

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

**“Clonado, expresión, caracterización molecular y
físicoquímica de enzimas involucradas en la etapa de
desnitrificación del ciclo del nitrógeno”**

Julio Cesar Cristaldi

Director de Tesis: Dr. Carlos D. Brondino

Co-director de Tesis: Dra. María G. Rivas

Departamento de Física. FBCB-UNL

-2018-

- Agradecimientos -

Al Dr. Carlos Brondino por haberme permitido realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas bajo su dirección y brindarme la posibilidad de pertenecer al departamento de Física. A Gabi y Pablo, mis orientadores, por su paciencia, generosidad y buena onda. Gracias a los tres por su compromiso, apoyo constante y el gran aporte a mi formación científica.

Al Dr. Felix Ferroni por su colaboración y por permitirme darle continuidad a sus estudios con proteínas clonadas por él. Al Dr. Sergio Dalosto por su colaboración en la obtención de los modelos estructurales.

A mis compañeras becarias, a Ana y Cecilia que me acompañaron desde los comienzos compartiendo charlas, clases, discusiones científicas y no científicas y largas horas de trabajo. A Marilyn, Andrea, Axel y Felix por su aliento en este último tramo del camino. Todos hacen el día laboral más ameno con su compañía.

A todo el personal docente del departamento de Física por su colaboración en mi formación como docente y calidez humana.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme el lugar de trabajo y el equipamiento requerido y por permitirme ser parte del cuerpo docente del departamento de Física. A CONICET y AGENCIA por las becas recibidas que me permitieron realizar mi Doctorado. A las tres instituciones les agradezco por el financiamiento aportado.

A mi familia por estar siempre a mi lado con su comprensión y apoyo incondicional. A mis hermanos por su hermosa hermandad y aceptación. A la Tía por acompañarme en el día a día compartiendo logros y dificultades. A mi abuela, por cuidarme y darme fuerza desde donde esté.

A mis amigos de la vida que me acompañaron festejando los logros y supieron comprender ausencias.

- *Publicaciones* -

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados en:

- FM Ferroni, J Marangon, NI Neuman, **JC Cristaldi**, SM Brambilla, SA Guerrero, MG Rivas, AC Rizzi, CD Brondino (2014) Pseudoazurin from *Sinorhizobium meliloti* as an electron donor to copper-containing nitrite reductase: Influence of the redox partner on the reduction potentials of the enzyme copper centers. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19(6): 913–921.
- **JC Cristaldi**, MC Gómez, PJ González, FM Ferroni, SD Dalosto, AC Rizzi, MG Rivas, CD Brondino (2017) Study of the Cys-His bridge electron transfer pathway in a copper-containing nitrite reductase by site-directed mutagenesis, spectroscopic, and computational methods. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862: 752–760.

- Índice de contenidos -

- SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS -	I
-RESUMEN -	III
-ABSTRACT	VI
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1- CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO	2
I.1.1- Reacciones y enzimas involucradas en la desnitrificación.....	3
I.2- NITRITO REDUCTASAS DE COBRE	5
I.2.1- Detalles estructurales relevantes.....	6
I.2.2- Espectroscopía de absorción UV-vis y EPR	10
I.2.3- Dadores electrónicos fisiológicos.....	13
I.3- MECANISMO CATALÍTICO DE LAS NIRK	14
I.3.1- Interacción enzima/dador electrónico y transferencia electrónica interproteína	14
I.3.2- Transferencia electrónica intraproteína	15
I.3.3- Reducción del sustrato y dependencia de la actividad catalítica con el pH.....	16
II- OBJETIVOS	19
II.1- OBJETIVO GENERAL.....	20
II.1.1- Objetivos específicos	20
III- MATERIALES Y MÉTODOS	21
III.1- CLONADO MOLECULAR DE <i>Bj</i> NIRK Y <i>Bj</i> CITC ₅₅₀	22
III.2- MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS VARIANTES DE <i>Sm</i> NIRK	24
III.3- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	25
III.3.1- Crecimiento de células <i>E. coli</i> y expresión de proteínas	25
III.3.2- Obtención del extracto soluble	26
III.3.3- Purificación de proteínas	26
III.3.3.1- Purificación de <i>Sm</i> NirK y sus variantes	27
III.3.3.2- Purificación de <i>Sm</i> Paz	27
III.3.3.3- Purificación de <i>Bj</i> NirK	28
III.3.3.4- Purificación de <i>Bj</i> CitC ₅₅₀	28
III.4- MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	28
III.4.1- Espectroscopía de absorción UV-vis	28
III.4.2- Espectroscopía de EPR	28
III.4.2.1- Simulación de espectros de EPR	29
III.4.2.2- Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por EPR....	29
III.5- MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	29
III.6- MÉTODOS CINÉTICOS. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	30
III.6.1- Modelo linealizado de Michaelis-Menten: gráficos de Hanes-Woolf	30
III.6.2- Método continuo	31
III.6.3- Método discontinuo	32
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
IV.1- CARACTERIZACIÓN DE <i>Sm</i> NIRK Y <i>Bj</i> NIRK	34

