$ - en presencia de las formas (R)-[α - 2 H], (S)-[α - 2 H] y [α - 2 H $_2$] del alcohol *p*-metoxibencílico, y KIE del solvente, a diferentes concentraciones de alcohol^a

	$^{app}k_{cat}$	$^{app}K_{m(Ox)}$	$^{app}k_{cat}/K_{m(Ox)}$
alcohol 3.90 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.48 \pm 0.02	1.64 \pm 1.22	2.12 \pm 0.84
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.21 \pm 0.02	0.91 \pm 0.67	1.34 \pm 0.90
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.98 \pm 0.02	0.71 \pm 0.42	5.64 \pm 0.65
Tampón D $_2$ O	0.09 \pm 0.05	0.28 \pm 0.16	3.26 \pm 2.78
alcohol 7.81 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.68 \pm 0.04	2.31 \pm 0.71	1.55 \pm 0.49
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.19 \pm 0.01	0.85 \pm 0.13	1.41 \pm 0.16
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.13 \pm 0.03	1.04 \pm 0.16	3.93 \pm 0.39
Tampón D $_2$ O	0.92 \pm 0.04	0.43 \pm 0.07	2.16 \pm 1.10
alcohol 15.6 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	3.71 \pm 0.01	2.26 \pm 0.26	1.63 \pm 0.08
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.19 \pm 0.02	0.96 \pm 0.10	1.26 \pm 0.09
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.41 \pm 0.02	1.95 \pm 0.22	2.26 \pm 0.12
Tampón D $_2$ O	1.01 \pm 0.03	0.72 \pm 0.09	1.40 \pm 0.56
alcohol 31.25 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.34 \pm 0.02	2.83 \pm 0.27	1.41 \pm 0.08
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.24 \pm 0.01	1.16 \pm 0.10	1.06 \pm 0.05
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	5.18 \pm 0.05	3.19 \pm 0.34	1.59 \pm 0.14
Tampón D $_2$ O	1.15 \pm 0.03	0.96 \pm 0.09	1.19 \pm 0.38
alcohol 62.5 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.44 \pm 0.01	2.85 \pm 0.20	1.49 \pm 0.05
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.19 \pm 0.02	1.17 \pm 0.08	1.05 \pm 0.02
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	6.38 \pm 0.03	3.45 \pm 0.25	1.65 \pm 0.06
Tampón D $_2$ O	1.28 \pm 0.02	1.15 \pm 0.08	1.08 \pm 0.28
alcohol 125 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.44 \pm 0.01	2.79 \pm 0.13	1.56 \pm 0.01
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.19 \pm 0.02	1.04 \pm 0.05	1.14 \pm 0.06
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	6.38 \pm 0.03	3.94 \pm 0.22	1.58 \pm 0.04
Tampón D $_2$ O	1.31 \pm 0.02	1.21 \pm 0.06	1.05 \pm 0.24
alcohol 250 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.61 \pm 0.03	2.97 \pm 0.12	1.52 \pm 0.05
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.22 \pm 0.03	1.10 \pm 0.04	1.10 \pm 0.07
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	6.74 \pm 0.07	4.23 \pm 0.23	1.56 \pm 0.09
Tampón D $_2$ O	1.31 \pm 0.02	1.30 \pm 0.05	1.00 \pm 0.22
alcohol 500 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.70 \pm 0.04	3.01 \pm 0.15	1.53 \pm 0.06
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.24 \pm 0.03	1.11 \pm 0.05	1.11 \pm 0.08
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	7.04 \pm 0.05	4.48 \pm 0.25	1.53 \pm 0.06
Tampón D $_2$ O	1.32 \pm 0.02	1.33 \pm 0.06	1.00 \pm 0.22
alcohol 1000 μM			
(R)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	4.75 \pm 0.01	3.68 \pm 0.15	1.25 \pm 0.02
(S)-[α - 2 H]- <i>p</i> -metoxibencílico	1.18 \pm 0.04	1.12 \pm 0.05	1.05 \pm 0.10
[α - 2 H $_2$]- <i>p</i> -metoxibencílico	7.07 \pm 0.06	5.33 \pm 0.29	1.00 \pm 0.22
Tampón D $_2$ O	1.31 \pm 0.02	1.56 \pm 0.07	1.01 \pm 0.23

^aLas constantes cinéticas aparentes fueron determinadas empleando nueve concentraciones de alcohol en fosfato 0.1 M, pH 6, a 25 °C. Los valores de KIE del sustrato y del solvente se calcularon como el cociente entre la actividad determinada con el alcohol protiado/deuterado y tampón en H $_2$ O/D $_2$ O, respectivamente (empleando la Ec. 5). Se muestran los valores medios y el error standard.

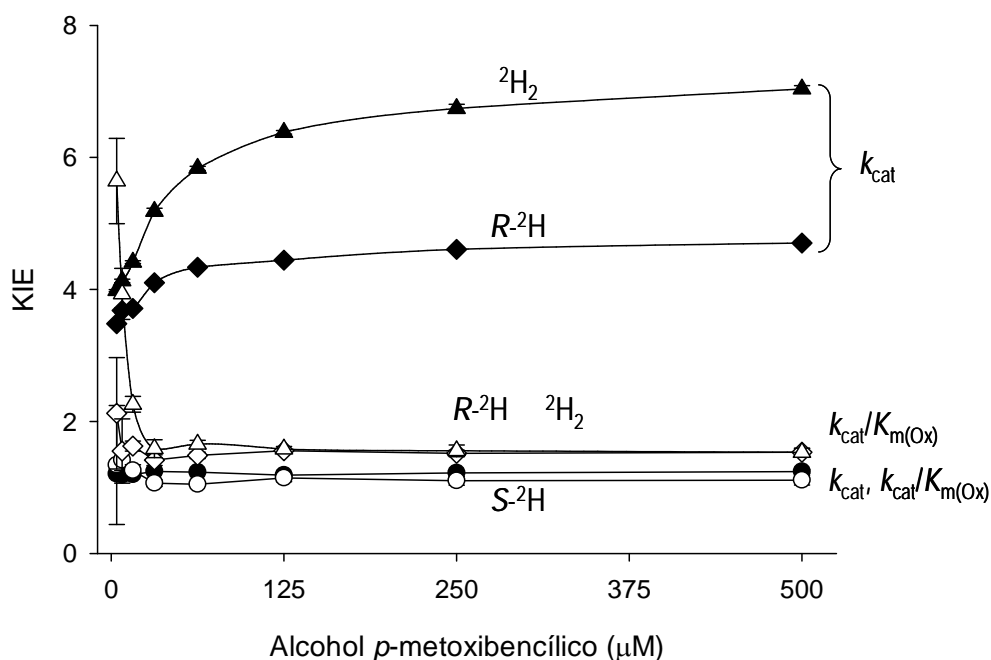


Figura 10. Efecto de la concentración de alcohol sobre el KIE de la k_{cat} y la eficiencia catalítica para el O_2 . Los valores de KIE para las constantes cinéticas aparentes (k_{cat} y $k_{cat}/K_m(Ox)$) obtenidas en presencia del alcohol *p*-metoxibencílico α -monodeuterado ($R\text{-}^2H$ y $S\text{-}^2H$) y α -dideuterado (2H_2) fueron determinados a nueve concentraciones diferentes de alcohol, a 25°C. Los datos fueron ajustados a la Ec. 5.

A partir de los parámetros cinéticos obtenidos mediante las cinéticas bisustrato anteriores, se determinó el KIE de la eficiencia catalítica para el alcohol y el O_2 (Tabla 4). El valor más alto de $^D(k_{cat})$ encontrado para el alcohol *p*-metoxibencílico α -dideuterado y (*R*)- α -monodeuterado (7.9 y 5.2, respectivamente) mostró que la deuteración del alcohol en posición α afecta a la catálisis de la AAO. Además, los valores de $^D(k_{cat}/K_m(Al))$ de 3.9 y 3.6, para el alcohol α -dideuterado y (*R*)- α -monodeuterado, respectivamente, mostraron que este efecto se debe a la disminución de la velocidad de reacción con el alcohol, comparados con el valor de 1.2 para el enantiómero deuterado en (*S*). También se obtuvieron valores pequeños pero significativos de $^D(k_{cat}/K_m(Ox))$ cuando se emplearon como sustratos reductores los alcoholes α -dideuterado y (*R*)- α -monodeuterado (1.6 y 1.5, respectivamente). Sin embargo, cuando se utilizó el alcohol (*S*)-monodeuterado, no se encontró un efecto KIE para la eficiencia frente al O_2 , ya que no tiene lugar la transferencia del deuterio al N5 de la flavina debido a que dicha transferencia en la AAO es estereoselectiva.

También se investigó el KIE del solvente para las constantes de velocidad y las eficiencias catalíticas frente al alcohol y el O_2 . Los valores de $^{D2O}(k_{cat}/K_m(Al))$ y $^{D2O}k_{cat}$ obtenidos (1.5-1.6) y la ausencia de un efecto de la viscosidad (Tabla 4) indican que la abstracción de un hidrógeno

intercambiable con el solvente (probablemente el protón del grupo hidroxilo del alcohol) por la His502 catalítica, limita parcialmente la oxidación del alcohol en la AAO. Sin embargo, no se detectó ningún KIE significativo del solvente ni un efecto de la viscosidad en la eficiencia frente al oxígeno (**Tabla 4**).

Tabla 4

KIE del sustrato y del solvente y efecto de la viscosidad para la k_{cat} y las eficiencias catalíticas para el alcohol (Al) y el O₂ (Ox) en condiciones de estado estacionario^a

	k_{cat}	$k_{cat}/K_m(Al)$	$k_{cat}/K_m(Ox)$
(R)-[α - ² H]- <i>p</i> -metoxibencílico	5.18 ± 0.09	3.59 ± 0.12	1.53 ± 0.06
(S)-[α - ² H]- <i>p</i> - metoxibencílico	1.37 ± 0.02	1.25 ± 0.05	1.15 ± 0.05
[α - ² H ₂]- <i>p</i> - metoxibencílico	7.87 ± 0.09	3.91 ± 0.13	1.57 ± 0.06
KIE del solvente (D ₂ O)	1.49 ± 0.02	1.59 ± 0.08	1.07 ± 0.05
Efecto de la viscosidad (30% glicerol)	0.99 ± 0.01	1.03 ± 0.04	1.01 ± 0.04

^a Los valores máximos de KIE del sustrato y del solvente se determinaron como el cociente entre la actividad sobre alcohol *p*-metoxibencílico α -protiado/ α -deuterado o en tampón con H₂O/D₂O (empleando alcohol α -protiado), respectivamente. El efecto de la viscosidad se determinó como el cociente entre la actividad con alcohol α -protiado en tampón normal y en presencia de glicerol. Todos los valores de KIE se calcularon a partir de los valores de las constantes cinéticas máximas determinadas mediante cinéticas bisustrato donde se varían simultáneamente las concentraciones de oxígeno y alcohol. Se muestran los valores medios y el error standard.

3.8 Cálculos QM

En primer lugar se simuló la reducción del O₂ por la forma hidroquinona de la flavina a través de cálculos QM, incluyendo únicamente el O₂ y el anillo de flavina. Para este sistema simple se encontró que la optimización libre (*unrestrained*) en el estado singlete produce una situación final en la que el O₂ está unido al C4a de la flavina (1.50 Å) y se transfiere un protón desde el N5 de la flavina al átomo libre de oxígeno. La **Figura 11A-B** muestra el estado optimizado de los reactivos y los productos en los estados triplete y singlete, respectivamente.

La **Figura 12** muestra el perfil de energía potencial de la reacción. La observación de los perfiles de energía que siguen un análisis de transito lineal muestra que la inversión del *spin* ocurre a 1.98 Å y que la diferencia de energía (E1) entre los estados triplete y singlete de los reactivos fue ~21.7 kcal·mol⁻¹. La barrera energética de activación (E2) fue de 14.2

$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ mientras que la energía del proceso completo (E3) fue $-5.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que revela un proceso exotérmico que favorece termodinámicamente la formación de los productos.

Los resultados anteriores fueron calculados en fase gaseosa, pero también se optimizaron los cálculos en agua (con una constante dieléctrica de ~ 80) y en cloroformo (con una constante dieléctrica similar al ambiente de la proteína, ~ 4). Se encontraron diferencias de energía entre las distintas fases, siendo considerablemente menor en agua ($14.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), mientras que en cloroformo ($19.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) la diferencia fue similar a la obtenida en fase gaseosa.

