

**Supplemental Table S1.** Fe<sup>2+</sup> bonding parameters used in MD simulations.

Simulation duration [ns]	Bond (Å) and angle (°) values		Bond [kcal mol <sup>-1</sup> ]/Å <sup>2</sup> and angle [kcal mol <sup>-1</sup> ]/rad <sup>2</sup> force constants			
	bond FE-O	angle FE-O-C	WT		mutants	
			bond FE-O	angle FE-O-C	bond FE-O	angle FE-O-C
0-28	1.85	90	170	100	170	100
28-40	1.85	90	170	10	170	50
40-52	1.85	90	170	5	170	20
52-76	1.85	90	50	10	50	20
76-106	1.85	90	0	0	0	0

**Supplemental Table S2.**<sup>a</sup> Apparent Kinetic Parameters for 3HAO mutants.

Mutated residues in bacterial system	Corresponding residues in human system	K <sub>m</sub> (HAA, μm)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> 10 <sup>3</sup> (s <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )
WT	WT	22.4±2.7	25	1.116
R47A	R43A	147.0±14.0	0.022	0.15
R99A	R95A	872.0±140	0.0046	0.005
E110A	E105A	10.2±1.1	0.012	1.17

**Supplemental Table S3.** Hydrogen bonds between 3-Ohaa bound into the active site of different 3HAO variants and the surrounding amino acid residues. Percentage of simulation time during which the hydrogen bond was present is given in the table.

Aminoacid N° 3HAO varinats	Met35	Arg43	His47	Glu53	His91	Leu137	Gly138	Leu141
WT	0.0	99.2	50.6	28.5	2.8	11.5	19.5	4.0
Arg43Ala	0.0	0.0	44.2	49.2	4.9	4.8	6.3	5.2
Arg95Ala	3.4	51.9	42.6	49.2	4.5	5.5	5.1	1.9
Glu105Ala	0.0	100.0	51.5	29.9	3.2	18.4	14.0	7.9

<sup>a</sup> Y. Zhang, K. L. Colabroy, T. P. Begley and S. E. Ealick, *Biochemistry*, 2005, **44**, 7632-7643

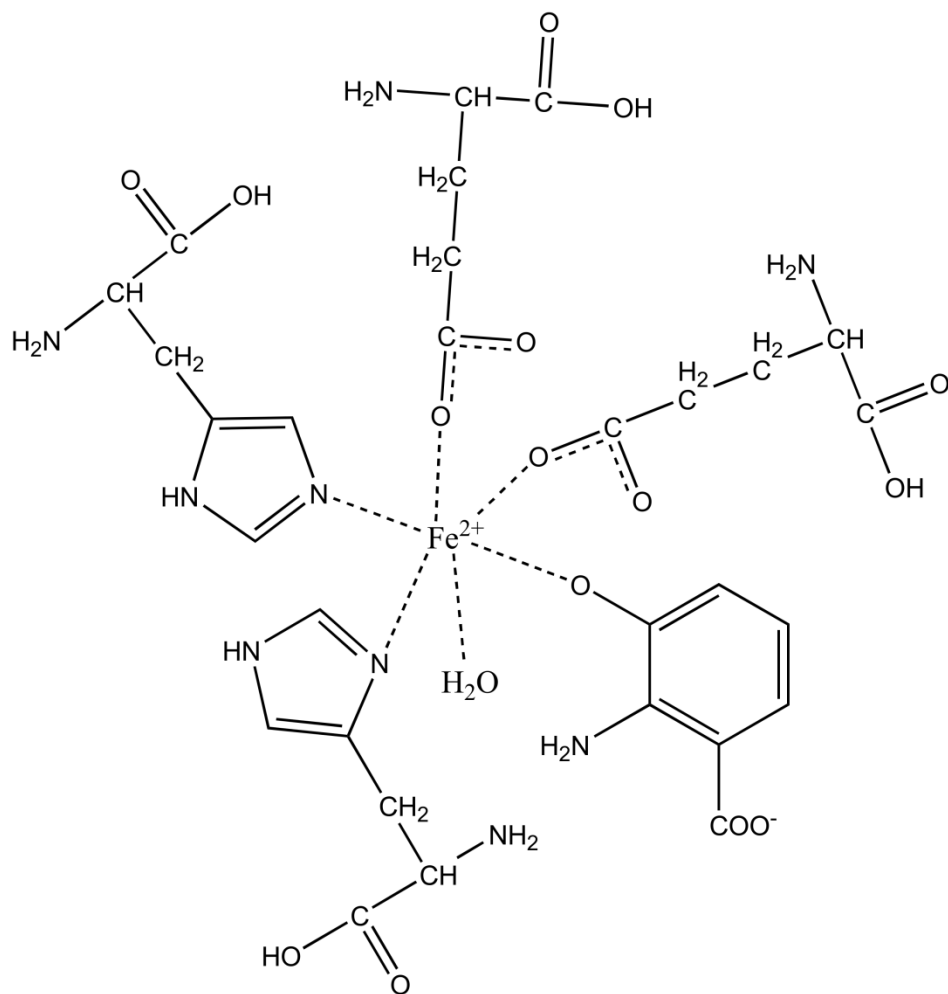
**Supplemental Table S4<sup>b</sup>.** a) Charge distribution derived from electrostatic potential using (single point calculations) HF functional and the 6-311G basis set. Designation of atoms is given in Figure 2b in the main text.