IV.1.1- Características moleculares	34
IV.1.2- Caracterización espectroscópica.....	34
IV.1.2.1- Espectroscopía de absorción UV-vis	34
IV.1.2.2- Espectroscopía de EPR.....	35
IV.1.2.3- Influencia del pH en los espectros de absorción UV-vis y de EPR.....	36
IV.1.2.4- Caracterización redox de los cofactores	36
IV.1.2.5- Reacción con sustrato monitoreada por EPR	38
IV.2- CARACTERIZACIÓN DE LOS DADORES ELECTRÓNICOS FISIOLÓGICOS DE <i>SmNirK</i> Y <i>BjNirK</i>	41
IV.2.1- Caracterización molecular de <i>SmPaz</i>	41
IV.2.2- Espectroscopía de absorción UV-vis y EPR de <i>SmPaz</i>	41
IV.2.3- Caracterización molecular de <i>BjCitc₅₅₀</i>	43
IV.2.4- Espectroscopía de absorción UV-vis de <i>BjCitc₅₅₀</i>	43
IV.2.5- Caracterización electroquímica de <i>SmPaz</i> y <i>BjCitc₅₅₀</i>	44
IV.3- CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE <i>SmNirK</i> Y <i>BjNirK</i> CON LOS DADORES ELECTRÓNICOS	47
IV.3.1- Ensayos electroquímicos	47
IV.3.1.1- Transferencia electrónica de <i>SmPaz</i> → <i>SmNirK</i>	47
IV.3.1.2- Transferencia electrónica de <i>BjCitc₅₅₀</i> → <i>BjNirK</i>	50
IV.3.2- Caracterización cinética.....	51
IV.4- ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA INTERPROTEÍNA MONITOREADA POR EPR.....	55
IV.4.1- Modulación de los potenciales de reducción de los cofactores de <i>SmNirK</i>	55
IV.5- ROL DE LOS AMINOÁCIDOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA INTRAPROTEÍNA	58
IV.5.1- Mutagénesis sitio dirigida de <i>SmNirK</i>	58
IV.5.2- Expresión y purificación de las variantes	59
IV.5.3- Caracterización molecular	59
IV.5.4- Caracterización espectroscópica de las variantes de <i>SmNirK</i>	59
IV.5.4.1- Espectroscopía de absorción UV-vis	59
IV.5.4.2- Espectroscopía de EPR.....	60
IV.5.4.3- Caracterización redox de los cofactores de las variantes de <i>SmNirK</i>	63
IV.5.4.4- Reacción con sustrato de las variantes de <i>SmNirK</i> monitoreada por EPR	65
IV.5.5- Ensayos cinéticos.....	67
IV.5.6- Modelos estructurales obtenidos por métodos computacionales.....	69
IV.5.6.1- Modelos estructurales obtenidos para <i>SmNirK</i> y sus variantes	69
IV.5.6.2- Modelo estructural obtenido para <i>BjNirK</i>	74
IV.6- ESTUDIOS DE LA DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA CON EL PH	75
IV.6.1- Caracterización espectroscópica de <i>SmNirK</i> y <i>BjNirK</i> a pH 10.....	75
IV.6.2- Dependencia de la transferencia electrónica intraproteína con el pH.....	77
V- CONCLUSIONES	81
VI- ANEXOS	87
ANEXO I.	88
VI.1.1- Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	88
VI.1.2- Medios de cultivo, inductores y antibióticos usados para el crecimiento de <i>E. coli</i>	88
VI.1.3- Obtención de células competentes y transformación	89
VI.1.4- Extracción de ADN plasmídico.....	90
VI.1.5- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	90

