

Informe final publicable de proyecto

Búsqueda de nuevas aplicaciones de dioxigenasas tipo Rieske explotando el poder catalítico del hierro

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172527

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2025

VILA GRIGORIO, María Agustina (Responsable Técnico - Científico)

GIORGI DILACIO, Victoria (Co-Responsable Técnico-Científico)

ARCE, Rodrigo (Investigador)

CARDOSO, Agustina (Investigador)

CARRERA GARESE, Ignacio (Investigador)

RODRÍGUEZ GIORDANO, Sonia (Investigador)

SEOANE MUNIZ, Gustavo (Investigador)

VEIGA RODRÍGUEZ, Jorge Nicolás (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Las dioxigenasas tipo Rieske (RDOx) son enzimas bacterianas comúnmente utilizadas para dihidroxilación de arenos con alta regio- y estereoselectividad, resultando en productos sumamente atractivos como materiales de partida en rutas de síntesis orgánica enantioselectivas. En los últimos años nuestro grupo ha descubierto novedosas actividades biocatalíticas para esta clase de metaloenzimas, donde el átomo de hierro de su sitio activo en vez de coordinarse con el O₂ (como ocurre durante la dihidroxilación) se coordina directamente con sustratos orgánicos catalizando otras transformaciones, como la síntesis de nitrilos mediante la deshidratación de oximas y la formación de enlaces C-N mediada por la formación de nitrenos. Esto último fue la base para el estudio de reacciones de aminación directa de enlaces C-H que permitió reportar una nueva aplicación para las RDOx. En el presente proyecto se exploraron nuevas actividades para estas enzimas, enfocados en la reactividad del hierro que presentan en su sitio activo con ligandos diferentes al oxígeno, específicamente otros sustratos gaseosos (como acetileno o monóxido de nitrógeno); buscando que estos pudieran ser activados e insertados en dobles enlaces de manera análoga al mecanismo de dihidroxilación, o dar lugar a otro tipo de reacciones. Además, se profundizó en el estudio de la actividad oxima deshidratasa como estrategia para la obtención de nitrilos, y se evaluó la capacidad de formar carbenos (de manera similar a la formación de nitrenos) para catalizar la formación de enlaces C-C.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Biocatálisis

Palabras clave: biocatálisis, dioxigenasas / hierro, oximas / nitrenos, carbenos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Antecedentes

Las dioxigenasas tipo Rieske (RDOx) son enzimas bacterianas que participan en el metabolismo de compuestos aromáticos. Catalizan la dihidroxilación de arenos con alta regio- y enantioselectividad para producir cis-ciclohexadienodiolos tipo 1 (figura 1), compuestos sumamente atractivos como materiales de partida en rutas de síntesis enantioselectivas (1,2). [AV1.1]Esta transformación, que carece de un equivalente directo en la química clásica, se lleva a cabo a escala preparativa mediante biotransformación con células enteras de *Escherichia coli* recombinantes que expresan RDOx, lo que garantiza la regeneración de los cofactores necesarios.

Nuestro grupo posee una vasta experiencia trabajando con estas enzimas, abarcando desde la producción de dioles en biorreactores de 5 litros (3) hasta la expansión de sus aplicaciones sintéticas mediante el desarrollo de mutantes de la Tolueno Dioxigenasa (TDO) para alterar su selectividad (4). Adicionalmente, hemos desarrollado y validado un modelo computacional del sitio activo de TDO para observar detalladamente las interacciones enzima-sustrato (figura 2) (5).

En los últimos años, hemos descubierto novedosas actividades biocatalíticas promiscuas para estas metaloenzimas, donde el átomo de hierro se coordina directamente con sustratos orgánicos en lugar de oxígeno. Reportamos la primera biotransformación de un grupo azida a nitrilo, dilucidando un mecanismo que implica la formación y posterior deshidratación de una oxima, así como la formación de una especie hierro-nitreno en el sitio activo de TDO (figura 3A) (6). Este primer reporte de actividad aldoxima deshidratasa para una RDOx es de gran interés por el valor industrial de los nitrilos (7,8). Además, la formación de nitrenos nos permitió reportar por primera vez reacciones de aminación intramolecular directa de enlaces C(sp³)-H utilizando bencensulfonilazidas trisustituidas, alcanzando conversiones del 45% para 1 gramo de sustrato (figura 3B) (9). Estos hallazgos nos han posicionado a nivel internacional y motivan la exploración de nuevas actividades enfocadas en la reactividad del hierro con ligandos distintos al oxígeno.

Problema de investigación

Las RDOx son sistemas multienzimáticos compuestos por una ferredoxina, una reductasa y una oxigenasa. En la subunidad oxigenasa reside el sitio activo, conformado por un átomo de hierro(II) coordinado por dos histidinas y un

ácido aspártico. Su función natural es activar el oxígeno molecular para su inserción en los arenos. No obstante, la evidencia previa de nuestro grupo demuestra que este centro catalítico puede interactuar con ligandos diferentes al O₂, como oximas (promoviendo su deshidratación a nitrilos (6)) y acilazidas (promoviendo la formación de nitrenos (9)).