Atom designation	without oxygen bound	ESP Charges												
		I1	TS1	I2	TS2	I3	TS3	I4	TS4	I5	TS5	I6	TS6	I7
Fe	0,97	0,98	0,99	0,97	0,90	1,26	0,97	0,97	1,17	0,94	0,83	0,89	0,97	0,84
N3	-1,04	-1,26	-0,72	-0,64	-0,61	-0,84	-0,85	-1,01	-1,10	-0,96	-1,05	-1,09	-1,02	-0,71
C6	0,29	0,77	0,08	0,01	0,06	0,43	0,49	0,64	0,73	0,23	0,29	0,35	0,23	0,18
C1	0,38	-0,08	0,75	1,02	0,93	0,71	0,48	0,08	-0,08	0,64	0,89	0,93	0,87	0,81
O3	-0,71	-0,54	-0,83	-0,89	-0,87	-0,86	-0,70	-0,56	-0,45	-0,49	-0,59	-0,71	-0,60	-0,62
C2	-0,39	-0,08	-0,55	-0,58	-0,46	-0,17	-0,14	0,19	0,08	0,10	0,01	0,10	0,00	0,40
C3	-0,13	-0,33	-0,01	-0,03	-0,12	-0,26	-0,25	-0,35	-0,30	-0,38	-0,34	-0,40	-0,33	-0,35
C4	-0,28	-0,09	-0,30	-0,31	-0,23	0,01	-0,01	-0,05	-0,04	-0,01	-0,07	0,04	-0,10	-0,02
C5	-0,28	-0,48	-0,16	-0,20	-0,23	-0,32	-0,39	-0,50	-0,52	-0,32	-0,41	-0,47	-0,34	-0,29
C6	0,79	0,84	0,78	0,79	0,78	0,73	0,79	0,84	0,87	0,81	0,85	0,85	0,81	0,78
O9	-0,76	-0,77	-0,77	-0,77	-0,76	-0,75	-0,75	-0,78	-0,78	-0,78	-0,79	-0,78	-0,79	-0,76
O8	-0,89	-0,92	-0,88	-0,87	-0,87	-0,79	-0,86	-0,89	-0,88	-0,80	-0,90	-0,89	-0,90	-0,89
O2	-	-0,37	-0,37	-0,39	-0,46	-0,64	-0,64	-0,59	-0,60	-0,93	-0,85	-0,79	-0,89	-0,71
O1	-	-0,22	-0,33	-0,38	-0,43	-0,78	-0,64	-0,40	-0,28	-0,42	-0,44	-0,50	-0,43	-0,57