VI.1.6- Secuenciación de ADN.....	90
VI.1.7- Metodologías utilizadas para el análisis de proteínas.....	90
VI.1.7.1- Determinación de la concentración de proteínas.....	90
VI.1.7.2- Determinación de la masa molecular aparente.....	90
VI.1.7.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	91
VI.1.7.4- Determinación del contenido de cobre	91
VI.1.7.5- Acondicionamiento de proteínas por ultrafiltración.....	91
VI.2- ANEXO II.....	92
VI.2.1- Espectroscopía EPR.....	92
VI.2.2- Interacción hiperfina.....	94
VI.2.3- Anisotropía del factor g y de la constante de acoplamiento hiperfino A.....	95
VI.2.4- Espectrómetro y mediciones.....	97
VI.3- ANEXO III	99
VI.3.1- Fundamentos de la electroquímica	99
VI.3.2- Mecanismos de transferencia de masa.....	101
VI.3.3- Celda electroquímica	102
VI.3.4- Adsorción de proteínas a la superficie del electrodo.....	102
VI.3.5- Técnicas electroquímicas.....	103
VI.3.5.1- Voltametría cíclica.....	103
VI.3.5.2- Cronoamperometría	105
VII- BIBLIOGRAFÍA.....	108

- *Símbolos y abreviaturas* -

ϵ : coeficiente de absortividad molar

λ : longitud de onda

λ_{\max} : longitud de onda de máxima absorción

v : velocidad de barrido del potencial eléctrico

$N_{\delta 1}H...O=C$: puente de hidrógeno establecido entre el O del carbonilo de la Cis y el $N_{\delta 1}$ del imidazol de la His del puente Cis-His de las NirK.

[S]: concentración de sustrato

T1Cu: centro de cobre Tipo 1

T2Cu: centro de cobre Tipo 2

T2Cu_I: componente espectroscópica I del T2Cu

T2Cu_{II}: componente espectroscópica II del T2Cu

A: constante de acoplamiento hiperfino

Asp_{CAT}: Aspártico catalítico

Citc: Citocromos *c*

BjCitc550: citocromo c 550 aislado de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

C172D: variante obtenida al modificar el residuo C172 por ácido aspártico (D) en *SmNirK*

E: potencial de reducción

E^0 : potencial formal de reducción

E^0_{T1Cu} : potencial formal de reducción del T1Cu

E^0_{T2Cu} : potencial formal de reducción del T2Cu

EPR: del acrónimo en inglés Electron Paramagnetic Resonance, Resonancia Paramagnética Electrónica

g: Factor g

His_{CAT}: Histidina catalítica

H171D: variante obtenida al modificar el residuo H171 por ácido aspártico (D) en *SmNirK*

I: spin nuclear

i : corriente eléctrica Faradaica

i_{cat} : corriente eléctrica faradaica catalítica

i_p : corriente eléctrica faradaica del pico catódico o anódico

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_M^{app} : constante de Michaelis-Menten aparente

MV: Metil Viológeno

NHE: del acrónimo en inglés Normal Hydrogen Electrode, Electrodo Normal de Hidrógeno