3.9 Cálculos QM/MM

Posteriormente se emplearon cálculos QM/MM para predecir la reducción del O_2 por la forma hidroquinona de la flavina en el centro activo de la AAO. En este estudio se emplearon tres regiones QM diferentes. Se comenzó optimizando los estados singlete y triplete de los reactivos y los productos (**Figura 11C y D**). Curiosamente, cuando se optimiza libremente el estado singlete (es decir, sin restricciones en la distancia O-C4a) no tiene lugar la formación de un aducto del O_2 con el C4a. En su lugar ocurre una eliminación de dos electrones y un protón con el O_2 a una distancia O-C4a de unos 2.2 \AA de la flavina pero sin que tenga lugar la formación de un enlace. El perfil de energía potencial mostró que la inversión de *spin* tiene lugar a una distancia 2.16 \AA , mientras que E1 se redujo a $14.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, y E2 y E3 fueron 6.5 y $-11.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente (**Figura 12**). Al comparar la reacción en fase gaseosa con un sistema modelo idéntico, se puede observar el efecto del entorno de la proteína en el perfil energético de la reacción. La diferencia de energía entre el estado singlete y triplete de los reactivos disminuyó desde 21.7 a $14.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ indicando un efecto estabilizador de la proteína sobre la energía del estado singlete excitado. Además, el hecho de que la inversión del *spin* tenga lugar más cerca de los reactivos, reduce significativamente la barrera de activación. Se incrementó la estabilidad termodinámica de los productos con una reacción más exotérmica (5.3 frente a $11.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Para el sistema en el que se incluye la His502 en la región cuántica se observó que, al optimizar el estado singlete libremente, la formación del producto H_2O_2 tuvo lugar sin la formación de un aducto en el C4a (**Figura 11E y F**), tal y como se observaba con el sistema QM/MM FAD+ O_2 . La reacción tuvo lugar mediante la aproximación de la molécula de O_2 a la región C4a-N5 de la flavina, donde ocurre la abstracción de un protón del N5 (y dos electrones de la flavina), y una segunda transferencia de protón desde la His502.

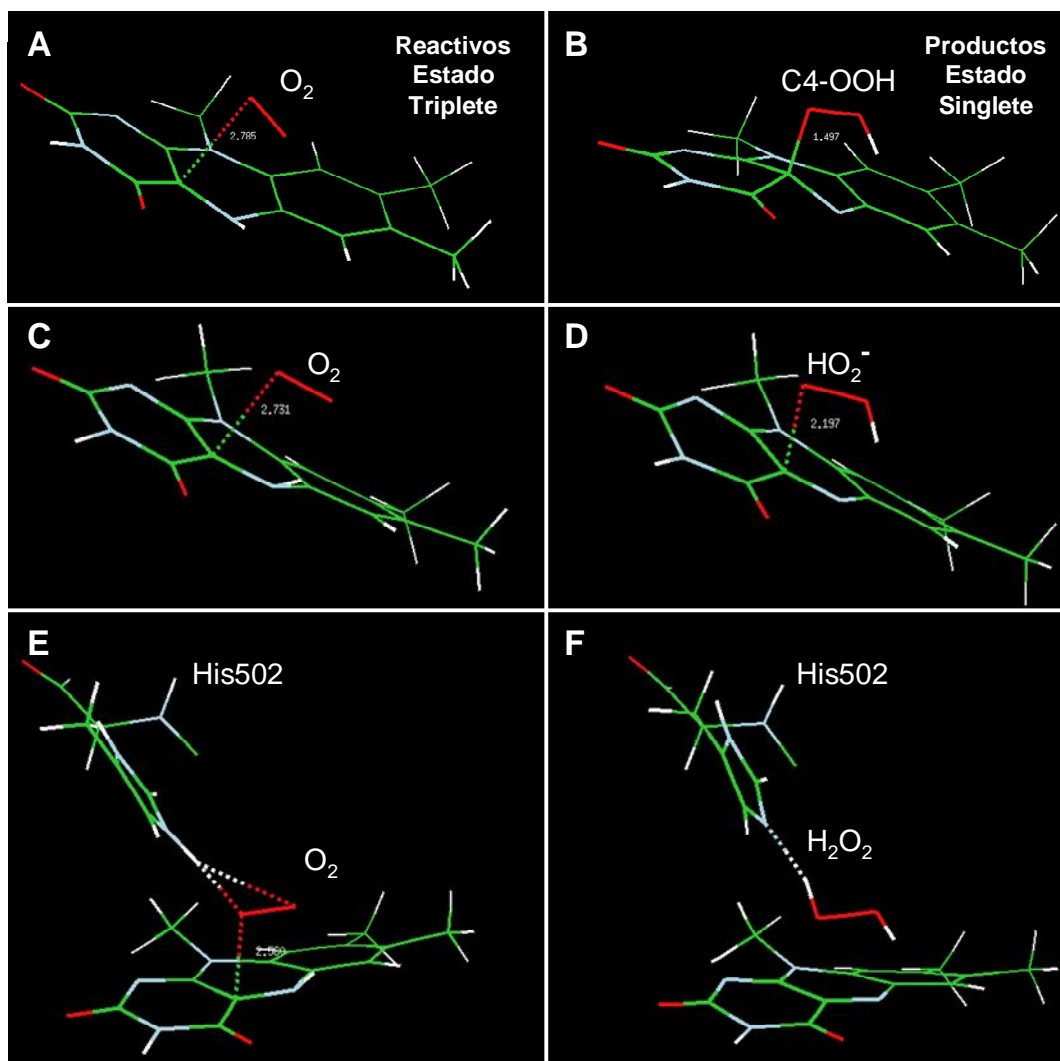


Figura 11. Estado de los reactivos y los productos tras las simulaciones QM y QM/MM de la reducción del O_2 por la flavina libre o unida a la AAO. (A y B) Optimización QM pura para el sistema modelo aislado, constituido únicamente por la flavina libre y el O_2 . (C y D) Optimización QM/MM para el sistema FAD+ O_2 en la AAO. (E y F) Optimización QM/MM para el sistema FAD+ O_2 +His502 en la AAO. A la izquierda se muestra la estructura optimizada de los reactivos (estado triplete), mientras que a la derecha se muestran los diferentes productos (estado singlete), incluyendo el aducto C4a-hidroperóxido (B), el anión superóxido (D) y el H_2O_2 (F). Los cálculos QM/MM están basados en la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM) tras la difusión y el acoplamiento molecular del O_2 utilizando el programa *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005) tal y como se ha descrito previamente (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b).

La exploración sistemática de la energía potencial para ambos estados de *spin* (**Figura 12**), tal y como se ha hecho para los sistemas previos, muestra que la inversión del *spin* ocurre a 2.19 Å, una distancia similar a la encontrada previamente para el sistema QM/MM FAD+O₂, y siendo ahora E1 10.0 kcal·mol⁻¹, mientras que E2 y E3 fueron 4.6 y -27.3 kcal·mol⁻¹, respectivamente.

Todas las energías discutidas antes y las determinadas para el sistema FAD+O₂+His502+His546, donde se incorpora la segunda histidina del centro activo, se resumen en la **Tabla 5**. Las energías obtenidas incrementando el tamaño de la región QM en los cálculos QM/MM, convergen hacia valores similares. Esto indica que la descripción del centro activo se obtiene de forma correcta con un sistema FAD+O₂+His502, mientras que el sistema FAD+O₂ es demasiado pequeño (consistente con la relevancia de la His502 en el mecanismo de reacción).

Los cálculos anteriores de QM y QM/MM fueron realizados empleando un set básico M06/6-31G(d,p), aunque se obtuvieron resultados similares empleando M06/6-311G(d,p) y M06/6-311G(3df,3pd)+, tal y como se observa en la **Figura 13** para las simulaciones QM del sistema FAD-O₂ (comparada con la **Figura 12**).

Tabla 5

Energías de reducción del O₂ (kcal·mol⁻¹) y punto de inversión del *spin* (distancia al C4a de la flavina, Å) en los diferentes sistemas QM y QM/MM estudiados^a

	QM	QM/MM		
	FAD+O ₂	FAD+O ₂	FAD+O ₂ + +H502	FAD+O ₂ + H502+H546
E1	21.71	14.23	10.03	11.10
E2	14.17	6.53	4.60	4.63
E3	-5.29	-11.18	-27.31	-24.70
Punto de inversión	1.98	2.16	2.19	2.19

^aE1, diferencia de energía entre los reactivos en estado triplete y singlete; E2, energía requerida por la reacción en el punto donde ocurre la inversión del *spin*; y E3, diferencia de energía entre el estado triplete de los reactivos y el estado singlete de los productos. Para mayor detalle observar las **Figuras 11 y 12**.

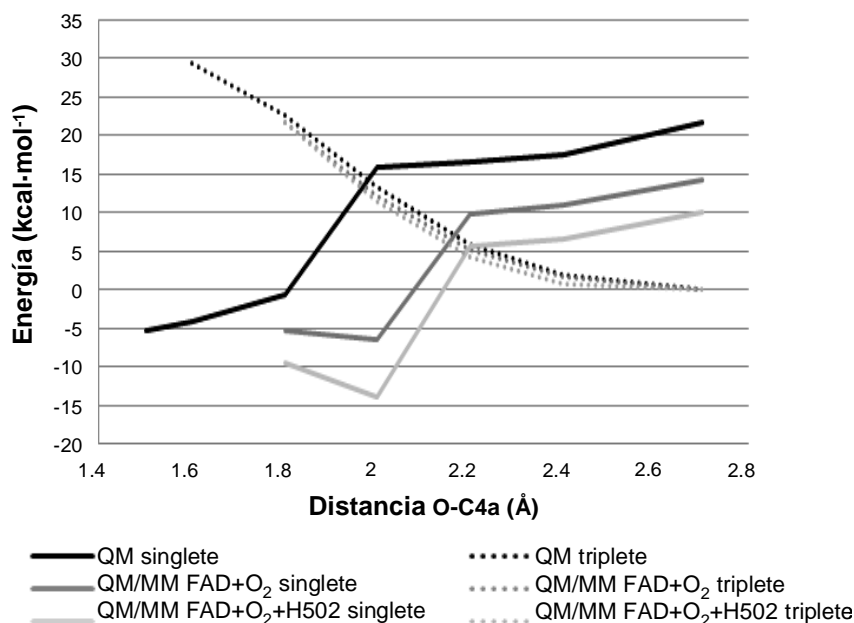


Figura 12. **Perfiles de energía QM y QM/MM para la reducción del O₂ por la flavina libre y unida a la AAO.** Se calculó la energía potencial en función de la distancia O (O₂)-C4a (FAD) para los distintos sistemas modelo.

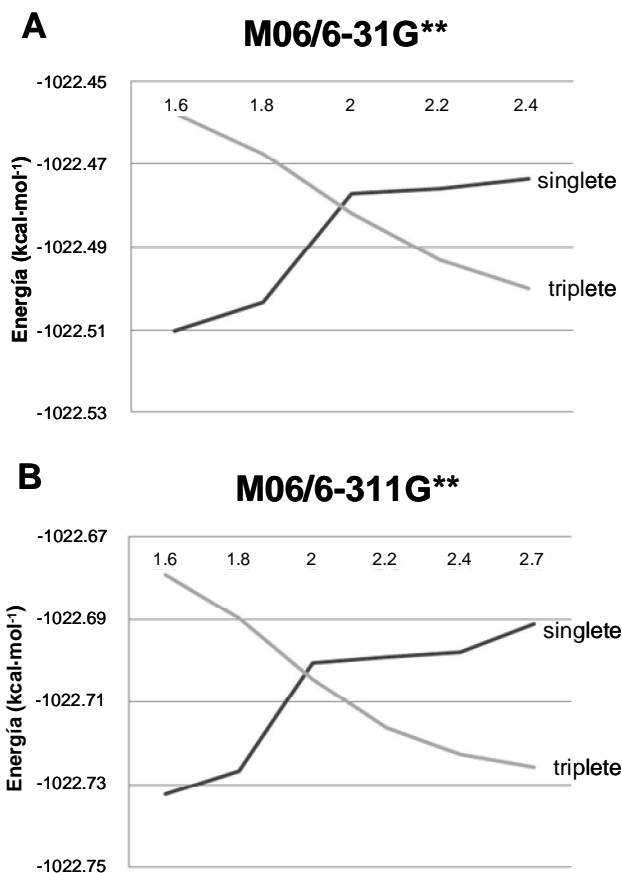


Figura 13. **Perfiles de energía potencial en función de la distancia O (O₂)-C4a (FAD).** Las optimizaciones fueron llevadas a cabo con (A) M06/6-31G** y (B) M06/6-311G**.

4. DISCUSIÓN

4.1 Residuos conservados en el centro activo de las oxidorreductasas GMC

Nakanishi et.al. (1984) describieron, por primera vez, la existencia de un residuo esencial de histidina en el centro activo de una oxidorreductasa GMC tras modificar químicamente la glucosa oxidasa de *A. niger*. Las estructuras cristalográficas de las oxidorreductasas GMC han mostrado que existen dos residuos en el centro activo, His-His o His-Asn, cuya posición cerca del cofactor de flavina está estructuralmente conservada, sugiriendo su importancia en la catálisis. En la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (Fernández *et al.*, 2009), los residuos His502 e His546 ocupan, respectivamente, una posición equivalente a los residuos His516 e His559 de la glucosa oxidasa de *A. niger* (Hecht *et al.*, 1993), His548 y Asn593 de la piranosa 2-oxidasa de *T. ochracea* (Hallberg *et al.*, 2004), His447 y Asn485 de la colesterol oxidasa de *B. sterolicum* (Vrieling *et al.*, 1991), His466 y Asn510 de la colina oxidasa de *A. globiformis* (Quaye *et al.*, 2008), y His689 y Asn732 del dominio de flavina de la celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (Hallberg *et al.*, 2002). Aunque no está disponible la estructura cristalográfica de la metanol oxidasa de *Candida boidinii*, el alineamiento múltiple de secuencia muestra la correspondencia con los residuos His567 y Asn616 (Sakai y Tani, 1992).