El problema de investigación se centró en determinar hasta qué punto este centro metálico puede explotarse para catalizar reacciones sintéticas no naturales de alto valor. El estudio de actividades promiscuas enzimáticas representó un nuevo nicho para descubrir biocatalizadores que, potenciados por herramientas como la evolución dirigida (tal como se ha demostrado para hemoproteínas en los trabajos de Arnold y Fasan (10–14)), podrían alcanzar niveles catalíticos significativos.

Para abordar este problema, se plantearon tres grandes interrogantes/desafíos:

1. Deshidratación de oximas (Figura 4A[AV2.1]): Al haberse evidenciado esta actividad para algunas dioxigenasas, decidimos explorar la especificidad de sustrato en otros miembros de la familia RDOx (Cumeno- CDO, Bifenilo- BPDO, Benceno- BDO, Carbazol- CARDO, Anilina- ADO y Antranilato- ANDO) y estudiar en mayor profundidad el mecanismo a nivel computacional.

2. Formación de enlaces C-C mediadas por carbenos (figura 4B): A diferencia de la formación de nitrenos (proceso intramolecular), la formación de carbenos a partir de diazocompuestos (15–18) permitiría catalizar reacciones de ciclopropanación intermoleculares, formando nuevos enlaces C-C. Estudios preliminares mostraron bajas conversiones (~2%) con Clorobenceno- y Naftaleno Dioxigenasas (CBDO y NDO), lo que hace imperativa la exploración de las bibliotecas de mutantes de NDO desarrolladas previamente por nuestro grupo.

3. Activación de moléculas gaseosas (NO y C₂H₂ – figura 4C): Se desconoce en gran medida el potencial sintético del átomo de hierro (II) en las RDOx para activar sustratos gaseosos diferentes al oxígeno.

- Monóxido de nitrógeno (NO): Es una molécula biológicamente activa que interactúa con facilidad en centros metálicos (Fe-hemo, Zn-S y Cu). El NO es un excelente ligando para el estado ferroso (+2) del hierro, formando complejos hierro-nitrosilo donde el gas adquiere un carácter catiónico (NO⁺) capaz de participar en reacciones redox como la nitrosilación de tioles (19-20). Sin embargo, su aplicación con fines de síntesis orgánica no ha sido explorada. Estudios preliminares realizados con células enteras y donadores químicos de NO (NONOatos como NOC-5, NOC-7 y NOC-18) no lograron arrojar nuevos productos. El desafío radica en que, dentro del complejo entorno celular, el NO puede interactuar con múltiples metaloproteínas de forma inespecífica. Por lo tanto, el problema exige estudiar esta reactividad utilizando enzimas purificadas (NDO y CDO) frente a NO gaseoso, buscando canalizar la activación del gas de forma exclusiva hacia los sustratos de interés.

- Acetileno (C₂H₂): La coordinación de este alquino al hierro y su reactividad asociada son un terreno casi inexplorado. El primer complejo bien caracterizado de C₂H₂ unido a un átomo de hierro se reportó recién en 2019 (21), evidenciando que la activación del gas implica reacciones de protonación reductiva que convergen en la formación de complejos Fe-carbino. A diferencia de los carbenos, los carbinos como intermediarios de síntesis están profundamente subexplotados debido a la inmensa dificultad para controlar su alta reactividad y la carencia de fuentes eficientes para obtenerlos, limitando su uso casi exclusivamente a reacciones de metátesis de alquinos (22-25). Al presentar carácter nucleófilo o electrófilo, los complejos metal-carbino pueden generar alcoholes, alenos o alquenos terminales al reaccionar con compuestos carbonílicos (24). El desafío de investigación aquí es determinar si el entorno proteico tridimensional del sitio activo de las RDOx puede modular esta alta reactividad y permitir acoplos C-C. Además, se realizará un estudio computacional para evaluar la coordinación hierro-acetileno.

Objetivo General

Estudiar las actividades promiscuas de las dioxigenasas tipo Rieske, explotando la reactividad de su átomo de hierro frente a ligandos diferentes al oxígeno molecular para desarrollar nuevas reacciones químicas enantioselectivas en condiciones suaves y sustentables.

Objetivos Específicos

- Deshidratación de oximas: Expandir el estudio a nuevas dioxigenasas tipo Rieske (Cumeno- CDO, Bifenilo- BPDO, Benceno- BDO, Carbazol- CARDO, Anilina- ADO y Antranilato- ANDO) y evaluar el alcance a diferentes sustratos.
- Realizar un análisis *in silico* del mecanismo de deshidratación de oximas en TDO para su mejor comprensión.
- Reacciones de ciclopropanación: Evaluar la capacidad de distintas bibliotecas de mutantes de NDO de formar

carbenos y catalizar reacciones de ciclopropanación a partir de estireno y diazoacetato de etilo.