Nir: Nitrito reductasa

NirK: Nitrito reductasa de cobre

SmNirK: NirK aislada de *Sinorhizobium meliloti* 2011

BjNirK: NirK aislada de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

Ac: *Achromobacter cycloclastes* IAM1013

Af: *Alcaligenes faecalis* S-6

Axg: *Alcaligenes xylooxidans* GIFU1051

Axn: *Alcaligenes xylooxidans* NCIMB 11015

Pc: *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135

Rs: *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3

Paz: Pseudoazurina

SmPaz: Paz aislada de *Sinorhizobium meliloti* 2011

PBS: tampón fosfato salino

TC: Transferencia de carga

TE: Transferencia electrónica

UV-vis: ultravioleta-visible

v: velocidad de consumo de sustrato

V_M : velocidad máxima de consumo de sustrato

-Resumen -

En este trabajo se estudiaron distintos aspectos a nivel molecular del mecanismo catalítico de la nitrito reductasa de cobre (NirK), una enzima que cataliza la reducción de nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) en la desnitrificación. Estas enzimas se clasifican de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas en verdes y azules. El trabajo se desarrolló a partir del estudio de dos NirK producidas de manera recombinante, una verde obtenida del microorganismo *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*SmNirK*), y otra azul obtenida de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (*BjNirK*). Los dos microorganismos son bacterias desnitrificantes de importancia económica para la región por su uso en la formulación de bioinoculantes. Ambas NirK presentan una estructura homotrimérica con dos sitios de cobre por monómero denominados T1Cu y T2Cu, en línea con la mayoría de las NirK caracterizadas. El centro T1Cu, el cual le confiere el color característico a la enzima, es un centro de transferencia electrónica (TE). El T2Cu es el sitio activo en donde ocurre la unión y reducción del sustrato. En la Figura 1 se muestra la estructura de los dos sitios de cobre con las dos vías estructurales que los conectan, junto con un esquema de los procesos más relevantes que forman parte del mecanismo catalítico. Es importante notar que la estructura mostrada en la figura se conserva en las dos NirK producidas, lo cual fue confirmado por estudios moleculares y espectroscópicos y también por cálculos estructurales del tipo QM/MM. Las NirK requieren de un dador electrónico fisiológico para llevar a cabo la catálisis, los cuales también fueron producidos de manera recombinante y caracterizados. El dador electrónico fisiológico de la *SmNirK* es una proteína de cobre mononuclear perteneciente a la familia de las cupredoxinas denominada pseudoazurina (*SmPaz*), mientras que para *BjNirK* es un citocromo *c* (*BjCitc₅₅₀*). La caracterización molecular, electroquímica y espectroscópica de la *SmNirK* y la *BjNirK* y los respectivos dadores electrónicos fisiológicos, junto con la caracterización de la cinética de reducción del sustrato de los pares NirK/dadores constituyen dos de los objetivos planteados en esta tesis.

El mecanismo catalítico de las NirK puede ser dividido en líneas generales en tres procesos que son mostrados en la Figura 1. El primer proceso de TE resulta de la interacción de la NirK con el dador electrónico fisiológico. Esto implica la transferencia de un electrón desde el dador electrónico reducido al T1Cu de la NirK (TE interproteína). El segundo proceso de TE ocurre desde el T1Cu reducido al sitio activo T2Cu (TE intraproteína), lo que permite la reducción del sustrato (NO_2^-) unido al sitio y liberación del producto (NO) (tercer proceso). El proceso de TE intraproteína ocurre a través del puente estructural Cis-His que conecta los dos sitios de Cu en las NirK, proceso que hipotéticamente estaría regulado por la vía denominada *sensing loop*. Las NirK presentan actividad máxima a pH entre 5 y 6, y son inactivas a pH > 8. Residuos pertenecientes a la segunda esfera de coordinación del sitio activo, uno de ellos mostrado en la figura (*Asp_{CAT}*), han sido identificados como los responsables de la dependencia con el pH de la actividad catalítica de estas enzimas. Si bien el