La glucosa oxidasa es una de las flavoenzimas mejor investigadas debido a su interés comercial en kits de análisis, biosensores etc. (Bankar *et al.*, 2009). Tras la resolución de la estructura cristalográfica de la glucosa oxidada de *A. niger*, se postuló que uno de los dos residuos de histidina anteriormente citados actuaría como base catalítica durante la semi-reacción de reducción activando la glucosa, y como ácido catalítico durante la semi-reacción de oxidación transfiriendo el protón a la molécula de O₂ para la formación del H₂O₂ (Wohlfahrt *et al.*, 1999). Tras el modelado por homología de la AAO, empleando como molde la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa, se sugirió un papel idéntico para los residuos His502 e His546 de la AAO (Varela *et al.*, 2000). La AAO posee también un interés biotecnológico (Hernández-Ortega *et al.*, 2012a), no solo por su contribución durante la degradación de la lignina (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009), y en la síntesis de aromatizantes (Lapadatescu *et al.*, 2000) sino también debido a su mecanismo de oxidación estereoselectivo (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b). Por lo tanto, tras la expresión de la AAO de *P.eryngii* en *E. coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006), se han publicado una serie de trabajos abordando diferentes aspectos de su estructura y mecanismo catalítico (Ferreira *et al.*, 2006; 2009; 2010; Hernández-Ortega *et al.*, 2011a;

Hernández-Ortega *et al.*, 2012b). En estos trabajos se ha considerado el papel de los residuos His502 e His546 en la semi-reacción de reducción.

4.2 Posición de los sustratos (alcohol y O₂) y los residuos de histidina en el centro activo de la AAO

La estructura cristalográfica de la AAO muestra que los residuos His502 e His546 se localizan frente al lado *re* de la flavina a ~ 4 Å y ~ 5 Å, respectivamente, de los átomos N5 y C4a implicados en la catálisis (Mattevi, 2006; Gadda, 2008) y que una molécula de agua ocupa el centro activo en ausencia de los sustratos, equidistante del N5 y la His502 (pero más lejos de la His546). Puesto que no se dispone de la estructura cristalográfica de la AAO en presencia de sustratos (o análogos), debido a que el centro activo está aislado del solvente (Fernández *et al.*, 2009), una de los primeros aspectos que se abordó para poder estudiar las semi-reacciones de reducción y oxidación fue difundir ambos sustratos desde la superficie de la proteína y colocarlos en una posición catalítica.

La difusión y *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico y el O₂ se llevó a cabo utilizando el algoritmo *PELE* desarrollado por Borrelli *et al.* (2005) dando lugar al resultado mostrado en la **Figura 14** que muestra la posición determinada para ambos sustratos entre el anillo de flavina y las cadenas laterales de los residuos His502, His546, Tyr92 y Phe501.

La Tyr92 participaría en la unión del alcohol a través de interacciones de *stacking* entre los anillos del alcohol aromático y la Tyr92 (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a); mientras que la Phe501 contribuiría a la semi-reacción de oxidación tal y como muestra el descenso (60-80 veces) de las constantes $k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Ox)}}$ y $^{\text{app}}k_{\text{ox}}$ en la variante F501A (**Tablas 1 y 2**), ayudando a la molécula de O₂ a alcanzar una posición catalítica cerca del locus N5-C4a de la flavina (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b). Las posiciones relativas que ocupan tanto el carbono- α del sustrato como la molécula de O₂ están muy próximas al átomo de oxígeno de la molécula de agua 586 de la estructura cristalográfica.

4.3 Mecanismo de oxidación del alcohol

Tal y como se había avanzado previamente (Ferreira *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012b) el elevado valor de $^{\text{D}}(k_{\text{cat}}/K_{\text{m(Al)}})$ observado durante la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico α -dideuterado, confirma que la abstracción de uno de los dos hidrógenos- α por la flavina constituye la principal etapa limitante en la semi-reacción de reducción, de acuerdo con el mecanismo de transferencia de hidruro descrito para otras oxidorreductasas GMC (Gadda, 2008). Los cálculos de QM/MM tras *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico en el centro activo de la

AAO (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a) confirmaron la posición de los tres sustituyentes del carbono- α mostrados en la **Figura 14A**. Esta posición implica una eliminación selectiva del hidrógeno en posición pro-*R* por el N5 de la flavina, que fue confirmada por el elevado KIE observado para el enantiómero (*R*) del alcohol *p*-metoxibencílico α -monodeuterado frente al enantiómero (*S*). Estos resultados fueron la primera demostración de una transferencia estereoselectiva de hidruro en una oxidorreductasa GMC, y mostraron el interés de la enzima nativa o sus variantes mejoradas para la desracemización de mezclas de alcoholes quirales secundarios, tal y como se demostró mediante HPLC quiral (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b).

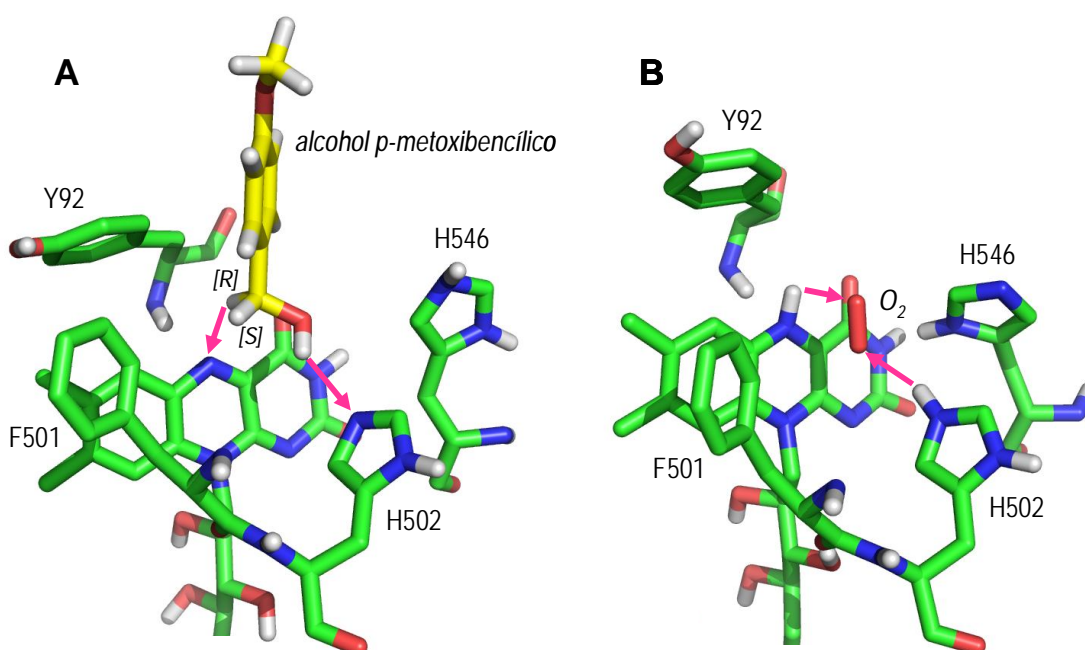


Figura 14. **Posición de los sustratos oxidante y reductor en el centro activo de la AAO.** (A) Acoplamiento molecular del alcohol *p*-metoxibencílico antes de su oxidación por la AAO, implicando la abstracción del protón del grupo hidroxilo y el hidrógeno- α en posición pro-*R* (flechas cian) por la His502 y el N5 de la flavina, respectivamente (el hidrógeno en forma de hidruro). (B) Acoplamiento del O₂ antes de su reducción a H₂O₂ por la enzima, implicando dos transferencias de protón (flechas cian) (junto con dos abstracciones sucesivas de un electrón desde la flavina). La migración y acoplamiento de sustratos en el centro activo se realizó mediante *PELE* (Borrelli *et al.*, 2005) utilizando la estructura cristalográfica de la AAO (PDB 3FIM), tal y como se ha descrito previamente (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a; 2011b).

El mecanismo de reacción consenso en las oxidorreductasas GMC incluye una base catalítica activando el sustrato a su forma alcóxido, un hecho que en la AAO es consistente con el requerimiento de un residuo desprotonado con un $pK_a \sim 3$ (observado en las variantes His546). Sin embargo, la semi-reacción de reducción de la AAO difiere de la de otros miembros de la superfamilia GMC, como la colina oxidasa (Gadda, 2008), en la ausencia de un intermediario alcóxido detectable. Este resultado está de acuerdo con el $^{D_2O}(k_{cat}/K_{m(Al)})$ observado que indica una transferencia de protón parcialmente limitante concertada con la transferencia de hidruro. Estos resultados están relacionados con la ausencia de un intermediario alcóxido estable tras la transferencia de protón en las simulaciones QM/MM de la oxidación del alcohol *p*-metoxibencílico por la AAO, mientras que las mismas simulaciones mostraron la existencia de un intermediario estable en la reacción de la colina oxidasa (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a).

Los residuos de histidina de la AAO contribuyen preferentemente a la semi-reacción de reducción limitante en la catálisis, como muestra el hecho de que todas las variantes (H502S/A y H546A) estuvieran completamente oxidadas durante el *turnover* (mientras que la AAO nativa estaba reducida en un $\sim 20\%$ bajo las mismas condiciones) así como por el efecto de la mutación sobre las constantes cinéticas de estado transitorio durante la reducción ($^{app}k_{red}$ 1770-232000 veces menor) y la reoxidación ($^{app}k_{ox}$ 1-12 veces menor). La naturaleza de base catalítica ha sido una cuestión controvertida en las oxidorreductasas GMC (Kass y Sampson, 1998; Witt *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002; Rotsaert *et al.*, 2003; Ghanem y Gadda, 2005; Rungrisuriyachai y Gadda, 2010; Wongnate *et al.*, 2011). En la AAO, la eliminación de las histidinas del centro activo afectó a la unión del alcohol, como muestra el incremento de la constante de disociación (K_d) en las variantes H502A (122 veces mayor) y H546A (50 veces mayor). Sin embargo, el efecto más importante fue producido por las mutaciones H502S/A que provocaron un severo descenso de la actividad (k_{cat} y k_{red} 1250-2500 veces menores), mientras que las mutaciones H546S/A sólo produjeron un descenso moderado (k_{cat} y k_{red} 35-50 veces menores). Además, el pK_a ácido observado en los perfiles de actividad de las variantes en la His546 pudo ser asignado a la His502, ya que este pK_a no se observó en los perfiles de las variantes His502. Estos resultados, junto a los estudios previos de estado de protonación y dinámica molecular (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a) que predijeron que la His502 estaría desprotonada en su $N\epsilon$, orientado hacia el grupo hidroxilo del sustrato, mientras que ambos $N\epsilon$ y $N\delta$ en la His546 estarían protonados (**Figura 14A**), indican claramente que la His502 actúa como la base catalítica durante la semi-reacción de reducción en la AAO.

Respecto a otras oxidorreductasas GMC, se sugirió que los residuos del centro activo homólogos a la His502 de la AAO de *P. eryngii* (ver **Figura 1**) actuarían como base catalítica en la glucosa oxidasa de *A. niger* (His516) (Meyer *et al.*, 1998; Wohlfahrt *et al.*, 1999) y *P. amagasakiense* (donde las mutaciones His→Ala/Val en la His520 homóloga provocaron un descenso en la $k_{cat}/K_m(Al)$ de 10000-80000 veces) (Witt *et al.*, 2000), y más recientemente, se ha confirmado en la piranosa 2-oxidasa de *T. ochracea* (His548) (Wongnate *et al.*, 2011) y la celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (His689) (Rotsaert *et al.*, 2003). Evidencias cristalográficas en la colesterol oxidasa, donde la His447 homóloga se encuentra protonada en su Nε, cuestionaron su papel como base catalítica en esta oxidasa, y en su lugar se ha postulado que un conjunto de residuos cargados del centro activo desempeña este papel (Lario *et al.*, 2003). Se ha planteado una hipótesis similar en la colina oxidasa, tras diferentes trabajos incluyendo estudios de mutagénesis dirigida (Ghanem y Gadda, 2005; Gadda, 2008; Rungsisuriyachai y Gadda, 2008). Sin embargo, nuestros cálculos de QM/MM sugirieron que la His466 de la colina oxidasa homóloga a la His502 de la AAO actuaría como base catalítica en esta oxidasa (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a).

4.4 Mecanismo de reducción del O₂

Se ha investigado el mecanismo de reducción del O₂ por el cofactor de la AAO (en su forma hidroquinona) incluyendo la formación de los productos (la flavina oxidada y el H₂O₂) y dos posibles intermediarios (semiquinona y C4a-hidroperóxido) empleando una combinación de técnicas experimentales y computacionales. Conociendo la existencia de un proceso de inversión de *spin*, necesario para la reacción de una molécula en estado triplete (O₂) con otra en estado singlete (FAD), se determinaron los perfiles de energía para ambos estados triplete y singlete. En primer lugar se realizaron cálculos puros de QM empleando un sistema modelo que contenía el cofactor de flavina y la molécula de O₂. Después, se realizaron los cálculos QM/MM con la estructura de la AAO empleando diferentes conjuntos para la región cuántica (mediante adiciones sucesivas de los residuos His502 e His546 a la región inicial FAD+O₂). Se esperaba que el O₂ presentara una diferencia de energía entre el estado singlete y triplete del orden de 22 kcal·mol⁻¹ que es la diferencia de energía encontrada para el sistema modelo en fase gaseosa. La introducción del entorno específico del centro activo de la AAO, a través de cálculos QM/MM mostró que la proteína provoca una disminución de ~10 kcal·mol⁻¹ en la energía anterior. Esto produjo un cambio en el mecanismo de reducción del O₂. En fase gaseosa, la formación del H₂O₂ ocurre a través de la formación de un intermediario C4a-hidroperóxido, de acuerdo con otros estudios sobre la

reducción libre del O₂ por la flavina (Kemal *et al.*, 1977). Los cálculos QM/MM mostraron además que la inversión del *spin* ocurre a una distancia mayor en comparación con los cálculos en fase gaseosa (2.2 vs. 2.0 Å), y sin que se forme un aducto del O₂ con el C4a de la flavina. Los cálculos anteriores se relacionan con los resultados experimentales discutidos a continuación.

