



Doctoral Thesis

Probing the role of the proximal ligand in cytochrome P450cam by recombinant incorporation of selenocysteine

Author(s):

Aldag, Caroline

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005950841> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 18632

**Probing the role of the proximal ligand in cytochrome
P450cam by recombinant incorporation of
selenocysteine**

A dissertation submitted to
ETH Zürich

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by

Caroline Aldag

Dipl. Natw. ETH

Born on March 21, 1979
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Donald Hilvert, examiner
Prof. Dr. François Diederich, co-examiner
Prof. Dr. Willem Koppenol, co-examiner

Zürich, 2009

Abstract

Cytochrome P450 enzymes are heme proteins that catalyze a great variety of oxidations, amongst others, stereo- and regioselective hydroxylations of non-activated C-H bonds. The function and spectroscopic characteristics of this superfamily of enzymes have been largely attributed to the structural components of the protein environment in the heme active site, specifically a cysteine thiolate that acts as a proximal axial ligand. The catalytic reaction cycle of cytochrome P450 involves two electron transfer steps. Electrons are donated by cytochrome P450-specific reductases. The study of P450 enzymes is challenging due to their high reactivity and due to the limitations posed on the mutagenesis of the porphyrin containing active site by its sensitive geometry.

In order to examine the role of the axial ligand, a cytochrome P450cam (CYP101) variant in which the axial cysteine is replaced by selenocysteine (C357U) was produced and investigated as part of this thesis. Sulfur and selenium are nearly isosteric, but their corresponding thiol and selenol compounds differ in their pK_a and electrode potentials. Thus, modulating the heme axial ligand can be mechanistically informative. The insertion of selenocysteine was achieved by using a genetic element known as the selenocysteine insertion sequence (SECIS) downstream of a UGA codon, which enables site-specific, ribosomal incorporation of selenocysteine into proteins. The C357U mutant was overexpressed in *E. coli*, and the effects of the selenocysteine substitution were characterized by various biochemical and biophysical methods.

In Chapter 2, the design, expression and purification procedure of this artificial selenoprotein is reported in detail. SECIS elements are highly conserved in structure and partially in sequence. An important achievement of this thesis is the successful design of a functional SECIS element that concurrently minimizes mutations in the P450cam sequence. Due to sequence restrictions, still two extra mutations at position 365 (R365L) and 366 (E366Q) had to be introduced besides the cysteine-to-selenocysteine substitution at position 357 in the P450cam sequence. To test whether experimentally observed differences between wild type and the selenoprotein are due to these two additional mutations or the effect of the selenium incorporation, a control P450cam variant was prepared containing the R365L/E366Q mutations (denoted as P450cam*). All three P450cam variants, wild type, P450cam* and C357U P450cam* were kinetically and spectroscopically characterized and show a few important

differences. The sulfur-to-selenium substitution subtly modulates the structural, electronic and catalytic properties of the enzyme. Thus the overall catalytic activity of C357U P450cam decreases 2-fold compared to P450cam* and 4-fold compared to wild type P450cam. The oxidation of camphor also becomes uncoupled: the hydrogen peroxide production rate of C357U P450cam* is about 5-to 10-times higher than for the wild type enzyme or P450cam*. Comparison of the crystal structures of P450cam* and C357U P450cam* reveals small deviations on the proximal side of the heme probably due to the longer iron-selenium-bond (2.47 Å compared to 2.39 Å of the iron-sulfur-bond). The electrode potential of C357U P450cam* was lower compared to P450cam* and wt P450cam.

Chapter 3 focuses on the individual electron transfer steps and on binding of oxygen. It is widely accepted that transfer of the first electron is rate limiting in the reaction cycle. C357U P450cam* was reduced about 2-fold slower than P450cam* and 4-fold slower than the wild type enzyme, which reflects the relative reactivity observed in the steady-state measurements. After the first electron is transferred, oxygen binds to the ferrous iron. Oxygen binding is the fastest reaction observed in the experiments described in Chapter 3; wild type P450cam and P450cam* bind oxygen at similar rates, while the selenoprotein forms the oxygen complex significantly faster. The subsequent transfer of the second electron is considerably faster than the first electron transfer but similar for all three proteins.