puente Cis-His es indudablemente el camino por el que ocurre la TE intraproteína, el hecho que la estructura electrónica de los T1Cu verdes y azules sea diferente, llevó a pensar que probablemente los procesos de TE entre estos centros sea distinto en los dos tipos de enzimas. Como se observa en la Figura 1 coexisten dos vías estructurales en el puente Cis-His que potencialmente pueden actuar como camino de TE T1Cu→T2Cu. Una de estas vías involucra el camino covalente Cis-His, mientras que la segunda vía involucraría un camino mixto formado por enlaces covalentes y el puente de hidrógeno establecido entre el O del carbonilo de la Cis y el N_{δ1} del imidazol de la His (N_{δ1}H...O=C, en la Figura 1). Sobre la base de estudios computacionales se ha propuesto que las NirK azules utilizarían la primer vía mientras que las verdes utilizarían la segunda vía, aspecto que es analizado en este trabajo.

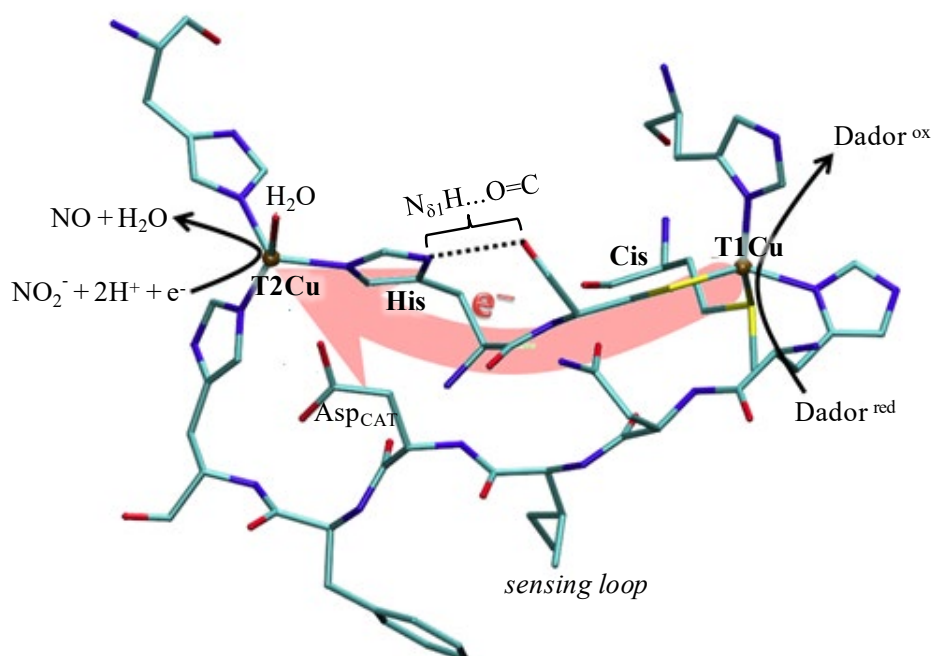


Figura 1. Estructura de los dos sitios de Cu de las NirK y las vías estructurales que los conectan. Se representan los procesos de TE que forman parte del mecanismo catalítico de estas enzimas.

La determinación de los potenciales formales de reducción ($E^{0'}$) de los centros de cobre de la forma *as-purified* de *SmNirK* mediante titulaciones potenciométricas permitió concluir que, en línea con la mayoría de las NirK, $E^{0'}_{T1Cu} > E^{0'}_{T2Cu}$. Estos valores definen un proceso de TE T1Cu→T2Cu termodinámicamente desfavorable en la enzima. Dado que la reacción enzimática ocurre independientemente de esto, se ha propuesto que la unión del sustrato al T2Cu modularía el potencial de reducción de este sitio de manera tal de invertir sus valores relativos ($E^{0'}_{T2Cu} > E^{0'}_{T1Cu}$) haciendo favorable el proceso de TE. Esta modulación en *SmNirK* fue estudiada mediante ensayos de EPR y los resultados sugieren que la modulación de los potenciales redox es una consecuencia de la interacción *SmPaz/SmNirK* en presencia de sustrato.