A pesar de que durante el análisis de los datos obtenidos en los ensayos de cinética rápida de la semi-reacción de reoxidación (AAO nativa y sus variantes) se encontró un posible intermediario de reacción (especie B en la **Figura 8**), este intermediario no presentó el espectro característico del radical semiquinona de la flavina ni de la forma C4a-hidroperóxido (Massey, 2000; Sucharitakul *et al.*, 2008), siendo considerado como una especie espectroscópica inespecífica. Aunque se ha detectado tentativamente el radical semiquinona de la flavina en la glicolato oxidasa (Pennati y Gadda, 2011) gracias a su baja reactividad frente al oxígeno, este intermediario obligatorio no ha sido detectado en ninguna oxidoreductasa GMC, incluyendo la AAO, revelando que el radical semiquinona de flavina es altamente inestable. El segundo intermediario de la reacción, el C4a-hidroperóxido, no es una especie obligatoria en las oxidasas, aunque es típica de la reoxidación de las monooxigenasas, estando directamente involucrada en la reacción de transferencia del oxígeno (Mattevi, 2006). Sin embargo, recientemente se ha encontrado un intermedio flavina-hidroperóxido estable en la piranosa-2 oxidasa (Sucharitakul *et al.*, 2008), y en la colina oxidasa se ha observado un aducto de la flavina con el oxígeno durante la exposición a los rayos X (Orville *et al.*, 2009). Por tanto, la ausencia de los intermediarios anteriores en la AAO está relacionada con lo que previamente se ha observado en la mayoría de las oxidoreductasas GMC.

En contraste a lo observado durante la semi-reacción de reducción, las constantes cinéticas de estado estacionario y transitorio de las cuatro variantes de histidina mostraron que sólo la His502 está significativamente implicada en la reducción del O₂. La mutación H502A produjo una disminución en el valor de la $^{app}k_{ox1}$ de 6 veces, mientras que la disminución en la variante H546A fue únicamente de 1.3 veces (y más de 12 veces para la variante H502S). La ausencia de un KIE del solvente para la constante catalítica del oxígeno ($^{D2O}(k_{cat}/K_m(Ox)) \sim 1$) demuestra que la transferencia del protón desde la His502 al O₂ (o el anión superóxido) no es un paso limitante durante la semi-reacción de oxidación. Por tanto, los efectos de las mutaciones en la His502 sobre las constantes cinéticas deben tener un origen diferente. Tal y como se ha postulado en la glucosa oxidasa, una oxidoreductasa GMC modelo de la semi-reacción de oxidación tras los estudios de Klinman *et al.* (1999; 2003; 2004; 2005), el papel del residuo de histidina conservado (His516 en la glucosa oxidasa de *A. niger*) sería

facilitar la formación y/o estabilizar el anión superóxido, formado tras la primera transferencia de un electrón desde la flavina reducida al O_2 . Además de la protonación de las histidinas conservadas en el centro activo de la glucosa oxidasa (Roth y Klinman, 2003) y la AAO, existen otros ejemplos de oxidasas con cargas positivas en el centro activo que participan en la semi-reacción de oxidación, tales como: **i)** el producto cargado en el centro activo de la colina oxidasa (Finnegan *et al.*, 2010), donde la $k_{cat}/K_{m(Ox)}$ solo fue 1.6 veces menor en la variante H466A (Ghanem y Gadda, 2005) o **ii)** los residuos de lisina cerca del N5 de la flavina en la sarcosina oxidasa monomérica (Zhao *et al.*, 2008) y la fructosamina oxidasa (McDonald *et al.*, 2011).

Finalmente, cuando se utilizaron los alcoholes *p*-metoxibencílico α -dideuterado y el enantiómero (*R*) α -monodeuterado como sustratos reductores de la AAO en condiciones de estado estacionario, se encontró un KIE significativo sobre la eficiencia para al oxígeno ($^D(k_{cat}/K_{m(Ox)})$ de 1.5-1.6 (comparado con el $^D(k_{cat}/K_{m(Ox)})$ de 1.1 cuando se utilizó el enantiómero (*S*)). Cuando se utilizan los sustratos deuterados, el 2H que ocupa la posición pro-*R* es abstraído selectivamente por la flavina, de forma que el marcaje isotópico es transferido a su N5. En este experimento, el intercambio de protón $N5^2H$ con el solvente es más lento que la velocidad de reducción (Sucharitakul *et al.*, 2011), dando lugar a un marcaje continuo durante todo el ensayo. Por tanto, el KIE observado revela que la transferencia del protón del N5H al anión superóxido es una etapa limitante durante la semi-reacción de oxidación en la AAO. Paralelamente, en la piranosa 2-oxidasa se ha observado que la transferencia de un protón desde el N5 actúa como etapa limitante durante la formación del H_2O_2 a partir del hidroperóxido de la flavina (Sucharitakul *et al.*, 2011).

De acuerdo con el esquema general mostrado en la **Figura 15**, podemos concluir que la His502 frente al locus N5-C4a de la flavina es un residuo clave que participa en las dos semi-reacciones de la enzima: **i)** durante la semi-reacción de reducción, actúa como base catalítica activando el alcohol, facilitando la transferencia concertada de un hidruro al N5 de la flavina (que se produce de forma estereoselectiva desde la posición pro-*R*); y **ii)** durante la semi-reacción de oxidación, donde su protonación (tras la abstracción del protón del alcohol) da lugar a una carga positiva en el centro activo, necesaria para la activación del O_2 (a través de la estabilización del radical superóxido), y en la que el H_2O_2 se produce a través de una transferencia de protón desde el N5H de la flavina sin que se forme un intermediario flavina-hidroperóxido. Mientras que la His546 tendría un papel más modesto, durante la semi-reacción de reducción, posicionando correctamente el sustrato a través de un enlace de hidrógeno).

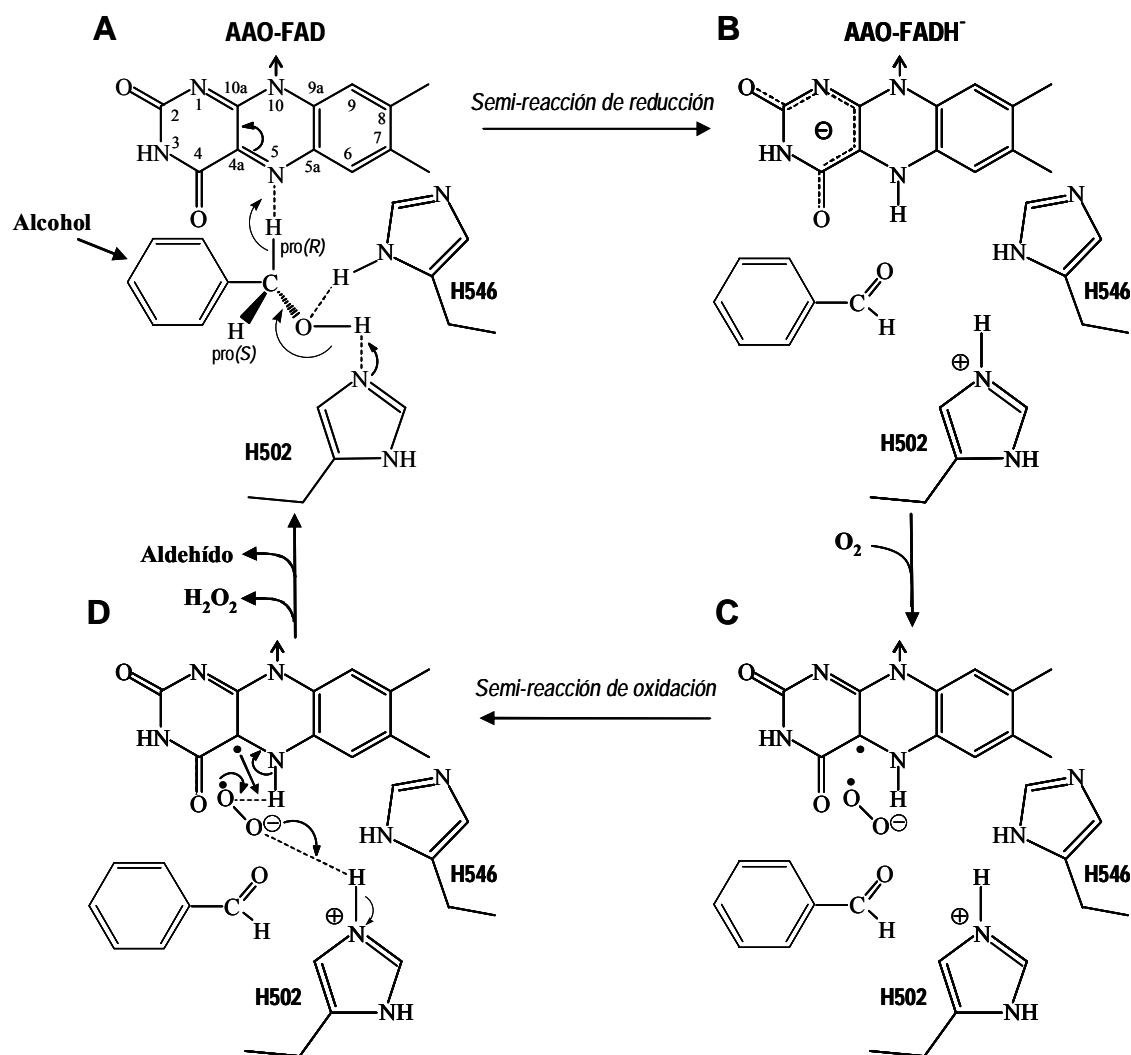


Figura 15. Esquema del ciclo catalítico de la AAO incluyendo las semi-reacciones de reducción (arriba) y oxidación (abajo). (A) En la primera semi-reacción el FAD oxidado (forma quinona) abstrae un hidruro (dos electrones y el hidrógeno- α en posición pro-*R*) del alcohol) ayudado por la His502 que actúa como base catalítica (abstrayendo el protón del grupo hidroxilo del alcohol) y la His546 que une el alcohol a través de un enlace de hidrógeno, dando lugar al producto (aldehído), al FAD reducido (forma hidroquinona) y a la His502 protonada. (B) Durante la segunda semi-reacción, el O₂ es reducido (de un electrón) por la flavina reducida, dando lugar al radical superóxido, cuya carga negativa se estabiliza por la His502 protonada, y al radical semiquinona de la flavina (C) y, en la etapa final, el anión superóxido recibe un segundo electrón de la forma semiquinona del FAD y dos protones (del N5 de la flavina y la His502 protonada durante la semi-reacción anterior) formando los productos H₂O₂ y FAD oxidado (D).

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitz, A.S. y Massey, V. (1976) Interaction of phenols with old yellow enzyme - Physical evidence for charge-transfer complexes. *J. Biol. Chem.* 251: 5327-5336.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. y Ananthanarayan, L. (2009) Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances* 27: 489-501.
- Borrelli, K.W., Vitalis, A., Alcantara, R. y Guallar, V. (2005) PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. *J. Chem. Theory Comput* 1: 1304-1311.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Finnegan, S., Agniswamy, J., Weber, I.T. y Gadda, G. (2010) Role of valine 464 in the flavin oxidation reaction catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 49: 2952-2961.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.

- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Hallberg, B.M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434.
- Hallberg, B.M., Leitner, C., Haltrich, D. y Divne, C. (2004) Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin- degrading enzyme pyranose 2-oxidase. *J. Mol. Biol.* 341: 781-796.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011a) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P. y Martínez, A.T. (2012a) Fungal aryl-alcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1395-1410.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Merino, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2012b) Stereoselective hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. *ChemBioChem* 13: 427-435.
- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2011b) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-41114.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998) Evaluation of the role of His447 in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry* 37: 17990-18000.
- Kemal, C., Chan, T.W. y Bruice, T.C. (1977) Reaction of ³O₂ with dihydroflavins. 1. N3,5-Dimethyl-1,5-dihydrolumiflavin and 1,5-dihydroisalloxazines. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 7272-7286.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quéré, J.-L. y Bonnarme, P. (2000) Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1517-1522.