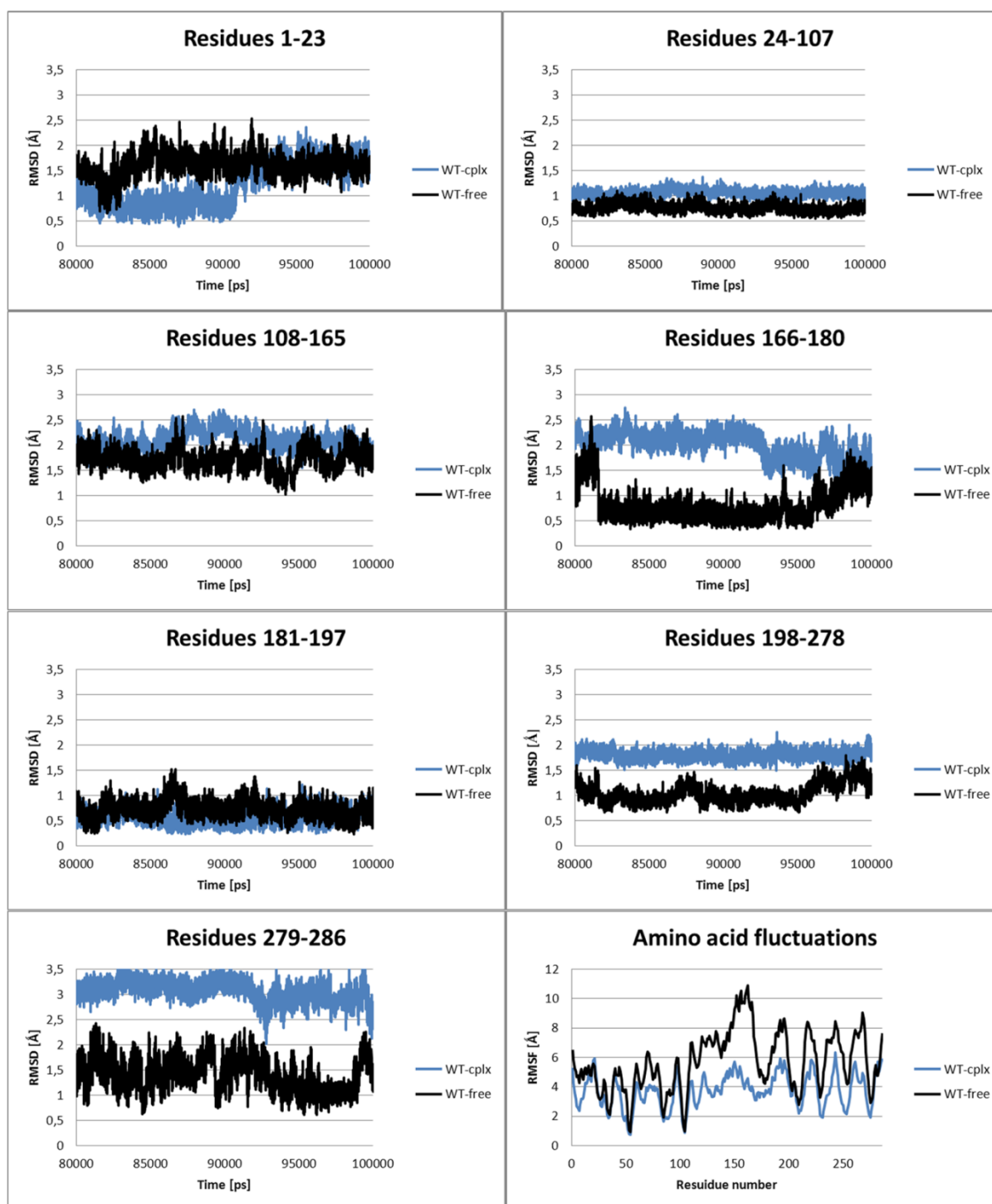
**b. Mulliken atomic spin densities**

Atom designation	without oxygen bound	Mulliken atomic spin densities												
		I1	TS1	I2	TS2	I3	TS3	I4	TS4	I5	TS5	I6	TS6	I7
Fe	3,82	3,03	2,95	2,83	2,92	3,42	3,35	3,32	3,62	4,14	2,81	3,19	4,14	3,80
N3	0,00	-0,02	0,13	0,16	0,10	0,04	0,01	0,01	-0,01	-0,23	0,12	0,10	-0,11	0,00
C6	0,01	-0,03	0,13	0,19	0,12	0,01	0,00	0,00	-0,02	-0,26	0,20	0,18	-0,19	0,00
C1	0,00	0,02	-0,03	-0,02	-0,01	0,02	0,00	0,00	0,02	-0,06	0,01	0,01	0,01	0,01
O3	0,04	-0,05	0,03	0,05	0,06	0,05	0,05	0,03	-0,01	-0,13	0,04	-0,10	-0,01	0,01
C2	0,01	-0,03	0,25	0,40	0,26	-0,01	-0,01	0,00	-0,02	-0,22	0,46	0,34	-0,46	0,00
C3	-0,01	0,02	-0,07	-0,14	-0,10	0,02	0,00	0,00	0,01	0,12	-0,21	-0,17	0,21	0,00
C4	0,01	-0,04	0,27	0,45	0,29	0,01	-0,01	0,00	-0,03	-0,36	0,52	0,42	-0,51	0,00
C5	0,00	0,02	-0,05	-0,08	-0,04	0,01	0,00	0,00	0,01	0,15	-0,10	-0,11	0,10	0,00
C6	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,01	-0,01	0,00
O9	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	-0,01	-0,01	0,01	0,00
O8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
O2	-	3,03	2,95	2,83	2,92	3,42	3,35	3,32	3,62	4,14	2,81	3,19	4,14	3,80
O1	-	-0,02	0,13	0,16	0,10	0,04	0,01	0,01	-0,01	-0,23	0,12	0,10	-0,11	0,00