El proceso de TE intraproteína en esta enzima también fue estudiado cambiando los aminoácidos del puente Cis-His mediante mutagénesis sitio dirigida. Ambos residuos fueron mutados por ácido aspártico (D) obteniéndose las variantes H171D y C172D (numeración de *SmNirK*). La

elección del ácido aspártico se debió a su potencial capacidad de coordinar el cobre, lo que permitiría obtener proteínas con los dos sitios conectados por un puente estructural modificado. La variante H171D fue producida como una proteína con 2 átomos de cobre por monómero y características espectroscópicas de UV-vis y EPR correspondientes a los dos centros metálicos. Para C172D se obtuvieron valores en el rango 0.7 – 1.3 Cu/monómero con características espectroscópicas de EPR asociadas a dos sitios de cobre del tipo normal, también llamado cobre tipo 2. Ambas variantes resultaron inactivas frente a dadores electrónicos artificiales y *SmPaz*. Modelos estructurales de ambas variantes obtenidos mediante estudios computacionales del tipo QM/MM, junto con los resultados experimentales, sugirieron que la falta de actividad catalítica frente a *SmPaz* en H171D sería debida a una interrupción de la TE intraproteína, posiblemente por la ausencia del puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$.

Los resultados obtenidos para las variantes de *SmNirK* derivaron en el estudio de la relevancia de la estructura $N_{\delta 1}H...O=C$ en la TE intraproteína de las NirK verdes y azules y en la dependencia de la actividad catalítica de las NirK con el pH del medio. Esto fue realizado mediante estudios dependientes del pH en las dos NirK en los cuales se monitorearon los estados de oxidación de los dos centros mediante espectroscopía UV-vis y EPR luego de varios ciclos redox de la enzima en condiciones catalíticas. Los resultados más importantes de estos estudios mostraron que a pH 10 el T2Cu mantiene la capacidad de unir y reducir el sustrato aunque a una tasa no detectable por los ensayos cinéticos utilizados. Esto se atribuye a que el alto pH produce el desacople entre el proceso de TE intraproteína y del proceso de unión nitrito-T2Cu, lo cual se originaría por la ruptura del puente $N_{\delta 1}H...O=C$. Otro de los resultados relevantes es que en las dos NirK, el puente $N_{\delta 1}H...O=C$ se comportaría como el único camino de TE, lo que implicaría que la estructura electrónica del T1Cu no determina el camino de TE.

Los logros obtenidos en este trabajo no son solo sobre el conocimiento de estas enzimas, sino también experimentales, ya que implicó desarrollar distintas metodologías que fortalecieron las capacidades del grupo en el estudio y caracterización de metaloproteínas redox en general. Todo este trabajo abrió además nuevas perspectivas de trabajo en relación al proceso de interacción proteína/dador electrónico fisiológico que están siendo profundizadas actualmente.

-Abstract -

In this work we studied different aspects at molecular level of the catalytic mechanism of copper-containing nitrite reductase enzymes (NirK), which catalyzes the reduction of nitrite (NO_2^-) to nitric oxide (NO) in the denitrification process. These enzymes are classified according to their spectroscopic properties in green and blue. The work was developed from the study of two recombinant NirKs, a green one obtained from the microorganism *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*SmNirK*) and a blue one obtained from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (*BjNirK*). These two denitrifying bacteria are of economic importance for the region because of their use in the formulation of biofertilizers. Both NirK present homotrimeric structure with two copper centers per monomer called T1Cu and T2Cu, in line with most NirKs. The T1Cu center, which gives the characteristic color to the enzyme, is a copper electron transfer (ET) center. T2Cu is the active site where occurs the binding and reduction of the substrate. The Figure 1 shows the structure of the two copper sites with the two structural pathways connecting them, along with a scheme of the most relevant processes of the catalytic mechanism. This structure is present in the two NirK produced, which was confirmed by molecular and spectroscopic studies and by QM/MM computational calculations. NirKs need physiological electron donors to carry out catalysis, which also were produced and characterized. The physiological electron donors of *SmNirK* and *BjNirK* are a mononuclear copper protein called pseudoazurin (Paz) belonging to the cupredoxin family of proteins, and a cytochrome *c* (*BjCitc*₅₅₀), respectively. Two of the objectives of this work were to characterize the molecular, electrochemical and spectroscopic properties of *SmNirK* and *BjNirK* and their respective physiological electron donors, along with the characterization of the substrate reduction kinetics in both enzymes.