- Lario, P.I., Sampson, N. y Vrieling, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J. Mol. Biol.* 326: 1635-1650.
- Lyubimov, A.Y., Lario, P.I., Moustafa, I. y Vrieling, A. (2006) Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. *Nat. Chem. Biol.* 2: 259-264.
- Macheroux, P. (1999) UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. En: *Flavoprotein protocols.* (Eds.: Chapman, S.K. y Reid, G.A.), Humana Press, Totowa, USA, pp. 1-7.
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 283-296.
- Mattevi, A. (2006) To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* 31: 276-283.
- McDonald, C.A., Fagan, R.L., Collard, F., Monnier, V.M. y Palfey, B.A. (2011) Oxygen reactivity in flavoenzymes: Context matters. *J. Am. Chem. Soc.* online DOI: [dx.doi.org/10.1021/ja2081873](https://doi.org/10.1021/ja2081873)
- Meyer, M., Wohlfahrt, G., Knäblein, J. y Schomburg, D. (1998) Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *J. Comp. -Aided Molec. Design* 12: 425-440.
- Nakanishi, Y., Ohashi, K. y Tsuge, H. (1984) Essential histidyl residues in glucose oxidase. Chemical modification of histidyl residues with diethylpyrocarbonate. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2951-2959.
- Orville, A.M., Lountos, G.T., Finnegan, S., Gadda, G. y Prabhakar, R. (2009) Crystallographic, spectroscopic, and computational analysis of a flavin C4a-oxygen adduct in choline oxidase. *Biochemistry* 48: 720-728.
- Pennati, A. y Gadda, G. (2011) Stabilization of an Intermediate in the Oxidative Half-Reaction of Human Liver Glycolate Oxidase. *Biochemistry* 50: 1-3.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. y Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.

- Roth, J.P. y Klinman, J.P. (2003) Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 62-67.
- Roth, J.P., Wincek, R., Nodet, G., Edmondson, D.E., McIntire, W.S. y Klinman, J.P. (2004) Oxygen isotope effects on electron transfer to O₂ probed using chemically modified flavins bound to glucose oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 15120-15131.
- Roth, J.P., Wincek, R., Nodet, G., Edmondson, D.E., McIntire, W.S. y Klinman, J.P. (2005) Oxygen isotope effects on electron transfer to O₂ probed using chemically modified flavins bound to glucose oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 5727
- Rotsaert, F.A.J., Renganathan, V. y Gold, M.H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 42: 4049-4056.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2: 164-177.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2008) On the role of histidine 351 in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 47: 6762-6769.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2010) Role of asparagine 510 in the relative timing of substrate bond cleavages in the reaction catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 49: 2483-2490.
- Sakai, Y. y Tani, Y. (1992) Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (*AODI*) from the formaldehyde-producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene* 114: 67-73.
- Schrödinger Inc. (2011a) Jaguar 7.8. LCC, New York.
- Schrödinger Inc. (2011b) Maestro 9.2. LCC, New York.
- Su, Q. y Klinman, J.P. (1999) Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. *Biochemistry* 38: 8572-8581.

- Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D. y Chaiyen, P. (2008) Detection of a C4a-hydroperoxyflavin intermediate in the reaction of a flavoprotein oxidase. *Biochemistry* 47: 8485-8490.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T. y Chaiyen, P. (2011) Hydrogen peroxide elimination from C4a-hydroperoxyflavin in a flavoprotein oxidase occurs through a single proton transfer from flavin N5 to a peroxide leaving group. *J. Biol. Chem.* 286: 16900-16909.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Vrieling, A., Lloyd, L.F. y Blow, D.M. (1991) Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 533-554.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (2000) Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β-D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.
- Wohlfahrt, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, D. y Leskovic, V. (2004) The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell Biochem.* 260: 69-83.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. y Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D* 55: 969-977.
- Wongnate, T., Sucharitakul, J. y Chaiyen, P. (2011) Identification of a catalytic base for sugar oxidation in the pyranose-2 oxidation reaction. *ChemBioChem Online* DOI: 10.1002/cbc.201100564
- Yin, Y., Liu, P., Anderson, R.G. y Sampson, N.S. (2002) Construction of a catalytically inactive cholesterol oxidase mutant: investigation of the interplay between active site-residues glutamate 361 and histidine 447. *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 235-242.
- Zhao, G.H., Bruckner, R.C. y Jorns, M.S. (2008) Identification of the oxygen activation site in monomeric sarcosine oxidase: Role of Lys265 in catalysis. *Biochemistry* 47: 9124-9135.

Discusión general

Acceso de los sustratos al centro activo de la AAO

La estructura cristalográfica de la AAO muestra un centro activo escasamente accesible desde el solvente (Fernández *et al.*, 2009). La entrada de los sustratos se ha caracterizado mediante simulaciones computacionales realizadas en el Centro de Supercomputación de Barcelona. El programa *PELE* ha permitido la migración dinámica del sustrato reductor (alcohol) y oxidante (O_2) hasta una posición catalítica en el centro activo de la AAO. Se ha determinado que ambos sustratos emplean el canal hidrofóbico observado en la estructura cristalográfica. La migración del alcohol requiere importantes reajustes de la cadena lateral de la Phe397 (que actúa como puerta del centro activo) y pasa por encima de la cadena lateral de la Tyr92 que ayuda al alcohol a alcanzar su posición final (estableciendo interacciones de *stacking* con el anillo bencílico del alcohol) (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a). Por otro lado, el O_2 es capaz de acceder al centro activo a través de dicho canal, sin requerir movimientos significativos de los anteriores residuos (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b). Además de posibilitar el estudio de la migración de los sustratos, el programa *PELE* ha predicho el posicionamiento de ambos en el centro activo, permitiendo los posteriores cálculos QM/MM. Al no disponer de una estructura cristalográfica de la enzima con los sustratos unidos, dichas predicciones han sido utilizadas para esclarecer las relaciones estructura-función en la AAO mostradas a lo largo del presente trabajo.

Reducción concertada no sincrónica

Se ha estudiado el mecanismo catalítico de la semi-reacción de reducción de la AAO. Tal y como se describe en la Introducción, se han postulado tres posibles mecanismos de deshidrogenación en flavoenzimas. El presente estudio descartó la existencia de un mecanismo radicalario (que implica la formación del radical alcóxido del sustrato y la forma semiquinona de la flavina) o carbaniónico (que implica la formación de un carbanión del sustrato) al no detectarse ninguno de los anteriores radicales/intermediarios que la enzima sería capaz de estabilizar. Este hecho podría estar relacionado con la incapacidad de la AAO para formar un aducto con sulfito (Ferreira *et al.*, 2005). Los elevados valores de KIE del sustrato indicaron que uno de los hidrógenos- α del alcohol se transfiere (en forma de un hidruro) al N5 de la flavina, mientras que el pequeño pero significativo KIE del solvente sugirió la transferencia de un protón desde el grupo hidroxilo del sustrato. Así mismo, el KIE múltiple mostró que ambos

procesos, transferencia de hidruro y protón, tienen lugar de forma concertada (Ferreira *et al.*, 2009). Los cálculos de energía de reacción mediante QM/MM confirmaron la naturaleza concertada del mecanismo (es decir, sin formación de un intermediario estable), a diferencia del mecanismo secuencial propuesto en la superfamilia GMC, aunque la abstracción del protón por una base catalítica tiene lugar de forma previa (no sincrónica) con la transferencia de hidruro a la flavina (Gadda, 2008; Hernández-Ortega *et al.*, 2011a).

Residuos de histidina conservados y semi-reacción de reducción

Durante los últimos años ha existido cierta controversia sobre el papel de los dos residuos conservados en el centro activo de los miembros de la superfamilia de oxidorreductasas GMC (His502 e His546 en la AAO). Durante el presente trabajo se ha caracterizado el papel de ambos residuos a través de mutagénesis dirigida, estudios de protonación y cálculos de energía QM/MM empleando la estructura cristalográfica de la AAO. Se ha encontrado que la His502, que ocupa una posición (frente al lado-*re* del anillo de isoaloxazina del cofactor) homóloga a otros residuos de histidina en el centro activo de todas las oxidorreductasas GMC, sería la que actúa como base catalítica durante la semi-reacción de reducción abstrayendo el protón del grupo hidroxilo del sustrato (sus sustitución provocó descensos de 5 órdenes de magnitud en la eficiencia catalítica y la constante de reducción). Por otro lado, la His546, que se corresponde con un residuo de histidina o asparagina en otros miembros de la superfamilia GMC, está implicada en el correcto posicionamiento del sustrato reductor (alcohol) en el centro activo de la AAO. Todo ello sugiere que el residuo globalmente conservado dentro de la familia de oxidorreductasas GMC (His502 de la AAO) es el que actúa como base catalítica (Hernández-Ortega *et al.*, 2011a; Hernández-Ortega *et al.*, 2012a).

Transferencia de hidruro estereoselectiva

La determinación del KIE del sustrato empleando las formas α -monodeuteradas del alcohol *p*-metoxibencílico (enantiómeros *R* y *S*) demostró la naturaleza estereoselectiva de la transferencia de hidruro. Los mayores valores de KIE se encontraron para el enantiómero (*R*) revelando que el hidrógeno en posición pro-*R* es el transferido al N5 de la flavina. La disponibilidad de la estructura cristalográfica de la AAO, sobre la que se realizaron estudios de *docking* molecular del alcohol *p*-metoxibencílico en el centro activo (usando *PELE*) y los posteriores cálculos de energía QM/MM han permitido relacionar la estereoselectividad con la posición de los átomos del centro activo que reciben el hidruro (N5 del FAD) y el

protón (Nε de la His502) y con la naturaleza concertada del mecanismo. En la posición catalítica del alcohol, el hidrógeno en posición pro-*R* queda orientado hacia el N5 de la flavina y el grupo hidroxilo se orienta hacia la His502. En esta orientación se produce fácilmente la abstracción del protón del hidroxilo por la His502 (que actúa como base catalítica activando el sustrato) y la transferencia concertada (no sincronica) a la flavina del hidrogeno en posición pro-*R*. Sin embargo, cuando el sustrato se orienta con el hidrógeno pro-*S* hacia la flavina, el grupo hidroxilo queda muy lejos de la His502, que establece un puente de hidrógeno con la His546, lo que impide la activación del sustrato y la transferencia de hidruro, lo que justifica el bajo KIE encontrado para el enantiómero (*S*) del alcohol α-deuterado (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b).

Oxidación de aldehídos por la AAO

La oxidación de ciertos aldehídos por la AAO había sido descrita anteriormente. Sin embargo, el presente trabajo constituye el primer estudio detallado de esta actividad a través de la combinación de distintas técnicas experimentales. Se ha observado que la aparente inversión de la especificidad de sustrato con alcoholes y aldehídos (relativa a la naturaleza de los sustituyentes como donadores o aceptores de electrones) no está relacionada con el mecanismo de catálisis sino con el grado de hidratación de los aldehídos en medio acuoso (determinado mediante NMR). La hidratación de los aldehídos se ve favorecida por la presencia de sustituyentes aceptores de electrones que promueven la incorporación del hidroxilo del agua al carbono-α del aldehído, dando lugar a las correspondientes formas *gem*-diol. El mecanismo de oxidación de los *gem*-dioles es análogo al descrito para la oxidación de los alcoholes, de forma que la base catalítica (His502) activa el sustrato (mediante la abstracción de un protón del *gem*-diol) lo que permite la abstracción del hidruro por la flavina. Durante la biodegradación de la lignina, la AAO actúa como una oxidasa versátil, siendo capaz de oxidar alcoholes o aldehídos en función de su disponibilidad, y manteniendo así la producción continua del H₂O₂ extracelular necesario para la acción de las peroxidasas fúngicas (Ferreira *et al.*, 2010).

Mecanismo de la semi-reacción de oxidación y residuos implicados

Paralelamente al estudio del mecanismo de la semi-reacción de reducción (por alcoholes y aldehídos) se abordó la caracterización de la segunda semi-reacción del ciclo catalítico de la AAO (semi-reacción de oxidación). Se ha observado que la Phe501 es fundamental en esta semi-reacción facilitando el correcto posicionamiento del O₂ cerca del *locus* C4a-N5 de la

flavina y la His502, que actúa como ácido catalítico (Hernández-Ortega *et al.*, 2011b; Hernández-Ortega *et al.*, 2012a). Gracias a los cálculos QM/MM se ha determinado que la primera etapa consiste en la transferencia de un electrón desde la flavina al O₂ dando lugar al par de radicales superóxido y semiquinona de la flavina, sin que ambos colapsen formando un intermediario flavina-hidroperóxido. Para la activación del oxígeno y la estabilización de ambos radicales es fundamental la existencia de una carga positiva en el centro activo (His502H⁺, protonada en la anterior semi-reacción). A pesar de que la AAO no es capaz de estabilizar la forma semiquinona de la flavina (no se ha observado en los ensayos de cinética rápida) este intermediario es obligatorio durante la catálisis debido a la diferencia de *spin* entre la flavina y el O₂ (que impide la transferencia directa de dos electrones desde la flavina al O₂). La semi-reacción finaliza con la formación del H₂O₂ a partir de la transferencia del protón de la His502 (que de esta forma puede actuar como base en un nuevo ciclo catalítico) y un átomo de hidrógeno desde el N5 de la flavina, que limita parcialmente la reacción tal como mostró el estudio del KIE (Hernández-Ortega *et al.*, 2012a).

Desracemización de alcoholes quirales

Mediante HPLC quiral se ha confirmado que la estereoselectividad para la transferencia de hidruro en la oxidación de alcoholes primarios (no quirales), descrita anteriormente, se mantiene durante la oxidación de alcoholes secundarios. Esta estereoselectividad se relaciona con la naturaleza concertada del mecanismo catalítico y la posición del sustrato en el centro activo. Sin embargo, se ha observado que la cadena lateral de la Phe501 impide acomodar sustituyentes en el carbono- α del sustrato. En el presente trabajo se ha diseñado una variante de la AAO con estereoselectividad (acción sobre los enantiómeros *S/R*) mejorada mediante la sustitución del residuo en posición 501 por otro menos voluminoso, para mejorar la unión de los alcoholes secundarios. Ésta u otras variantes mejoradas de la AAO podrían emplearse para transformación enantioselectiva (desracemización) de mezclas de alcoholes quirales. Estos alcoholes secundarios actúan como intermediarios durante la síntesis de compuestos de interés comercial en los sectores químico o farmacéutico (Hernández-Ortega *et al.*, 2012b).