- Activación de gases (NO y C₂H₂): Evaluar las RDOx en reacciones con óxido nítrico y acetileno en condiciones anaerobias para la obtención de nuevos productos.
- Realizar análisis computacionales de la unión de NO y C₂H₂ al hierro para modelar sus posibles intermediarios de reacción y aspectos electrónicos en el sitio activo.

Justificación

• La presente investigación se justifica en la necesidad de encontrar alternativas más sustentables y selectivas a los métodos químicos clásicos basados en metales de transición. Al considerar a las RDOx como catalizadores de hierro insertados en un entorno proteico tridimensional, es posible aprovechar las ventajas de la biocatálisis: alta quimio, regio y estereoselectividad operando bajo condiciones de reacción suaves y amigables con el medio ambiente. El éxito en la incorporación de nuevas moléculas reactivas (como carbenos, NO y acetileno) ampliaría drásticamente el rango de sintones asequibles y expandirá el potencial de las RDOx en la síntesis orgánica contemporánea.

Metodología/Diseño del estudio

1. Producción y preparación general de los biocatalizadores

El éxito de las biotransformaciones propuestas depende críticamente de la estandarización y calidad de los biocatalizadores. Para las reacciones que involucran el uso de células enteras de cepas recombinantes, el crecimiento de la biomasa se llevó a cabo a gran escala utilizando un biorreactor de 5 litros, siguiendo los protocolos consolidados en nuestro laboratorio. Este enfoque permitió un control paramétrico estricto durante el cultivo, garantizando la cosecha de las células exactamente en su punto de máxima actividad enzimática. Posteriormente, se prepararon alícuotas que se almacenaron en freezer a -20 °C. Esta técnica de criopreservación asegura el mantenimiento de la actividad biocatalítica por períodos de hasta 12 meses. La estrategia de generar un único lote de crecimiento para cada biocatalizador minimiza significativamente la variabilidad biológica entre los múltiples experimentos planeados y optimiza los tiempos de producción.

Por otro lado, para los ensayos que requirieron el uso de enzimas aisladas y purificadas, se procedió a la expresión de las enzimas modificadas genéticamente con colas de polihistidina (His-tag) a escala de matraz. Tras la lisis celular, la purificación se realizó mediante técnicas de cromatografía de afinidad por iones metálicos utilizando columnas de níquel (25).

En todos los abordajes experimentales se incluyeron sistemáticamente tres tipos de controles negativos: a) blancos de reacción sin la adición de sustrato (para evaluar el metabolismo basal), b) blancos sin el biocatalizador (para descartar reacciones químicas de fondo), y c) controles biológicos empleando células hospedadoras transformadas únicamente con los plásmidos vacíos carentes de los genes de las dioxigenasas.

2. Abordaje I: Estudio de la actividad oxima deshidratasa

Para caracterizar la capacidad de las RDOx de convertir oximas a nitrilos, diseñó un flujo de trabajo que combina ensayos empíricos de biotransformación con el modelado molecular in silico.

Se realizó un screening inicial utilizando células enteras de los biocatalizadores seleccionados, con una alta densidad celular (OD₆₀₀=60) para asegurar una carga catalítica óptima. Los ensayos se llevaron a cabo en escala de 3 mL, en condiciones estrictamente anaerobias (para evitar la competencia con el oxígeno), agregando el sustrato correspondiente (compuestos 7-10, figura 5) en concentración de 5 mM y se incubaron a 28°C y 150 rpm durante 20 horas. Posteriormente, se realizó la extracción con diclorometano y las fases orgánicas se analizaron por cromatografía gaseosa (GC). El análisis por GC-FID se llevó a cabo utilizando una columna capilar SE-52 MEGA 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm. Se empleó un detector de ionización de llama (FID) e hidrógeno como gas portador. Tanto el inyector como el detector se mantuvieron a 280 °C. El programa de temperatura del horno se inició a 40 °C, seguido de una rampa de 50 °C/min hasta alcanzar los 200 °C; posteriormente, se aplicó un gradiente de 20 °C/min hasta los 220 °C, manteniendo esta temperatura durante 5 minutos.

Estudios computacionales (in silico):[VG3.1]

Se realizó el análisis del mecanismo de deshidratación de benzaldoxima en el sitio activo de la Tolueno Dioxigenasa

(TDO). Primero, se optimizó la geometría del sustrato empleando métodos de estructura electrónica (26) a través de los programas Hyperchem (27) y/o Gaussian09 (28), asegurando un modelo inicial de mínima energía. La preparación de la enzima TDO implicó la asignación precisa de los estados de ionización de los aminoácidos y la generación de las coordenadas de los hidrógenos, tarea que se ejecutó con el módulo Protonate 3D integrado en el entorno MOE(29, 30).