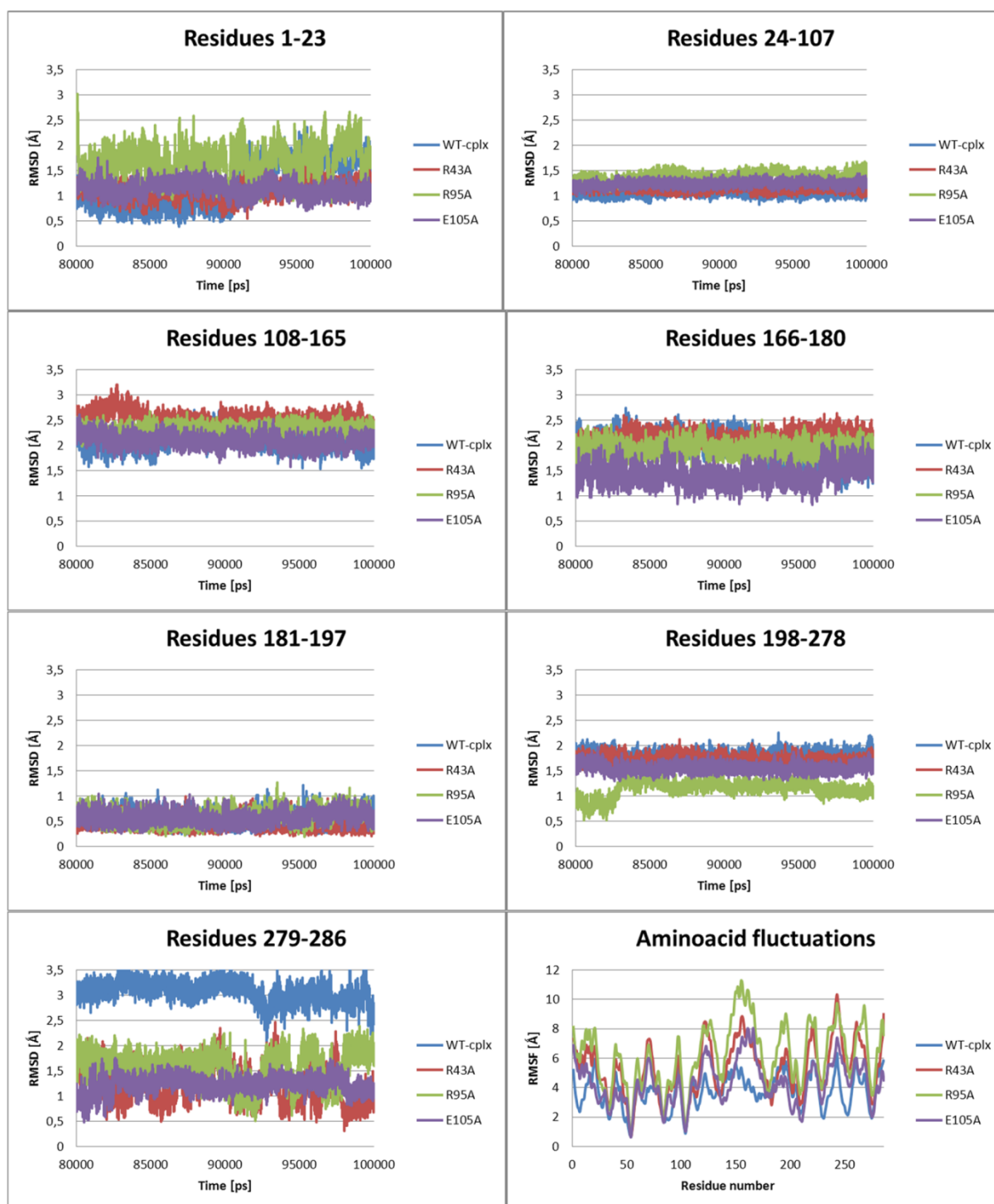
<sup>b</sup> The HF functional was chosen due to our experience with previous calculations<sup>15</sup>. Charges derived with this functional nicely correlated with the experimental data.