The catalytic mechanism of NirK can coarsely be divided in three processes shown in the Figure. The first ET process results from the interaction of NirK with the physiological electron donor. This involves the transfer of an electron from the physiological electron donor to T1Cu of NirK (interprotein ET). The second ET process occurs from the reduced T1Cu to the active site T2Cu (intraprotein ET), which leads to the reduction of the substrate (NO_2^-) coordinated at the active site and product release (NO) (third process). The intraprotein ET process occurs through the Cys-His bridge that connects the two NirK copper centers. The pathway called *sensing loop* would regulate this process. NirKs show maximal activity around pH 5–6 and almost undetectable activity at pH > 8. Residues belonging to the second sphere of coordination of the active center (*e.g.* Asp_{CAT}, see figure) were identified to be the responsible ones for the dependence with pH of the catalytic activity. Although the Cys-His bridge is undoubtedly the pathway by which the intraprotein ET occurs, differences in the electronic structure of the green and blue T1Cu led one to think about differences in the process the ET in the two of enzymes. As shown in the figure, there are two potential electron

transfer subpathways in the Cys-His bridge. One of these pathways is the covalent pathway of the Cys-His bridge, while the second one involves a mixed pathway formed by covalent bonds and the hydrogen bond involving the Cys O-carbonyl atoms and the N_{δ1} of the imidazole of His (N_{δ1}H...O=C, in the figure). On the basis of computational studies, it has been proposed that the blue NirKs would use the covalent pathway, while the green ones would use the mixed pathway, an aspect which is analyzed in this work.

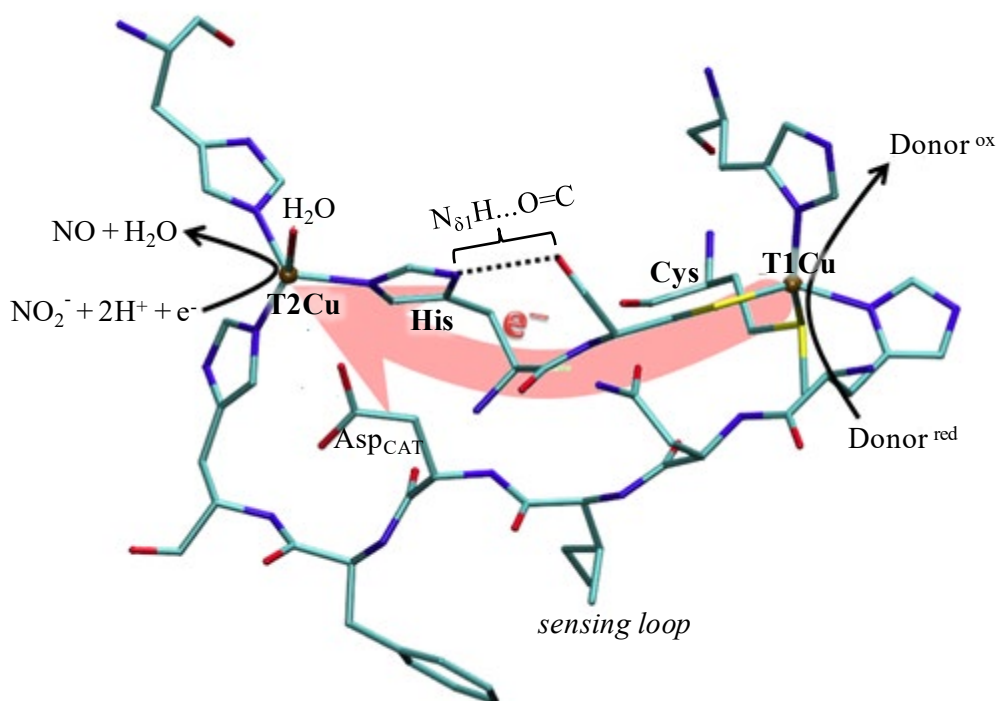


Figure 1. Structure of the two Cu sites of NirK and of two structural pathways connecting them. The ET processes that are part of the catalytic mechanism of these enzymes are represented also shown.