Con los modelos preparados, se realizaron experimentos de anclaje molecular (docking) utilizando el programa GOLD(31), siguiendo los lineamientos de nuestros reportes previos.5 Partiendo de la pose de menor energía obtenida para el sustrato, se "recortó" virtualmente el sitio de unión, inmovilizando las cadenas peptídicas del esqueleto estructural para evitar distorsiones no físicas. Los efectos de polarización e interacciones de largo alcance inducidos por la matriz proteica periférica se simularon matemáticamente implementando un dieléctrico de baja constante dentro de un modelo de solvatación implícita IEFPCM con términos no electrostáticos (modelo SMD)(32). Finalmente, la geometría de los estados estacionarios e intermediarios se optimizó empleando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT)(26) en Gaussian09(28) al nivel de teoría B3LYP/LANL2DZ, considerando ambos estados de espín del átomo de hierro. Esta estrategia ha demostrado gran capacidad predictiva en sistemas metaloenzimáticos similares(33-35).

3. Abordaje II: Estudio de la formación de carbenos y reacciones de ciclopropanación

La viabilidad de catalizar reacciones intermoleculares de ciclopropanación mediante la transferencia de carbenos fue evaluada mediante el screening de bibliotecas de mutantes de la Naftaleno Dioxigenasa (NDO) en un formato de placas de polipropileno de 48 pocillos profundos. Para asegurar un rigor estadístico que proporcione un 95% de probabilidad de cobertura sobre las variantes generadas, el protocolo exige analizar individualmente 34 colonias transformantes para las bibliotecas tipo NHT (en posiciones F202, H295, L307, F352 y W358), y 22 colonias para la biblioteca tipo RNC (en posición F224). En cada experimento, se incluyó sistemáticamente la cepa que expresa NDO nativa (WT) como línea base comparativa.

Inicialmente, células competentes de *E. coli* JM109(DE3) transformadas con la mezcla de plásmidos correspondientes a cada biblioteca se cultivaron en agar sólido LB-Amp e incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se preparó una "Placa de crecimiento" maestra dispensando 5 mL de medio LB-Amp líquido en cada pocillo. Una columna de la placa se inoculó con clones de NDO-WT y el resto con colonias transformantes individuales. Esta placa se incubó a 37 °C toda la noche bajo agitación. A partir de esta, se generó una "Placa de reacción" paralela, inoculando 50 uL del cultivo original en pocillos con medio fresco. Tras una fase de crecimiento de 2 horas a 37 °C y 600 rpm, se indujo la expresión de la dioxigenasa mediante la adición de IPTG. Posteriormente, la placa se incubó durante 20 horas a una temperatura inferior (28 °C) y 550 rpm para favorecer el correcto plegamiento tridimensional de las proteínas.

Culminada la fase de expresión, se midió la densidad celular final (OD600) y las placas se centrifugaron en rotor de placas a 4000 rpm por 20 minutos. Las células se suspendieron en el volumen de buffer de reacción necesario para homogeneizar todas las muestras a una OD600=60. Bajo condiciones de anaerobiosis, se agregaron los reactivos de ciclopropanación: la olefina estireno (10 mM) y el dador de carbenos diazoacetato de etilo (EDA, 20 mM), (figura 4B). La mezcla se incubó por 20 horas a 28 °C y 650 rpm.

Luego se agregó 2-feniletanol en una concentración final de 5 mM como estándar interno y se realizó la extracción con diclorometano, agitando en vortex durante 1 minuto y separando las fases por centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, y se concentró retomando en 100 uL de diclorometano. Posteriormente se realizó el análisis por cromatografía de gases acoplada a FID y a espectroscopía de masas (GC y GC-MS) con el fin de determinar las conversiones relativas. El análisis por GC-FID se llevó a cabo utilizando una columna capilar SE-52 MEGA 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 um. Se empleó un detector de ionización de llama (FID) e hidrógeno como gas portador. Tanto el inyector como el detector se mantuvieron a 280 °C. El programa de temperatura del horno se inició a 40 °C, seguido de una rampa de 50 °C/min hasta alcanzar los 200 °C; posteriormente, se aplicó un gradiente de 20 °C/min hasta los 220 °C, manteniendo esta temperatura durante 5 minutos. El volumen de inyección fue de 1 um. El análisis por GC-MS se realizó en las mismas condiciones, pero utilizando un detector de espectroscopía de masas en modo full scan.

Para seleccionar las cepas que presentan mayor conversión que la cepa nativa de NDO se utilizó la relación de áreas de los picos. La relación de área del pico correspondiente al producto y el pico correspondiente al estándar

interno para el control de reacción (NDO) se considera 1. Se realizó un promedio de las réplicas del control de reacción para cada biblioteca (6 réplicas por biblioteca), descartando aquellos valores que se alejaron de la media. Para cada clon a evaluar se calculó la relación del área del pico correspondiente al producto y el área del pico del estándar interno, comparando este valor con el obtenido para el control de reacción (NDO-WT). Aquellos en las que el factor fue mayor o igual a 1 se seleccionaron para un segundo screening y se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ desde la placa de crecimiento maestra almacenada para poder recuperar el plásmido original, el cual será secuenciado genéticamente para identificar la mutación responsable de los cambios. Los biocatalizadores "hit" seleccionados fueron finalmente sometidos a estudios de validación y escalado preparativo en volúmenes de 10 mL, en viales de 20 mL y condiciones de anaerobiosis como fue descrito para el cribado.