CONCLUSIONES

1. La migración de los alcoholes al centro activo requiere interacciones y reorganizaciones de los residuos que forman un estrecho canal hidrofóbico, mientras que el O₂ difunde sin requerir estos reajustes.
2. La semi-reacción de reducción por los alcoholes tiene lugar a través de un mecanismo concertado (no sincrónico) de transferencia de protón (a una base catalítica) e hidruro (a la flavina).
3. La transferencia de hidruro es un proceso estereoselectivo (como consecuencia de la naturaleza concertada del mecanismo) donde únicamente se transfiere el hidrógeno- α en posición pro-*R*.
4. La His502 actúa como base catalítica facilitando la transferencia del hidrógeno pro-*R*, mientras que la segunda histidina en el centro activo contribuye al posicionamiento del alcohol.
5. La AAO también oxida aldehídos aromáticos en su forma *gem*-diol, favorecida por la presencia de sustituyentes electrofílicos, a través de un mecanismo análogo al de la oxidación de los alcoholes.
6. En la semi-reacción de oxidación, la Phe501 facilita el posicionamiento del O₂, mientras que la His502 contribuye a su reducción a H₂O₂ (via anión superóxido) sin formación de un intermediario hidroperóxido.
7. La estereoselectividad de la AAO se mantiene durante la oxidación de alcoholes secundarios, revelando el potencial de esta enzima en la producción de alcoholes quirales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitz, A.S. y Massey, V. (1976) Interaction of phenols with old yellow enzyme - Physical evidence for charge-transfer complexes. *J. Biol. Chem.* 251: 5327-5336.
- Agarwal, P.K., Billeter, S.R. y Hammes-Schiffer, S. (2002) Nuclear quantum effects and enzyme dynamics in dihydrofolate reductase catalysis. *J. Phys. Chem. B* 106: 3283-3293.
- Aguila, S., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Rivera, M., Pecchi, G. y Alderete, J.B. (2008) Stereoselective oxidation of R-(+)-limonene by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Green Chem.* 10: 647-653.
- Aguilar, C., Urzúa, U., Koenig, C. y Vicuña, R. (1999) Oxalate oxidase from *Ceriporiopsis subvermispora*: Biochemical and cytochemical studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 275-282.
- Allan, G.R. y Carnell, A.J. (2001) Microbial deracemization of 1-aryl and 1-heteroaryl secondary alcohols. *J. Org. Chem.* 66: 6495-6497.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. y McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10037-10041.
- Baldrian, P. y Valaskova, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 501-521.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. y Ananthanarayan, L. (2009) Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances* 27: 489-501.
- Bannwarth, M., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D., Giffhorn, F. y Schulz, G.E. (2004) Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. *Biochemistry* 43: 11683-11690.
- Barbosa, J.A.R.G., Sivaraman, J., Li, Y.G., Larocque, R., Matte, A., Schrag, J.D. y Cygler, M. (2002) Mechanism of action and NAD(+)-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1859-1864.
- Baron, R., Riley, C., Chenprakhon, P., Thotsaporn, K., Winter, R.T., Alfieri, A., Forneris, F., van Berkel, W.J., Chaiyen, P., Fraaije, M.W., Mattevi, A. y McCammon, J.A. (2009) Multiple pathways guide oxygen diffusion into flavoenzyme active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10603-10608.
- Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1998) Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan

- and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 325-332.
- Barros, B.A., de Oliveira, M.D.F., Lemos, T.L.G., de Mattos, M.C., de Gonzalo, G., Gotor-Fernández, V. y Gotor, V. (2009) *Lentinus strigellus*: a new versatile stereoselective biocatalyst for the bioreduction of prochiral ketones. *Tetrahedron-Asymmetry* 20: 1057-1061.
- Borrelli, K., Cossins, B. y Guallar, V. (2010) Exploring hierarchical refinement techniques for induced fit docking with protein and ligand flexibility. *J. Comp. Chem.* 31: 1224-1235.
- Borrelli, K.W., Vitalis, A., Alcantara, R. y Guallar, V. (2005) PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. *J. Chem. Theory Comput* 1: 1304-1311.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255: 445-450.
- Bright, H.J. y Appleby, M. (1969) The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. *J. Biol. Chem.* 244: 3625-3634.
- Bright, H.J. y Gibson, Q.H. (1967) The oxidation of 1-deuterated glucose by glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 242: 994-1003.
- Camarero, S., Böckle, B., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1996) Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1070-1072.
- Camarero, S., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1997) Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid-state fermentation of wheat straw. En: *Advances in solid state fermentation*. (Eds.: Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. y Viniegra-González, G.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 335-345.
- Carey, J.S., Laffan, D., Thomson, C. y Williams, M.T. (2006) Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org. Biomol. Chem.* 4: 2337-2347.
- Cavener, D.R. (1992) GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J. Mol. Biol.* 223: 811-814.
- Chen, L., Lyubimov, A.Y., Brammer, L., Vrielink, A. y Sampson, N.S. (2008) The binding and release of oxygen and hydrogen peroxide are directed by a hydrophobic tunnel in cholesterol oxidase. *Biochemistry* 47: 5368-5377.
- Cleland, W.W. (1980) Measurement of isotope effect by the equilibrium perturbation technique. *Methods Enzymol.* 64: 104-125.

- Cleland, W.W. (1982) The use of pH studies to determinate chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. En: *Methods in Enzymology*. (Ed.: Purich, D.L.), pp. 390-405.
- Corbier, C., Della, S.F. y Branlant, G. (1992) A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 31: 12532-12535.
- Coulombe, R., Yue, K.Q., Ghisla, S. y Vrieling, A. (2001) Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *J. Biol. Chem.* 276: 30435-30441.
- Cullen, D. y Kersten, P.J. (2004) Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: *Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. (Eds.: Brambl, R. y Marzluf, G.A.), Springer, Berlin, pp. 249-273.
- Daniel, G., Volc, J. y Kubátová, E. (1994) Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2524-2532.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubátová, E. y Halada, P. (2007) Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6241-6253.
- de Jong, E. y Field, J.A. (1997) Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogens by basidiomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:375-414: 375-414.
- de Jong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994a) Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 271-277.
- de Jong, E., Field, J.A. y de Bont, J.A.M. (1994b) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 153-188.
- de Jong, E., Field, J.A., Dings, J.A.F.M., Wijnberg, J.B.P.A. y de Bont, J.A.M. (1992) De novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Formation of 3-chloro-anisaldehyde from glucose. *FEBS Lett.* 305: 220-224.
- de Jong, E., Field, J.A., Spinnler, H.E., Wijnberg, J.B.P.A. y de Bont, J.A.M. (1994c) Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 264-270.
- Di Gioia, D., Luziatelli, F., Negroni, A., Ficca, A.G., Fava, F. y Ruzzi, M. (2011) Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of

- vanillin from ferulic acid. J. Biotechnol. Online DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.014
- Dinadayalane, T.C. y Leszczynski, J. (2009) Geometries and stabilities of various configurations of benzene dimer: details of novel V-shaped structure revealed. *Struct. Chem.* 20: 11-20.
- Dreveny, I., Andryushkova, A.S., Glieder, A., Gruber, K. y Kratky, C. (2009) Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. *Biochemistry* 48: 3370-3377.
- Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A. y Krastky, C. (2001) The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like a oxidoreductase. *Structure* 9: 803-815.
- Dym, O. y Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10: 1712-1728.
- Eisses, K.T. (1989) On the oxidation of aldehydes by alcohol-dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* - Evidence for the gem-diol as the reacting substrate. *Bioorg. Chem.* 17: 268-274.
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., Volc, J. y Musílek, V. (1986) Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 257-262.
- Escalettes, F. y Turner, N.J. (2008) Directed evolution of galactose oxidase: Generation of enantioselective secondary alcohol oxidases. *ChemBioChem* 9: 857-860.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 235-240.
- Faison, B.D. y Kirk, T.K. (1983) Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1140-1145.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005a) On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005b) Oxygen- and temperature-dependent kinetic isotope effects in choline oxidase: correlating reversible hydride transfer with environmentally enhanced tunneling. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 17954-17961.

- Fan, F., Germann, M.W. y Gadda, G. (2006) Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* 45: 1979-1986.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. y Russell, J.D. (1960) Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem. J.* 74: 257-262.
- Fernández, I.S., Ruiz-Dueñas, F.J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Romero, A. (2009) Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A.T. y Medina, M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two different alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010a) Aldehyde oxidation by *Pleurotus* aryl-alcohol oxidase involved in lignin biodegradation. *Proc. LignoBiotech-1 Symp.*, Reims, 29 March-1 April
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M. y Martínez, A.T. (2010b) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., van Berkel, W.J.H. y Martínez, A.T. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing enzyme. *FEBS J.* 273: 4878-4888.
- Fetizon, M., Henry, Y., Moreau, N., Moreau, G., Golfier, M. y Prange, T. (1973) Preparation of deuterated or tritiated aldehydes on carbonyl. *Tetrahedron* 29: 1011-1014.
- Finnegan, S., Agniswamy, J., Weber, I.T. y Gadda, G. (2010) Role of valine 464 in the flavin oxidation reaction catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 49: 2952-2961.

- Fishelovitch, D., Shaik, S., Wolfson, H.J. y Nussinov, R. (2009) Theoretical characterization of substrate access/exit channels in the human cytochrome P450 3A4 enzyme: Involvement of phenylalanine residues in the gating mechanism. *J. Phys. Chem. B* 113: 13018-13025.
- Forney, L.J., Reddy, C.A., Tien, M. y Aust, S.D. (1982) The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 257: 11455-11462.
- Fraaije, M.W. y Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* 25: 126-132.
- Fraaije, M.W. y van Berkel, W.J.H. (1997) Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272: 18111-18116.
- Fraaije, M.W., Veeger, C. y van Berkel, W.J.H. (1995) Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from allylphenols. *Eur. J. Biochem.* 234: 271-277.
- Fraatz, M.A. y Zorn, H. (2011) Fungal flavours. En: *The Mycota. X Industrial applications.* (Ed.: Hofrichter, M.), Springer, Berlin, pp. 249-268.
- Frantom, P.A., Pongdee, R., Sulikowski, G.A. y Fitzpatrick, P.F. (2002) Intrinsic deuterium isotope effects on benzylic hydroxylation by tyrosine hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 4202-4203.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., Schopfer, L.M. y Massey, V. (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265: 3793-3802.
- Friesner, R.A. y Guallar, V. (2005) Ab initio quantum chemical and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods for studying enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56: 389-427.
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. y Shenkin, P.S. (2004) Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47: 1739-1749.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant,

- J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X.Y., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P.Y., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G., Dapprich, S., Daniels, A.T., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B.G., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C. y Pople, J.A. (2003) Gaussian 03, Revision A.1. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.
- Gadda, G. (2003a) Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1646: 112-118.
- Gadda, G. (2003b) pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1650: 4-9.
- Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* 47: 13745-13753.
- Gallagher, I.M., Fraser, M.A., Evans, C.S. y Atkey, P.T. (1989) Ultrastructural localization of lignocellulose-degrading enzymes. En: ACS Symposium "Plant Cell-Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation", Vol 399. (Eds.: Lewis, N.G. y Paice, M.G.), Amer.Chem.Soc., pp. 426-442.
- Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H.-E. y Brunerie, P. (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. *Mycol. Res.* 94: 494-504.
- Garattini, E., Fratelli, M. y Terao, M. (2008) Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 1019-1048.
- Ge, X., Penney, L.C., van de Rijn, I. y Tanner, M.E. (2004) Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 271: 14-22.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005) On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. *Biochemistry* 44: 893-904.
- Ghanem, M., Fan, F., Francis, K. y Gadda, G. (2003) Spectroscopic and kinetic properties of recombinant choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochemistry* 42: 15179-15188.

- Ghisla, S. y Massey, V. (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 181: 1-17.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E. y Massey, V. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Gilabert, M.A., Fenoll, L.G., Garcia-Molina, F., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2004) Stereospecificity of horseradish peroxidase. *Biol. Chem.* 385: 1177-1184.
- Goetghebeur, M., Brun, S., Galzy, P. y Nicolas, M. (1993) Benzyl Alcohol Oxidase and Laccase Synthesis in *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1380-1381.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F. (2009) Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3944-3953.
- Green, F., Clausen, C.A., Larsen, M.J. y Highley, T.L. (1992) Immuno-scanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Can. J. Microbiol.* 38: 898-904.
- Greene, R.V. y Gould, J.M. (1984) Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 437-443.
- Gross, B., Asther, M., Corrieu, G. y Brunerie, P. (1993) Production of vanillin by bioconversion of benzenoid precursors by *Pycnoporus*. Patent (USA) 5262315:
- Guallar, V., Harris, D.L., Batista, V.S. y Miller, W.H. (2002) Proton-transfer dynamics in the activation of cytochrome P450eryF. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 1430-1437.
- Guallar, V., Lu, C.Y., Borrelli, K., Egawa, T.Y. y Yeh, S.R. (2009) Ligand migration in the truncated hemoglobin-II from *Mycobacterium tuberculosis*: The role of G8 tryptophan. *J. Biol. Chem.* 284: 3106-3116.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 142-147.

- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1988) Detección de una alcohol oxidasa extracelular, productora de peróxido de hidrógeno, en *Pleurotus eryngii*. Abs. 2nd. Spanish Conf. Biotechnol. ,Barcelona388
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 465-469.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992a) Aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*: substrate specificity and H₂O₂-producing system. En: Biotechnology in pulp and paper industry. (Eds.: Kuwahara, M. y Shimada, M.), UNI Pub. Co., Ltd., Tokyo, pp. 371-376.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992b) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 209: 603-611.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 465-470.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1783-1788.
- Halgren, T. (2007) New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. Chem. Biol. Drug Design 69: 146-148.
- Hallberg, B.M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002) Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. J. Mol. Biol. 315: 421-434.
- Hallberg, B.M., Leitner, C., Haltrich, D. y Divne, C. (2004) Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin- degrading enzyme pyranose 2-oxidase. J. Mol. Biol. 341: 781-796.
- Hammel, K.E. y Cullen, D. (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 349-355.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A.Jr. y Ryan, Z.C. (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme Microb. Technol. 30: 445-453.
- Hassan-Abdallah, A., Bruckner, R.C., Zhao, G.H. y Jorns, M.S. (2005) Biosynthesis of covalently bound flavin: Isolation and in vitro flavinylation of the monomeric sarcosine oxidase apoprotein. Biochemistry 44: 6452-6462.

- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. y Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Hernández-Ortega, A., Borrelli, K., Ferreira, P., Medina, M., Martínez, A.T. y Guallar, V. (2011a) Substrate diffusion and oxidation in GMC oxidoreductases: An experimental and computational study on fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 436: 341-350.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P. y Martínez, A.T. (2012a) Fungal aryl-alcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1395-1410.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, M.J., Romero, A. y Martínez, A.T. (2008) Discriminating the role of His502 and His546 in the catalysis of aryl-alcohol oxidase. En: *Flavins and flavoproteins 2008*. (Eds.: Frago, S., Gómez-Moreno, C. y Medina, M.), Prensas Universitarias, Zaragoza, pp. 303-308.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2012b) Role of active-site histidines in the oxidative and reductive half-reactions of the flavoenzyme aryl-alcohol oxidase. *Biochemistry*
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Merino, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2012c) Stereoselective hydride transfer by aryl-alcohol oxidase, a member of the GMC superfamily. *ChemBioChem* 13: 427-435.
- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V. y Martínez, A.T. (2011b) Modulating O₂ reactivity in a fungal flavoenzyme: Involvement of aryl-alcohol oxidase Phe-501 contiguous to catalytic histidine. *J. Biol. Chem.* 286: 41105-41114.
- Higuchi, T. (1997) *Biochemistry and molecular biology of wood*. Springer Verlag, London.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. y Foust, T.D. (2007) Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804-807.
- Holland, H.L. y Weber, H.K. (2000) Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 547-553.
- Iwahara, S., Nishihira, T., Jomori, T., Kuwahara, M. y Higuchi, T. (1980) Enzymic oxidation of a,b-unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. *J. Ferment. Technol.* 58: 183-188.
- Jacobson, M.P., Pincus, D.L., Rapp, C.S., Day, T.J.F., Honig, B., Shaw, D.E. y Friesner, R.A. (2004) A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* 55: 351-367.

- Jensen, K.A.Jr., Evans, K.M.C., Kirk, T.K. y Hammel, K.E. (1994) Biosynthetic pathway for veratryl alcohol in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 709-714.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998a) Evaluation of the role of His447 in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry* 37: 17990-18000.
- Kass, I.J. y Sampson, N.S. (1998b) The importance of Glu361 position in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* 8: 2663-2668.
- Keilin, D. y Hartree, E.F. (1952) Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem. J.* 50: 331-341.
- Kemal, C., Chan, T.W. y Bruice, T.C. (1977) Reaction of $^3\text{O}_2$ with dihydroflavins. 1. N3,5-Dimethyl-1,5-dihydrolumiflavin and 1,5-dihydroisoalloxazines. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 7272-7286.
- Kerem, Z., Jensen, K.A. y Hammel, K.E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Lett.* 446: 49-54.
- Kersten, P. y Cullen, D. (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 44: 77-87.
- Kersten, P.J. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2936-2940.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.
- Kiess, M., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* 252: 90-99.
- Kimura, Y., Asada, Y. y Kuwahara, M. (1990) Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 436-442.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kittl, R., Sigmund, C., Halada, P., Volc, J., Divne, C., Haltrich, D. y Peterbauer, C.K. (2008) Molecular cloning of three pyranose dehydrogenase-encoding

- genes from *Agaricus meleagris* and analysis of their expression by real-time RT-PCR. *Curr. Genetics* 53: 117-127.
- Klinman, J.P. (2007) How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? *Account. Chem. Res.* 40: 325-333.
- Knapp, M.J., Rickert, K. y Klinman, J.P. (2002) Temperature dependent isotope effects in soybean lipoxygenase-1: Correlating hydrogen tunneling with protein dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 3865-3874.
- Krings, U. y Berger, R.G. (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 1-8.
- Kujawa, M., Ebner, H., Leitner, C., Hallberg, B.M., Prongjit, M., Sucharitakul, J., Ludwig, R., Rudsander, U., Peterbauer, C., Chaiyen, P., Haltrich, D. y Divne, C. (2006) Structural basis for substrate binding and regioselective oxidation of monosaccharides at C3 by pyranose 2-oxidase. *J. Biol. Chem.* 281: 35104-35115.
- Lans, I., Peregrina, J.R., Medina, M., Garcia-Viloca, M., Gonzalez-Lafont, A. y Lluch, J.M. (2010) Mechanism of the hydride transfer between *Anabaena* Tyr303Ser FNR(rd)/FNR(ox) and NADP(+)/H. A combined pre-steady-state kinetic/ensemble-averaged transition-state theory with multidimensional tunneling study. *J. Phys. Chem. B* 114: 3368-3379.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Djian, A., Spinnler, H.E., Le Quéré, J.-L. y Bonnarme, P. (1999) Regulation of the synthesis of aryl metabolites by phospholipid sources in the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Arch. Microbiol.* 171: 151-158.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quéré, J.-L. y Bonnarme, P. (2000) Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1517-1522.
- Lario, P.I., Sampson, N. y Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J. Mol. Biol.* 326: 1635-1650.
- Lederer, F., Belmouden, A. y Gondry, M. (1996) The chemical mechanism of flavoprotein-catalysed α -hydroxy acid dehydrogenation: a mutational analysis. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 77-83.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J. y Pericin, D. (2005) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 731-750.

- Li, H., Robertson, A.D. y Jensen, J.H. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values. *Proteins* 61: 704-721.
- Li, X., Jacobson, M.P., Zhu, K., Zhao, S. y Friesner, R.A. (2007) Assignment of polar states for protein amino acid residues using an interaction cluster decomposition algorithm and its application to high resolution protein structure modeling. *Proteins* 66: 824-837.
- Lundell, T.K., Leonowicz, A., Mohammadi, O.K. y Hatakka, A.I. (1990) Metabolism of veratric acid by lignin-degrading white-rot fungi. En: *Biotechnology in pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations.* (Eds.: Kirk, T.K. y Chang, H.), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 401-409.
- Lyubimov, A.Y., Lario, P.I., Moustafa, I. y Vrieling, A. (2006) Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. *Nat. Chem. Biol.* 2: 259-264.
- Macheroux, P. (1999) UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. En: *Flavoprotein protocols.* (Eds.: Chapman, S.K. y Reid, G.A.), Humana Press, Totowa, USA, pp. 1-7.
- Marchal, S. y Branlant, G. (1999) Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38: 12950-12958.
- Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 265-274.
- Martínez, A.T., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Jiménez-Barbero, J. y del Río, J.C. (2008) Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D NMR study. *Phytochemistry* 69: 2831-2843.
- Martínez, A.T., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2011) Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by *in situ* structural analyses. *Environ. Microbiol.* 13: 96-107.

- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C. y Gutiérrez, A. (2009a) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 348-357.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.
- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D.S., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuña, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R. y Cullen, D. (2009b) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.
- Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. y Rokhsar, D. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22: 695-700.
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T. y Sannia, G. (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270: 3823-3827.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Massey, V. (1995) Introduction: flavoprotein structure and mechanism. *FASEB J.* 9: 473-475.
- Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 283-296.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 246-257.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P.A., Howell, L.G., Mayhew, S.G., Matthews, R.G. y Foust, G.P. (1969) The reactivity of

- flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. *J. Biol. Chem.* 244: 3999-4006.
- Matsuda, T., Yamanaka, R. y Nakamura, K. (2009) Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron-Asymmetry* 20: 513-557.
- Mattevi, A. (2006) To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* 31: 276-283.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. y Curti, B. (1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome *b2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7496-7501.
- McDonald, C.A., Fagan, R.L., Collard, F., Monnier, V.M. y Palfey, B.A. (2011) Oxygen reactivity in flavoenzymes: Context matters. *J. Am. Chem. Soc.* online DOI: [dx.doi.org/10.1021/ja2081873](https://doi.org/10.1021/ja2081873)
- Medina, M., Martínez-Julvez, M., Hurley, J.K., Tollin, G. y Gómez-Moreno, C. (1998) Involvement of glutamic acid 301 in the catalytic mechanism of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119. *Biochemistry* 37: 2715-2728.
- Menon, V., Hsieh, C.T. y Fitzpatrick, P.F. (1995) Substituted alcohols as mechanistic probes of alcohol oxidase. *Bioorg. Chem.* 23: 42-53.
- Meyer, E.A., Castellano, R.K. y Diederich, F. (2003) Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 1210-1250.
- Meyer, M., Wohlfahrt, G., Knäblein, J. y Schomburg, D. (1998) Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *J. Comp. -Aided Molec. Design* 12: 425-440.
- Minasian, S.G., Whittaker, M.M. y Whittaker, J.W. (2004) Stereoselective hydrogen abstraction by galactose oxidase. *Biochemistry* 43: 13683-13693.
- Muheim, A., Leisola, M.S.A. y Schoemaker, H.E. (1990a) Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *J. Biotechnol.* 13: 159-167.
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1990b) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 204-209.

- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J., Schoemaker, H.E. y Leisola, M.S.A. (1991) Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 195: 369-375.
- Müller, F. y Massey, V. (1969) Flavin-sulfite complexes and their structures. *J. Biol. Chem.* 244: 4007-4016.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2166-2174.
- Munteanu, F.D., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T. y Cavaco-Paulo, A. (2008) Bioelectrochemical investigations of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*. *J. Electroanal. Chem.* 618: 83-86.
- Nagel, Z.D. y Klinman, J.P. (2009) A 21(st) century revisionist's view at a turning point in enzymology. *Nat. Chem. Biol.* 5: 543-550.
- Nakanishi, Y., Ohashi, K. y Tsuge, H. (1984) Essential histidyl residues in glucose oxidase. Chemical modification of histidyl residues with diethylpyrocarbonate. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2951-2959.
- Newcomb, M., Letadicbiadatti, F.H., Chestney, D.L., Roberts, E.S. y Hollenberg, P.F. (1995) A nonsynchronous concerted mechanism for cytochrome-P-450 catalyzed hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 12085-12091.
- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9: 325-338.
- Olson, L.P., Luo, J., Almarsson, O. y Bruice, T.C. (1996) Mechanism of aldehyde oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 35: 9782-9791.
- Orville, A.M., Lountos, G.T., Finnegan, S., Gadda, G. y Prabhakar, R. (2009) Crystallographic, spectroscopic, and computational analysis of a flavin C4a-oxygen adduct in choline oxidase. *Biochemistry* 48: 720-728.
- Otjen, L. y Blanchette, R.A. (1986) A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 64: 905-911.
- Pennati, A. y Gadda, G. (2011) Stabilization of an Intermediate in the Oxidative Half-Reaction of Human Liver Glycolate Oxidase. *Biochemistry* 50: 1-3.

- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. y Damborsky, J. (2006) CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* 7: 316-320.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L. y Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26: 1781-1802.
- Piubelli, L., Pedotti, M., Molla, G., Feindler-Boeckh, S., Ghisla, S., Pilone, M.S. y Pollegioni, L. (2008) On the oxygen reactivity of flavoprotein oxidases - An oxygen access tunnel and gate in *Brevibacterium sterolicum* cholesterol oxidase. *J. Biol. Chem.* 283: 24738-24747.
- Plaggenborg, R., Overhage, J., Loos, A., Archer, J.A.C., Lessard, P., Sinskey, A.J., Steinbuechel, A. y Priefert, H. (2006) Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 745-755.
- Pollegioni, L., Blodig, W. y Ghisla, S. (1997) On the mechanism of D-amino acid oxidase. Structure/linear free energy correlations and deuterium kinetic isotope effects using substituted phenylglycines. *J. Biol. Chem.* 272: 4924-4934.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. y Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 296-314.
- Pu, J., Gao, J. y Truhlar, D.G. (2006) Multidimensional tunneling, recrossing, and the transmission coefficient for enzymatic reactions. *Chem. Rev.* 106: 3140-3169.
- Quaye, O., Lountos, G.T., Fan, F., Orville, A.M. y Gadda, G. (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. y Tschaplinski, T. (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H. y Boerjan, W. (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* 3: 29-60.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2009) New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.