In analogy to peroxidases, the oxo-ferryl π -cation radical intermediate (“compound I”) is generally thought to be the key oxidant in the reaction cycle. However, in contrast to peroxidases, this intermediate has never been detected in cytochrome P450, and there is an ongoing debate about its existence. Because a cytochrome P450 variant whose axial ligand is replaced by selenocysteine was predicted to stabilize compound I (1), we attempted to generate the high-valent oxidation state artificially by oxidation of the heme cofactor through peracids. In the experiments presented in Chapter 4, wild type P450cam and P450cam* show no direct evidence for compound I, but rather show characteristics of a mesomeric form of compound I, an oxo-ferryl and a tyrosine radical close to the heme. The selenoprotein exhibits a different reaction behavior; it shows slower oxidation kinetics in stopped-flow experiments with peracid. Furthermore, freeze-quench EPR experiments reveal at least one additional radical species.

However, the identity of this newly observed, short-lived radical species in the C357U mutant remains unclear and a profound spectroscopic characterization will be needed in the future to verify if the intermediate of the selenoprotein is indeed compound I.

Zusammenfassung

Cytochrom P450-Enzyme sind Hämproteine die eine Vielzahl von Oxidationen katalysieren, unter anderem stereo- und regioselektive Hydroxylierungen von unaktivierten C-H-Bindungen. Die Funktion und spektroskopischen Eigenschaften dieser Enzym-Superfamilie werden grösstenteils auf strukturelle Komponenten der Proteinumgebung der aktiven Tasche zurückgeführt, insbesondere auf ein Cysteinthiolat, das als proximaler axialer Ligand des Häms dient. Der katalytische Reaktionszyklus beinhaltet zwei Elektronentransferschritte. Elektronen werden von Cytochrom-P450-spezifischen Reduktasen auf das P450 übertragen. Untersuchungen an P450-Enzymen sind eine Herausforderung aufgrund ihrer hohen Reaktivität und der limitierten Möglichkeiten, die Häm-bindende aktive Tasche zu mutagenisieren, weil diese eine empfindliche Geometrie hat.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Rolle des axialen Liganden zu erforschen; es wurde eine Mutante des Cytochrom P450cam (CYP 101) produziert, bei dem das axiale Cystein gegen Selenocystein (C357U) ausgetauscht wurde. Schwefel und Selenium sind nahezu isosterisch, aber ihre entsprechenden Thiol- und Selenolverbindungen unterscheiden sich in ihrem pK_a und ihren Elektrodenpotentialen. Daher könnte man durch Modulation des axialen Liganden mechanistische Informationen erhalten. Das Einfügen von Selenocystein in P450cam wurde ermöglicht durch die Anwendung eines genetischen Elements, der Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS), nachfolgend eines UGA-Codons. Dieses Element bewirkt ortsspezifischen und ribosomalen Einbau von Selenocystein in Proteine. Die C357U-Mutante wurde überproduziert in *E.coli*, und der Effekt der Selenocysteinsubstitution wurde durch mehrere biophysische und biochemische Methoden untersucht.

In Kapitel 2 wurde das Design, die Expression und die Aufreinigungsmethode im Detail berichtet. SECIS-Elemente sind in ihrer Struktur und teilweise auch in ihrer Sequenz stark konserviert. Daher war das erfolgreiche Design eines funktionellen SECIS-Elements, welches gleichzeitig auch Mutationen in der P450cam-Sequenz minimiert, ein wichtiges Teilergebnis dieser Doktorarbeit. Aufgrund dieser Sequenzeinschränkungen mussten allerdings trotzdem zwei extra Mutationen an der Position 365 (R365L) und 366 (E366Q) in der P450cam-Sequenz eingefügt werden, abgesehen vom Selenocysteineinbau an der Position 357. Um herauszufinden ob die experimentell beobachteten Unterschiede durch die zwei extra Mutationen oder durch