4. Abordaje III: Estudio de reacciones con nuevos sustratos gaseosos (NO y C₂H₂)

En el caso del monóxido de nitrógeno (NO), se utilizó frente a los sustratos 11 - 13 (figura 5) para evaluar su posible inserción electrofílica o radicalaria en los anillos aromáticos o en el doble enlace olefínico de la cadena lateral del estireno. Adicionalmente, se ensayaron el tiol (14) y el indol (15) para mapear otros niveles de reactividad como la S- y N-nitrosación.

Para el estudio de la activación del acetileno (C₂H₂), se utilizaron los sustratos 11-13.

Estas biotransformaciones se realizaron en viales herméticos a una escala de 10 mL, empleando 10 mM del sustrato orgánico correspondiente, y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo agitación durante 20 horas. Previo a la adición de los sustratos gaseosos y orgánicos, el oxígeno disuelto y el aire en el espacio de cabeza del vial fueron desplazados exhaustivamente mediante el burbujeo y purga con argón.

Tras la extracción con acetato de etilo, las fases orgánicas se analizaron mediante Cromatografía de Gases y de observarse posibles productos se utilizó GC acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Los compuestos novedosos detectados serían aislados a escala preparativa mediante cromatografía en columna de gel de sílice o cromatografía de placa fina (TLC preparativa), y posteriormente sometidos a análisis bidimensionales de RMN para la elucidación inequívoca de su estructura.

Finalmente, los hallazgos experimentales serían complementados con estudios teóricos *in silico* orientados a modelar la termodinámica de los intermediarios reactivos formados por el NO y el C₂H₂ en el entorno de la enzima TDO. La preparación de los modelos atómicos y las optimizaciones geométricas mecano-cuánticas de los complejos de hierro-gas se ejecutarán adheriendo estrictamente al mismo procedimiento metodológico DFT descrito con anterioridad.

Resultados, análisis y discusión

Deshidratación de oximas

Se estudió la capacidad de CDO, BPDO, BDO, ADO, ANDO y CARDO de catalizar la deshidratación de benzaldoxima ausencia de oxígeno. En este caso se realizó el crecimiento de las cepas de *E. coli* JM109 DE3 recombinantes que expresan los genes de CDO, BDO y BPDO, y de las cepas recombinantes de *E. coli* BW25113 que expresan los genes de ADO, ANDO y CARDO. Las reacciones se realizaron por quintuplicado utilizando células en reposo con una concentración correspondiente a OD₆₀₀= 60, bajo atmósfera de argón en una escala de 3 mL y una concentración de sustrato de 5 mM, incubando toda la noche a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 rpm. Tras la extracción con diclorometano, los crudos se analizaron por cromatografía gaseosa.

Los resultados obtenidos mostraron que ADO, ANDO, CARDO y BDO no son capaces de deshidratar la benzaldoxima, ya que no se observó formación de producto y se recuperó el sustrato agregado. Esto posiblemente se deba a la gran diferencia estructural respecto a los sustratos que aceptan naturalmente estas enzimas. Las biotransformaciones con CDO y BPDO sin embargo, mostraron conversiones hacia benzonitrilo del orden de 15% y 5% respectivamente, siendo menores que las obtenidas anteriormente con NDO (35%) y TDO F366V (55%).

Durante este primer screening se observaron varios problemas de reproducibilidad principalmente con los sistemas ADO, ANDO y CARDO, recientemente incorporados a nuestra colección. Para determinar las posibles causas de esto, estudiamos la expresión de estas enzimas en las condiciones de trabajo, confirmando que los genes no se estaban expresando. Se realizaron pruebas en diferentes medios (LB y TB) y a diferentes temperaturas de expresión post-inducción ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $28\text{ }^{\circ}\text{C}$) buscando mejoras en las condiciones de expresión, sin lograr avances en este sentido, por lo

que concluimos que existe un problema en la construcción de los sistemas de expresión para estas enzimas. Como perspectiva de este trabajo surge la necesidad de modificar estos sistemas y optimizar las condiciones de expresión para poder estudiar estas enzimas a futuro.

Posteriormente se estudiaron las biotransformaciones de 2- y 4-bromo-benzaldoxima con NDO, BPDO, CDO y TDOF366V por haber sido los biocatalizadores que mostraron mejores conversiones, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Para la 2-bromobenzaldoxima, las conversiones fueron: NDO = 27%, BPDO= no se detectó producto, CDO= 28%, TDO F366V = 19%; mientras que para la 4-bromobenzaldoxima se obtuvieron conversiones de NDO = 17%, BPDO= no se detectó producto, CDO= 42%, TDO F366V = 10%. Estos resultados muestran de manera interesante la capacidad de tres de los cuatro biocatalizadores estudiados de deshidratar las oximas de estos nuevos sustratos y reflejan la importancia de la geometría de las moléculas para acomodarse en los sitios activos, dando lugar a conversiones variables dependiendo, en este caso, del patrón de sustitución en la molécula.