- Romero, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2010) Molecular characterization of a new flavooxidase from a *Bjerkandera adusta* anamorph. Proc. OESIB, Santiago de Compostela, 14-15 September(Eds, G. Feijoo and M.T. Moreira; ISBN-13: 978-84-614-2824-3) pp 86-91.
- Roth, J.P. y Klinman, J.P. (2003) Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 62-67.
- Roth, J.P., Wincek, R., Nodet, G., Edmondson, D.E., McIntire, W.S. y Klinman, J.P. (2004) Oxygen isotope effects on electron transfer to O₂ probed using chemically modified flavins bound to glucose oxidase. J. Am. Chem. Soc. 126: 15120-15131.
- Roth, J.P., Wincek, R., Nodet, G., Edmondson, D.E., McIntire, W.S. y Klinman, J.P. (2005) Oxygen isotope effects on electron transfer to O₂ probed using chemically modified flavins bound to glucose oxidase. J. Am. Chem. Soc. 127: 5727
- Rotsaert, F.A.J., Renganathan, V. y Gold, M.H. (2003) Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry 42: 4049-4056.
- Ruiz-Dueñas, F.J. y Martínez, A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnol. 2: 164-177.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. Protein Expr. Purif. 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. J. Exp. Bot. 60: 441-452.
- Rungrsuriyachai, K. y Gadda, G. (2008) On the role of histidine 351 in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by choline oxidase. Biochemistry 47: 6762-6769.
- Rungrsuriyachai, K. y Gadda, G. (2010) Role of asparagine 510 in the relative timing of substrate bond cleavages in the reaction catalyzed by choline oxidase. Biochemistry 49: 2483-2490.
- Saam, J., Rosini, E., Molla, G., Schulten, K., Pollegioni, L. y Ghisla, S. (2010) O₂ reactivity of flavoproteins: Dynamic access of dioxygen to the active

- site and role of a H⁺ relay system in D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 285: 24439-24446.
- Sakai, Y. y Tani, Y. (1992) Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (*AODI*) from the formaldehyde-producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene* 114: 67-73.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Lú-Chau, T., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technol.* 102: 7500-7506.
- Sancho, J. y Gómez-Moreno, C. (1991) Interaction of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* with its substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 231-238.
- Sannia, G., Limongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. y Giardina, P. (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073: 114-119.
- Schrödinger Inc. (2007) QSite 4.5. Schrödinger, Inc., Portland, Oregon.
- Schrödinger Inc. (2010) QSite 5.6. LCC, New York.
- Schrödinger Inc. (2011a) Jaguar 7.8. LCC, New York.
- Schrödinger Inc. (2011b) Maestro 9.2. LCC, New York.
- Schwarze, F.W.M.R., Engels, J. y Mattheck, C. (2000) Fungal strategies of decay in trees. Springer, Berlin.
- Senn, H.M. y Thiel, W. (2007) QM/MM methods for biological systems. *Atomistic Approaches in Modern Biology: from Quantum Chemistry to Molecular Simulations* 268: 173-290.
- Shimada, M. y Higuchi, T. (1991) Microbial, enzymatic and biomimetic degradation of lignin. En: *Wood and cellulosic chemistry*. (Eds.: Hon, D.N.S. y Shiraishi, N.), Marcel Dekker, N.Y., pp. 557-619.
- Silverman, R.B., Hoffman, S.J. y Catus, W.-B. (1980) A mechanism for mitochondrial monoamine oxidase catalyzed amine oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 102: 7126-7128.
- Sobrado, P. y Fitzpatrick, P.F. (2003) Solvent and primary deuterium isotope effects show that lactate CH and OH bond cleavages are concerted in Y254F flavocytochrome *b*₂, consistent with a hydride transfer mechanism. *Biochemistry* 42: 15208-15214.

- Spinnler, H.E., de Jong, E., Mauvais, G., Semon, E. y Le Quéré, J.-L. (1994) Production of halogenated compounds by *Bjerkandera adusta*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 212-221.
- Su, Q. y Klinman, J.P. (1999) Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation. Biochemistry 38: 8572-8581.
- Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D. y Chaiyen, P. (2008) Detection of a C4a-hydroperoxyflavin intermediate in the reaction of a flavoprotein oxidase. Biochemistry 47: 8485-8490.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T. y Chaiyen, P. (2010) Kinetic isotope effects on the noncovalent flavin mutant protein of pyranose 2-oxidase reveal insights into the flavin reduction mechanism. Biochemistry 49: 3753-3765.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T. y Chaiyen, P. (2011) Hydrogen peroxide elimination from C4a-hydroperoxyflavin in a flavoprotein oxidase occurs through a single proton transfer from flavin N5 to a peroxide leaving group. J. Biol. Chem. 286: 16900-16909.
- Sun, L.H., Petrounia, I.P., Yagasaki, M., Bandara, G. y Arnold, F.H. (2001) Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. Protein Eng. 14: 699-704.
- Sutcliffe, M.J., Masgrau, L., Roujeinikova, A., Johannissen, L.O., Hothi, P., Basran, J., Ranaghan, K.E., Mulholland, A.J., Leys, D. y Scrutton, N.S. (2006) Hydrogen tunnelling in enzyme-catalysed H-transfer. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 361: 1375-1386.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Teng, H., Segura, E. y Grubmeyer, C. (1993) Conserved cysteine residues of histidinol dehydrogenase are not involved in catalysis - Novel chemistry required for enzymatic aldehyde oxidation. J. Biol. Chem. 268: 14182-14188.
- Thaller, V. y Turner, J.L. (1972) Natural acetylenes. Part XXXV. Polyacetylenic acid and benzenoid metabolites from cultures of the fungus *Lepista diemii* Singer. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.2032-2034.
- Truong, T.N. y McCammon, J.A. (1991) Direct dynamics study of intramolecular proton-transfer in hydrogenoxalate anion. J. Am. Chem. Soc. 113: 7504-7508.

- van den Heuvel, R.H., Fraaije, M.W., Ferrer, M., Mattevi, A. y van Berkel, W.J. (2000) Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9455-9460.
- van den Heuvel, R.H., Fraaije, M.W., Laane, C. y van Berkel, W.J. (2001) Enzymatic synthesis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2954-2958.
- van den Heuvel, R.H.H., Fraaije, M.W., Laane, C. y van Berkel, W.J.H. (1998) Regio- and stereospecific conversion of 4-alkylphenols by the covalent flavoprotein vanillyl-alcohol oxidase. *J. Bacteriol.* 180: 5646-5651.
- van den Heuvel, R.H.H., van den Berg, W.A.M., Rovida, S. y van Berkel, W.J.H. (2004) Laboratory-evolved vanillyl-alcohol oxidase produces natural vanillin. *J. Biol. Chem.* 279: 33492-33500.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martínez, D. y Cullen, D. (2009) Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4058-4068.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2000a) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim. Biophys. Acta* 1476: 129-138.
- Varela, E., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2001) Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 107-113.
- Varela, E., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1999) Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochem. J.* 341: 113-117.
- Varela, E., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000b) Aryl-alcohol oxidase protein sequence: A comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Vrielink, A., Lloyd, L.F. y Blow, D.M. (1991) Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 533-554.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8: 52-56.
- Wagner, M.A. y Jorns, M.S. (2000) Monomeric sarcosine oxidase: 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry* 39: 8825-8829.

- Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1988) Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 400-407.
- Walker, J.R. y Curley, R.W. (2001) Improved synthesis of (*R*)-glycine-*d*-15N. *Tetrahedron* 57: 6695-6701.
- Weibel, M.K. y Bright, H.J. (1971) The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.* 246: 2734-2744.
- Whittaker, M.M., Ballou, D.P. y Whittaker, J.W. (1998) Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase. *Biochemistry* 37: 8436
- Wierenga, R.K., Drenth, J. y Schulz, G.E. (1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD - as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 167: 725-739.
- Winberg, J.O. y McKinley-McKee, J.S. (1998) *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase: mechanism of aldehyde oxidation and dismutation. *Biochem. J.* 329: 561-570.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J. y Kalisz, H.M. (2000) Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.
- Wohlfahrt, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, D. y Leskovac, V. (2004) The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell Biochem.* 260: 69-83.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. y Hecht, H.-J. (1999) 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D* 55: 969-977.
- Wongnate, T., Sucharitakul, J. y Chaiyen, P. (2011) Identification of a catalytic base for sugar oxidation in the pyranose-2 oxidation reaction. *ChemBioChem Online* DOI: 10.1002/cbc.201100564
- Wünning, P. (2001) Applications and use of lignin as raw material. En: *Biopolymers. Lignin, humic substances and coal.* (Eds.: Hofrichter, M. y Steinbüchel, A.), Wiley -VCH, Weinheim, pp. 117-127.
- Xin, Y., Gadda, G. y Hamelberg, D. (2009) The cluster of hydrophobic residues controls the entrance to the active site of choline oxidase. *Biochemistry* 48: 9599-9605.

- Yelle, D.J., Wei, D.S., Ralph, J. y Hammel, K.E. (2011) Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in wood decayed by the brown rot basidiomycete . *Environ. Microbiol.* 13: 1091-1100.
- Yim, A.S.Y. y Wills, M. (2005) Asymmetric transfer hydrogenation using amino acid derivatives; further studies and a mechanistic proposal. *Tetrahedron* 61: 7994-8004.
- Yin, Y., Liu, P., Anderson, R.G. y Sampson, N.S. (2002) Construction of a catalytically inactive cholesterol oxidase mutant: investigation of the interplay between active site-residues glutamate 361 and histidine 447. *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 235-242.
- Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B.M., Divne, C., Nishino, T. y Samejima, M. (2001) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2050-2057.
- Yuan, B., Page, A., Worrall, C.P., Escalettes, F., Willies, S.C., McDouall, J.J.W., Turner, N.J. y Clayden, J. (2010) Biocatalytic desymmetrization of an atropisomer with both an enantioselective oxidase and ketoreductases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49: 7010-7013.
- Yue, Q.K., Kass, I.J., Sampson, N.S. y Vrieling, A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry* 38: 4277-4286.
- Zabel, R. y Morrell, J. (1992) Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London.
- Zámocký, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C. y Haltrich, D. (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* 338: 1-14.
- Zhao, G.H., Bruckner, R.C. y Jorns, M.S. (2008) Identification of the oxygen activation site in monomeric sarcosine oxidase: Role of Lys265 in catalysis. *Biochemistry* 47: 9124-9135.
- Zhao, Y. y Truhlar, D.G. (2008) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* 120: 215-241.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Películas

A continuación se describe el contenido de las películas que pueden encontrarse en el CD adjunto a la tesis, así como en las siguientes direcciones de Internet:

Películas 1 -3

<http://www.biochemj.org/bj/436/bj4360341add02.htm>

Película 4

<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/09/22/M111.282467.DC1/jbc.M111.282467-2.wmv>

Película 1. Migración del ligando al centro activo de la AAO: ruta completa

La película muestra la predicción obtenida con *PELE* de la ruta completa de migración del alcohol *p*-metoxibencílico (esferas de van der Waals en colores CPK) desde la superficie de la proteína hasta alcanzar el centro activo frente al lado-*re* del anillo de isoaloxacina del FAD (barras azules) que requiere importantes reajustes de las cadenas laterales de varios aminoácidos (barras en colores CPK).

Película 2. Detalle de la migración del ligando al centro activo de la AAO: vista lateral

La película muestra una vista lateral del centro activo de la AAO y los movimientos en detalle del alcohol *p*-metoxibencílico (esferas en colores CPK) hasta alcanzar el centro activo, frente al lado-*re* del anillo de isoaloxacina del FAD (barras azules) determinados por *PELE*. Se muestran las cadenas laterales de los residuos del centro activo que contribuyen a la migración del sustrato (Tyr92, Phe397, Leu315 e Ile391) y la His502 implicada en la catálisis (barras en colores CPK).

Película 3. Detalle de la migración del ligando al centro activo de la AAO: vista frontal

La película muestra una vista frontal del centro activo de la AAO (en el lado-*re* del anillo de isoaloxacina del FAD mostrado como barras azules) y el detalle de los movimientos del alcohol *p*-metoxibencílico (esferas de van der Waals en colores CPK) determinados por *PELE*, hasta alcanzar una posición catalítica próximo al anillo de isoaloxacina y con el grupo hidroxilo a 2.77 Å del Nε de la His502. Se observa la cadena lateral de la His502 y otros residuos del centro activo (Tyr92, Phe397, Leu315 e Ile391) que contribuyen al movimiento de migración del sustrato (en colores CPK).

Película 4. Migración del alcohol y el O₂ al centro activo de la AAO

La película muestra las predicciones obtenidas con *PELE* de la entrada sucesiva del sustrato reductor (2,4-hexadien-1-ol en este caso) y del oxidante (O₂) hasta alcanzar posiciones catalíticas cerca del cofactor de FAD (posiciones N5/C4a) y las dos histidinas del centro activo localizadas frente al lado-*re* del cofactor (de izquierda a derecha, His502 e His546). La migración del alcohol requiere movimientos de las cadenas laterales de los residuos (Phe397 y Tyr92 arriba y medio, respectivamente), mientras que el O₂ entra directamente por encima de la cadena lateral de un tercer residuo aromático (Phe501 abajo). El FAD y los sustratos se muestran como esferas de van der Waals, y los amino-ácidos como barras (en colores CPK).