den Selenocysteineinbau hervorgerufen wurden, wurde eine Kontroll-P450cam-Variante hergestellt, die nur die beiden extra Mutationen R365L/E366Q enthält (genannt „P450cam*“). Alle drei P450cam-Varianten, wt P450cam, P450cam* und C357U P450cam* wurden kinetisch und spektroskopisch charakterisiert und zeigen ein paar wichtige Unterschiede. Der Schwefel-zu-Selenium-Austausch ändert leicht die strukturellen, elektronischen und katalytischen Eigenschaften des Enzyms. Es zeigte sich dass die katalytische Gesamtaktivität im Falle des Selenoproteins zweifach verringert ist im Vergleich zu P450cam* und vierfach im Vergleich zum wt-Protein. Die Campheroxidation war entkoppelt, und die Wasserstoffperoxid-Bildungsrate ist etwa 5-10 mal höher im Vergleich zu P450cam* und wt P450cam. Ein Vergleich der Kristallstrukturen von P450cam* und C357U P450cam* zeigt kleine Abweichungen auf der proximalen Seite des Häms; wahrscheinlich werden diese durch die längere Fe-Se-Bindung hervorgerufen (2.47 Å im Vergleich zu 2.39 Å der Fe-S-Bindung). Ausserdem war das Elektrodenpotenzial im Falle des Selenoproteins leicht erniedrigt im Vergleich zu wt P450cam oder P450cam*.

In Kapitel 3 werden die einzelnen Elektronenübertragungsschritte und die Bindung von Sauerstoff genauer untersucht. Es ist eine allgemein akzeptierte Hypothese, dass der erste Elektronentransferschritt geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion ist. C357U P450cam* wurde etwa zweimal langsamer reduziert als P450cam*, und viermal langsamer als das wt-Enzym. Dieser Befund ähnelt der relativen Reaktivität die auch in den Reaktionen unter stationären Bedingungen (Kapitel 2) gefunden wurde. Nachdem das erste Elektron übertragen wurde bindet Sauerstoff an das zweifach-positive Eisen. Die Bindung von Sauerstoff ist die schnellste Reaktion die in den Experimenten in Kapitel 3 untersucht wurden; wt P450cam und P450cam* binden Sauerstoff in ähnlicher Geschwindigkeit, hingegen bildet das Selenoprotein den Sauerstoffkomplex beträchtlich schneller. Der darauffolgende zweite Elektronenübertragungsschritt ist schneller als der erste und ähnlich in den Geschwindigkeiten für alle drei Proteine.

In Analogie zu Peroxidasen wird als Oxidanz das Oxo-Ferryl Porphyrin- π -Kation Radikalintermediat („compound I“) im Reaktionszyklus angenommen. Allerdings, im Gegensatz zu den Peroxidasen, konnte dieses Intermediat bis jetzt noch nicht in Cytochrom P450 detektiert werden, und es gibt eine bis heute andauernde Kontroverse über die Existenz dieser Spezies. Es wurde von Shaik und Mitarbeitern vorausgesagt dass eine Selenocystein-enhaltende Variante von P450cam „compound I“ stabilisieren

sollte (1). Der hohe Oxidationszustand von „compound I“ kann künstlich durch Persäuren erzeugt werden. Das wt-Enzym und P450cam* zeigen in den Experimenten, beschrieben in Kapitel 4, keinen Hinweis auf „compound I“, sondern vielmehr auf eine mesomere Spezies von „compound I“, eine oxo-Ferryl-Spezies mit einem Tyrosinradikal nahe des Häms. Das Selenoprotein hingegen verhält sich anders, es zeigte eine langsamere Oxidationskinetik in Stopped-Flow-Experimenten, und in Freeze-quench EPR-Experimenten konnte mindestens eine zusätzliche neue Radikalspezies nachgewiesen werden. Leider konnte die Identität dieser kurzlebigen Radikalspezies bis jetzt nicht geklärt werden und weitere spektroskopische Experimente werden in der Zukunft notwendig sein um zu klären, ob es sich bei der neuentdeckten, kurzlebigen Spezies des Selenoproteins um das „compound I“-Intermediat handelt.