Este estudio confirma la capacidad de distintos miembros de la familia de las dioxigenasas tipo Rieske de deshidratar oximas y su potencial aplicación en la síntesis de nitrilos, pero indica también que es necesario un estudio de las interacciones enzima – sustrato para seleccionar el biocatalizador más adecuado en cada caso.

Por otra parte, se realizó el estudio *in silico* de la biotransformación de benzaldoxima en el modelo computacional del sitio activo de TDO. Esto permitió visualizar las diferentes interacciones enzima – sustrato que se establecen a lo largo del ciclo catalítico e identificar los residuos aminoacídicos involucrados en este proceso, de acuerdo con el esquema que se muestra en la figura 6. Así se pudo observar la estabilización de la oxima en el sitio activo de TDO asistida por el hierro, el Asp316 y la Phe366. Luego, se observa una disminución en la distancia entre el O de Glu373 y el H bencílico del sustrato que favorece la desprotonación en esta posición, dando lugar a la formación de benzonitrilo en el sitio activo de TDO.

Para el ensayo con enzimas purificadas se utilizaron las cepas que expresan únicamente las subunidades alfa y beta de las oxigenasas de NDO y CDO, dado que nuestra hipótesis suponía que la reacción es llevada adelante exclusivamente por la coordinación al hierro del sitio activo que actúa como catalizador en la deshidratación de las oximas. Se lograron purificar de manera adecuada las subunidades del sistema NDO, mientras que tras varios intentos no se obtuvieron cantidades suficientes de las subunidades de CDO. Se procedió entonces a ensayar la biotransformación de la 2-bromobenzaldoxima mediada por las subunidades alfa y beta de la oxigenasa de NDO, dado que fue el sustrato que mostró mejores resultados para esta enzima. Tras la extracción del medio de reacción se recuperó el sustrato y no se observó formación de producto, lo cual puede tener dos causas. Una de ellas es que las subunidades no se encuentren adecuadamente ensambladas y plegadas tras la purificación. Para comprobar esto, se deberían acoplar a la reacción las otras dos enzimas del sistema (ferredoxina y reductasa) y realizar la reacción natural de dihidroxilación, evidenciando así que el sistema es funcional. La otra causa podría ser que sea necesaria una transferencia de electrones provenientes de la ferredoxina y la reductasa del sistema NDO para catalizar la deshidratación de la oxima. En ambos casos es necesario proceder a la purificación de las otras dos enzimas para acoplarlas *in-vitro*, lo cual por el tiempo de trabajo que insumiría surge como una perspectiva a futuro de este proyecto.

Reacciones de ciclopropanación

Se estudió la capacidad de NDO de catalizar reacciones de ciclopropanación a partir de estireno y diazoacetato de etilo (EDA). Para esto se evaluó la cepa nativa y mutantes en las posiciones F202, F224, H295, L307, F352 y W358 clonados y expresados en cepas de *Escherichia coli* JM109 (DE3). Para asegurar un 95% de cobertura de las variantes de NDO generadas se analizaron 34 clones de bibliotecas NHT y 22 clones para la biblioteca RNC (F224). En cada caso se integró como control de reacción se utilizó la cepa expresando NDO nativa (NDO-WT), incluyendo 5 réplicas para realizar la comparación de resultados y seleccionar aquellos mutantes que mostraran conversiones mayores.

Los resultados obtenidos comprobaron que NDO puede catalizar reacciones de ciclopropanación *in vivo*. En la figura 7 se muestra el cromatograma obtenido en la reacción con la NDO-WT (Figura 7A) y el espectro de masa de ambos diastereómeros del producto obtenido (Figura 7B)

En una primera ronda se evaluaron los mutantes de cada biblioteca en placas de 96 pocillos. Así se seleccionaron los clones de las diferentes bibliotecas que mostraron conversiones iguales o mayores a la NDO-WT, y con ellos se realizó un segundo cribado para comparar los resultados. Todos los mutantes seleccionados fueron conservados en

freezer a -80°C con 20% de glicerol como crioprotector. El segundo cribado de mutantes seleccionados mostró algunas variantes con conversiones entre 1.5 y 3 veces superiores a la enzima nativa, especialmente en las posiciones W358 y F352, lo cual las convierte en fuertes candidatas para futuros estudios de optimización por su mayor impacto catalítico.

Posteriormente se realizó el escalado de las reacciones utilizando los dos mutantes que dieron mayores conversiones: uno en la posición W358 y otro en F352. Se realizó la producción de biomasa de cada uno de estos clones y de la cepa nativa en escala de matraz, y las células se resuspendieron en buffer de reacción ajustando la densidad óptica en un valor de 60 (OD_{600nm}). El escalado se realizó bajo condiciones anaeróbicas en viales de 20 mL conteniendo 10 mL de mezcla de reacción, utilizando las mismas concentraciones de sustratos que en el screening. El análisis por GC-FID mostró que no se obtienen conversiones mayores a la obtenida con la NDO-WT en esta escala, por lo que deberá estudiarse en mayor profundidad qué aspectos del escalado afectan a la reacción.