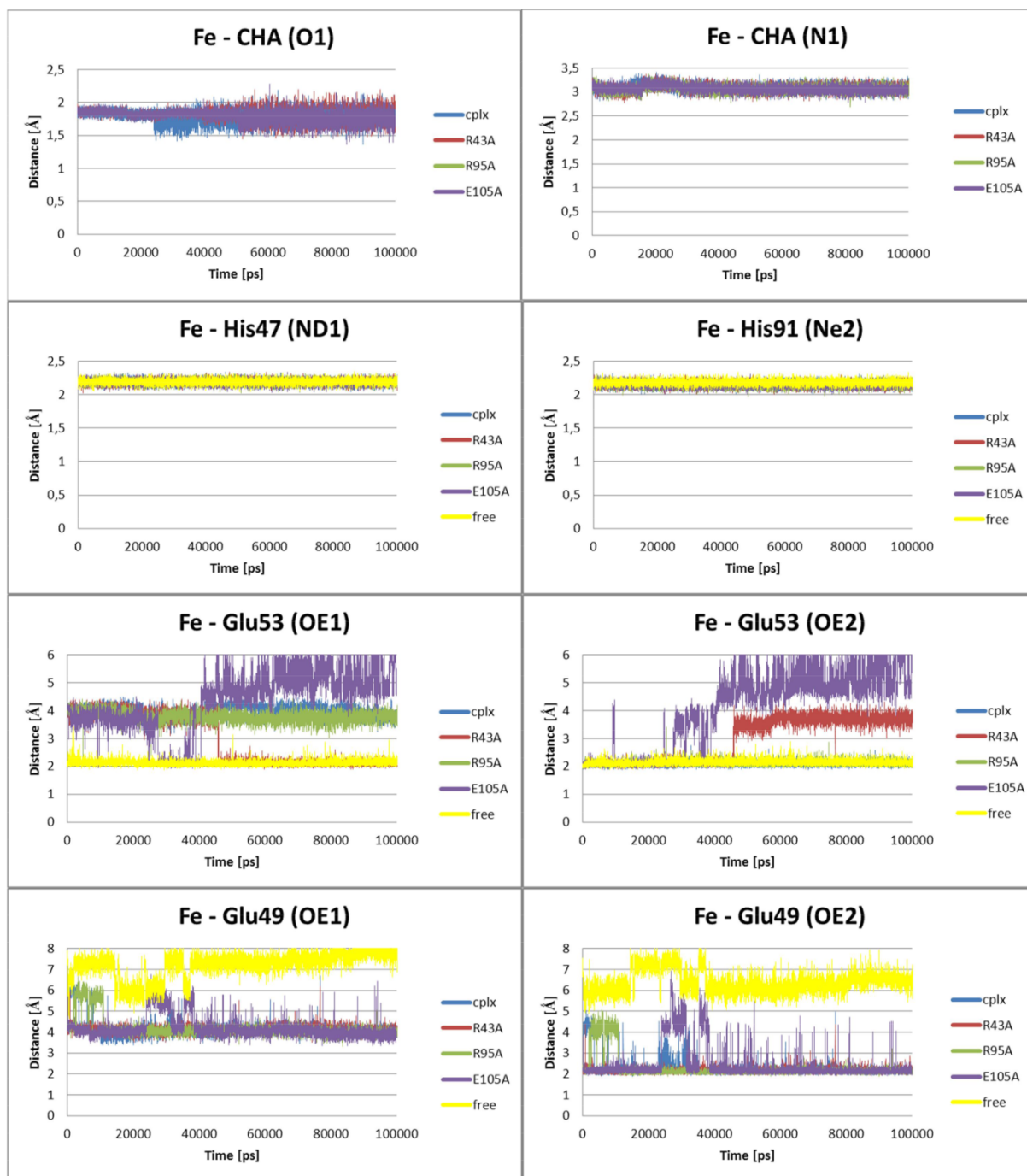
**Supplemental Figure S1.** Model system that was used to determine partial charges distribution on  $\text{Fe}^{2+}$  and 3-Ohaa