Reacciones con otros gases (NO y C₂H₂)

Se desconoce en gran medida el potencial del átomo de hierro (II) en las RDOx para activar sustratos gaseosos diferentes al O₂. El proyecto proponía una primera aproximación para estudiar esto utilizando óxido nítrico y acetileno.

Las reacciones con óxido nítrico no mostraron formación de productos al utilizar las subunidades alfa y beta de la oxigenasa de NDO purificadas, los compuestos orgánicos se recuperaron de igual manera tanto en presencia de las dioxigenasas como en los controles correspondientes. Esto sugiere que el NO no es capaz de coordinarse al hierro del sitio activo, o en caso de hacerlo, no es activado para reaccionar con los sustratos orgánicos. Nuevamente surge la pregunta de si serán necesarias las demás subunidades del sistema (ferredoxina y reductasa) para la activación de este sustrato. Ante estos resultados experimentales y dado el tiempo que implican los cálculos computacionales y la disponibilidad del clúster, se desestimó el modelado en este caso.

Las reacciones con acetileno se realizaron también en condiciones anaerobias utilizando el derivado sililado, y actualmente nos encontramos analizando estas reacciones. En cuanto al estudio in-silico, se confirmó que el estado de alto espín del hierro del sitio activo es el de menor energía. Tras la coordinación del acetileno, el residuo Asp376 libera una de sus uniones, dejando al centro metálico tetracoordinado. Las distancias del enlace Fe-C resultaron ser de 2.36 y 2.43 Å, y la unión del sustrato se estabilizó mediante un enlace de hidrógeno no convencional con la Glu373. Esto indica una interesante interacción entre el hierro y el acetileno que a su vez genera un cambio en la coordinación del metal. De acuerdo con nuestros estudios previos (5), la distancia Fe-C en este caso es el doble que la distancia Fe-O, lo cual podría impactar negativamente en el posicionamiento de los sustratos aromáticos una vez coordinado el acetileno ya que para la reacción de dihidroxilación la distancia O-C suele ser entre 3 y 4 Å. Los resultados experimentales con NDO no mostraron formación de productos al utilizar bromobenceno ni estireno, recuperándose estos sustratos intactos. Las biotransformaciones con resto de las enzimas se encuentran en curso.

Conclusiones y recomendaciones

1. Se confirmó la capacidad de nuevos miembros de la familia de Dioxigenasas tipo Rieske para catalizar reacciones de deshidratación de oximas y obtener nitrilos a partir de distintos sustratos.
2. Este estudio permite concluir que las distintas Dioxigenasas muestran selectividades diferentes ante la diversidad estructural de los sustratos. En general, las moléculas más voluminosas requieren cavidades catalíticas de mayor volumen.
3. Los cálculos in-silico permitieron observar las interacciones enzima-sustrato en el proceso de deshidratación de la benzaldoxima, desde la estabilización del sustrato hasta la liberación del benzonitrilo producido. En el intermediario de deshidratación se identificó al glutámico en posición 373 como importante para la desprotonación de la posición benzílica que lleva a la formación del nitrilo. Como perspectiva podría estudiarse experimentalmente el efecto de este aminoácido mediante su sustitución por otro que no tenga la capacidad de tomar ese protón (por ej. alanina), lo cual debería anular la capacidad oxima deshidratasa de TDO.
4. Las reacciones in-vitro con la oxigenasa de NDO purificada no mostraron los resultados esperados. Es necesario purificar la reductasa y la ferredoxina para acoplarlas a las subunidades alfa y beta de la oxigenasa en ensayos in vitro, para evaluar la dependencia de transferencia de electrones en la deshidratación de oximas.

5. Se confirmó la capacidad de la Naftaleno Dioxigenasa de catalizar reacciones de ciclopropanación intermolecular mediada por carbenos. El análisis de las bibliotecas de mutantes sugiere que las sustituciones del triptófano 358 y la fenilalanina 352 serían las de mayor impacto en esta reacción. Sin embargo, el escalado de las reacciones con los clones seleccionados no mostraron el aumento de conversión esperado. Como perspectiva nos proponemos profundizar en la causa de estos resultados, evaluando si se debió a un efecto del escalado o al screening de selección de los clones.

6. Actualmente nos encontramos ensayando experimentalmente la activación de acetileno. Los estudios in-silico mostraron su capacidad de coordinarse al hierro del sitio activo, pero solo los datos experimentales demostrarán si esto es suficiente para su activación y posterior reacción con los sustratos aromáticos ofrecidos.

7. Se evidenció un problema en la expresión de los sistemas enzimáticos de ADO, ANDO y CARDO, clonados en un sistema pBAD18 y expresados en la cepa de E. coli BW25113. Este hallazgo resultó de suma importancia dado nuestro interés por explorar estos sistemas enzimáticos subexplorados. Nos proponemos construir sistemas de expresión análogos a los de TDO y NDO, en vectores derivados de pKK223-3 y expresados en E. coli JM109, de modo de estandarizar los sistemas que expresan las dioxigenasas para nuestro trabajo a futuro.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Rieske Dioxygenases as catalysts for nitrile synthesis	Sofía Gasperi, Danilo Rodríguez, Agustina Cardoso, Nicolás Veiga, Sonia Rodríguez, Ignacio Carrera, Agustina Vila	doi		En proceso
Presentación en evento	Explorando nuevas aplicaciones de Dioxygenasas tipo Rieske: reacciones de ciclopropanación	Rodrigo Arce1 , Victoria Giorgi1 , Ignacio Carrera2 , Agustina Vila1	URL	https://hdl.handle.net/20.500.12008/54248	Finalizado
Presentación en evento	Estudio de la actividad oxima deshidratasa en Dioxygenasas tipo Rieske	Agustina Cardoso1 , Martin Cordon1, Diego Umpiérrez1,2, Nicolás Veiga3 , Sonia Rodríguez1 , Ignacio Carrera1 , Agustina Vila1*	URL	https://hdl.handle.net/20.500.12008/54249	Finalizado

Referencias bibliográficas

1. Hudlicky, T. & Reed, J. W.. *Synlett* 5, 0685–0703 (2009).
2. Hudlicky, T.. *ACS Omega* 3, 17326–17340 (2018).
3. Vila, M. A. et al. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 96, 14–20 (2013).
4. Vila, M. A. et al. *Adv. Synth. Catal.* 359, 2149–2157 (2017).
5. Vila, M. A. et al. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133, 410–419 (2017).
6. Vila, M. A. et al. *ChemBioChem* 17, 291–295 (2016).
7. Betke, T. et al. *ChemBioChem* 19, 768–779 (2018).
8. Plass, C. et al. *ACS Catal.* 9, 5198–5203 (2019).
9. Vila, M. A., Steck, V., Giordano, S. R., Carrera, I. & Fasan, R. *ChemBioChem* 1900783, 1–8 (2020).
10. Brandenburg, O. F., Miller, D. C., Markel, U., Ouald Chaib, A. & Arnold, F. H. *ACS Catal.* 9, 8271–8275 (2019).
11. Brandenburg, O. F., Fasan, R. & Arnold, F. H. *Curr. Opin. Biotechnol.* 47, 102–111 (2017).
12. Hammer, S. C., Knight, A. M. & Arnold, F. H.. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 7, 23–30 (2017).
13. Chen, K. & Arnold, F. H. *Nat. Catal.* (2020). doi:10.1038/s41929-019-0385-5
14. McIntosh, J. A. et al. *Angew. Chemie* 52, 9309–9312 (2013).
15. Bordeaux, M., Tyagi, V. & Fasan, R. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 1744–1748 (2015).
16. Fasan, R. & Chandgude, A. L. *Angew. Int. Ed.* 57, 15852–15856 (2018).
17. Coelho, P. S. et al. *Nat. Chem. Biol.* 9, 485–487 (2013).
18. Brandenburg, O. F., Chen, K. & Arnold, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 8989–8995 (2019).
19. Tructure, S. *Organomet. Chem. Catal.* 197–224 (2007). doi:10.1007/978-3-540-46129-6_11
20. Mori, M. & Kitamura, T. *Compr. Organomet. Chem. III* 11, 271–310 (2007).
21. Ignarro, L. J. *J. Physiol. Pharmacol.* 53, 503–514 (2002).
22. Radi, R. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 828–835 (1996).
23. Stojanovi;, S., Stani; et al. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 11, 256–262 (2004).
24. Möller, M. N. et al. *J. Biol. Chem.* 294, 14776–14802 (2019).
25. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
26. Lewars, E. G. *Introduction to Quantum Mechanics in Computational Chemistry, Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics.* (Springer, Cham, 2016).
27. Inc., H. *Hyperchem 7.5 for Windows Molecular Modeling System.* (2002).
28. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehar, D. J. F. Gaussian 09. (2009).
29. Labute, P.. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 75, 187–205 (2009).
30. Labute, P. *Molecular Operating Environment (MOE).* (2014).
31. Jones, G., Willet, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R.. *J. Mol. Biol.* 267, 727–748 (1997).
32. Marenich, A. V., Cramer, C. J. & Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* 113, 6378–6396 (2009).
33. Bassan, A., Blomberg, M. R. A. & Siegbahn, P. E. M.. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 439–452 (2004).
34. Siegbahn, P. E. M.. *J. Comput. Chem.* 22, 1634–1645 (2001).
35. Siegbahn, P. E. M. & Blomberg, M. R. A.. *Chem. Rev.* 100, 421–437 (2000)

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