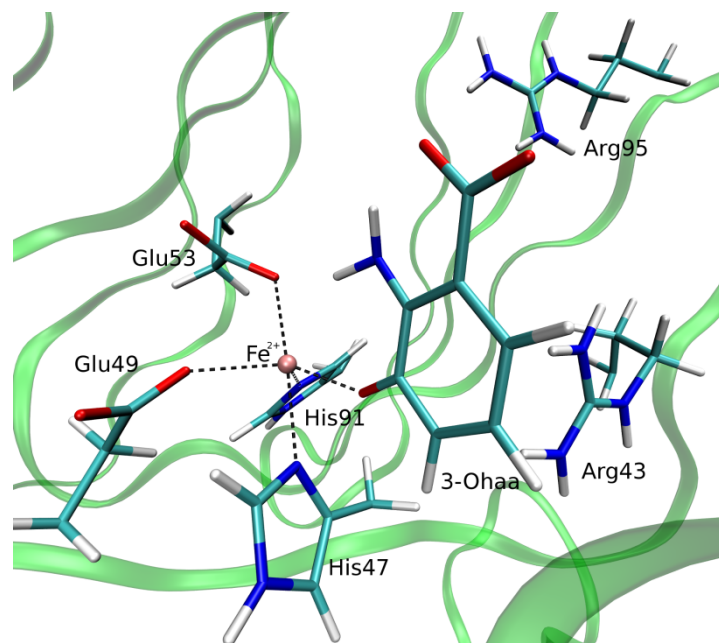
**Supplemental Figure S2.** The Root Mean Square Deviation (RMSd) values, for the each of the protein regions shown in Figure 2 during the last 20 ns of in total 100 ns long MD simulations. Displayed are WT system (black line) and its complex with 3-Ohaa (blue line). The Root Mean Square Fluctuations (RMSFs) per amino acid residues calculated for the last 20 ns of MD simulations are shown in the last (bottom, right) graph.



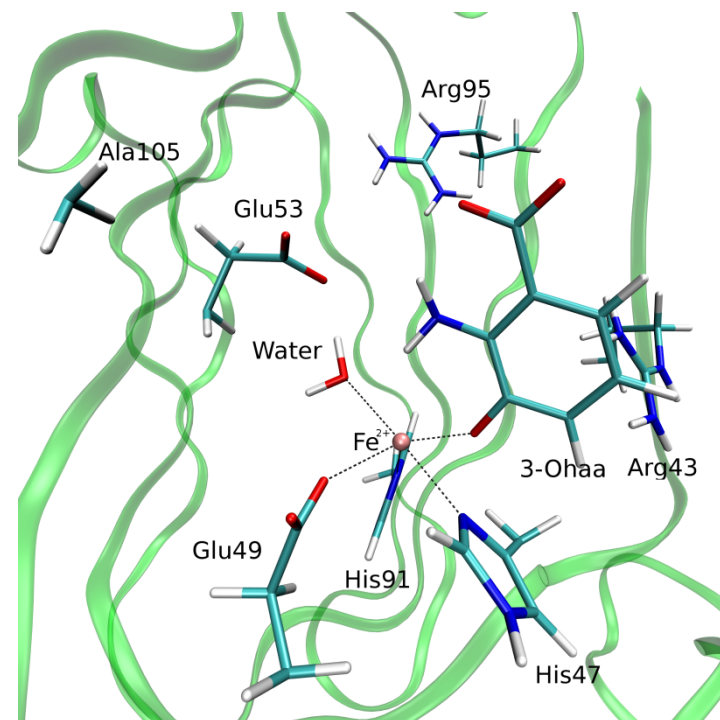
**Supplemental Figure S3.** The Root Mean Square Deviation (RMSd) values, for the each of the protein regions shown in Figure 2 during the last 20 ns of in total 100 ns long MD simulations of the 3HAO variant complexes with 3-Ohaa (WT – blue line; Arg43Ala – red line; Arg95Ala – green line; Glu105Ala – purple line). The Root Mean Square Fluctuations (RMSFs) per amino acid residues calculated for the last 20 ns of MD simulations are shown in the last (bottom, right) graph.



**Supplemental Figure S4.** The Fe<sup>2+</sup> coordination during 100 ns of the MD simulations of the 3HAO variants complexed with 3-Ohaa.

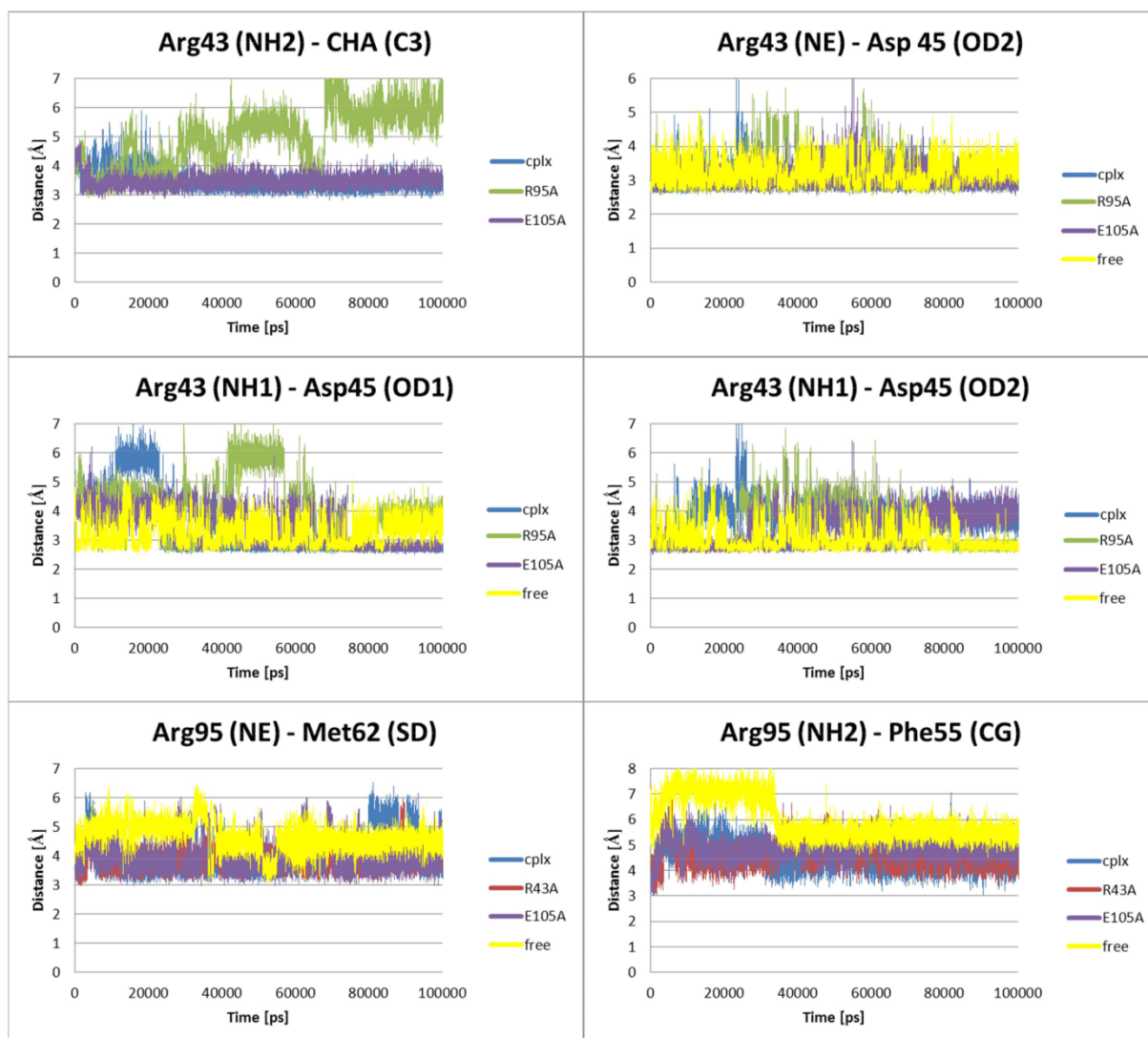


a



b

**Supplemental Figure S5.** Structure of the 3HAO active site after 60 ns of productive MD simulations followed by energy minimization. The black dashed lines connects the iron ion and the surrounding residues that coordinates it (distance less than 2.5 Å) are shown a) active site in the WT complex is shown, b) active site in the Glu105Ala mutant is shown



**Supplemental Figure S6.** The Arg43 and Arg95 interactions with the substrate (3-Ohaa) and the enzyme amino acid residues during 100 ns of MD simulations of the 3HAO variant complexes.