The determination of formal reduction potentials (E^0) of the copper centers of as-purified *Sm*NirK by potentiometric titrations allowed us to conclude that, like most of NirK enzymes, $E^0_{T1Cu} > E^0_{T2Cu}$. These values define a ET process $T1Cu \rightarrow T2Cu$ thermodynamically unfavorable. Therefore, it has been proposed that the binding of substrate to T2Cu would modulate the reduction potentials changing its order, *i.e.* $E^0_{T2Cu} > E^0_{T1Cu}$, to favor internal electron transfer. This modulation in *Sm*NirK was studied by EPR and our results suggest that the modulation of redox potentials is a consequence of *Sm*NirK/*Sm*Paz interaction in the presence of substrate.

The process of intraprotein ET in this enzyme was also studied by changing the amino acids of the Cys-His bridge by means of site directed mutagenesis. Both residues were changed to aspartic acid (D) to produce the variants H171D and C172D. We chose aspartic acid because of its potential ability to coordinate copper which would allow to obtain protein variants with the two centers connected by a modified structural bridge. H171D showed 2 copper atoms per monomer and UV-vis and EPR properties corresponding to two independent T1Cu and T2Cu centers. C172D showed metal

contents ranging from 0.7 to 1.3 Cu/monomer with spectroscopic characteristics of EPR associated with two copper centers of the normal type, also called copper type 2. Both variants were inactive against artificial electron donors and *SmPaz*. Structural models of both variants obtained by QM/MM computational studies, together with experimental results, suggest that the lack of catalytic activity of H171D with *SmPaz* would be as a consequence of an intraprotein ET disruption, likely at the level of the hydrogen bond $N_{\delta 1}H...O=C$.

Our results obtained for both *SmNirK* variants led us analyze the relevance of the $N_{\delta 1}H...O=C$ in the intraprotein ET of green and blue NirKs and its potential influence in the catalytic activity with pH. This was performed by pH dependent studies in which the oxidation states of the two copper centers were monitored by UV-vis and EPR spectroscopy after several redox cycles of the enzymes under catalytic conditions. The T2Cu centers of both enzymes at pH 10 maintain the ability to bind and to reduce substrate, although at a rate not detectable by the kinetic assays used in this study. This observation is attributed to the fact that the high pH produces the decoupling between the intraprotein ET process and the substrate binding to T2Cu, which would be caused by the breaking of the $N_{\delta 1}H...O=C$. Another conclusion is that the $N_{\delta 1}H...O=C$ bridge acts as the only ET pathway in both NirK, which would imply that the intraprotein ET process is not determined by the electronic structure of T1Cu.

Besides achievements on the knowledge of these enzymes, new experimental methodologies introduced along the work strengthened the group's capabilities regarding the study and characterization of metalloproteins. Furthermore, this study opened new research perspectives on protein/physiological electron donor interactions that are ongoing.

I- *Introducción*

I.1- Ciclo biogeoquímico del nitrógeno

El nitrógeno forma parte de muchos de los componentes esenciales para la vida, como aminoácidos y ADN. En la atmósfera terrestre se lo encuentra principalmente como nitrógeno molecular (N_2), constituyendo aproximadamente un 78% de la misma. La gran energía del triple enlace que constituye el N_2 la convierte en una molécula inerte para la vida. Ciertos microorganismos son los responsables de extraer el nitrógeno de la atmósfera y transformarlo en “nitrógeno reactivo”, es decir, compuestos nitrogenados que soportan o son productos del crecimiento y metabolismo celular [1]. La utilización de estos compuestos por organismos tanto procariotas como eucariotas establece un intercambio continuo del nitrógeno reactivo con el nitrógeno inerte de la atmósfera, resultando en un flujo cíclico de nitrógeno denominado *ciclo biogeoquímico del nitrógeno* (Figura 2).

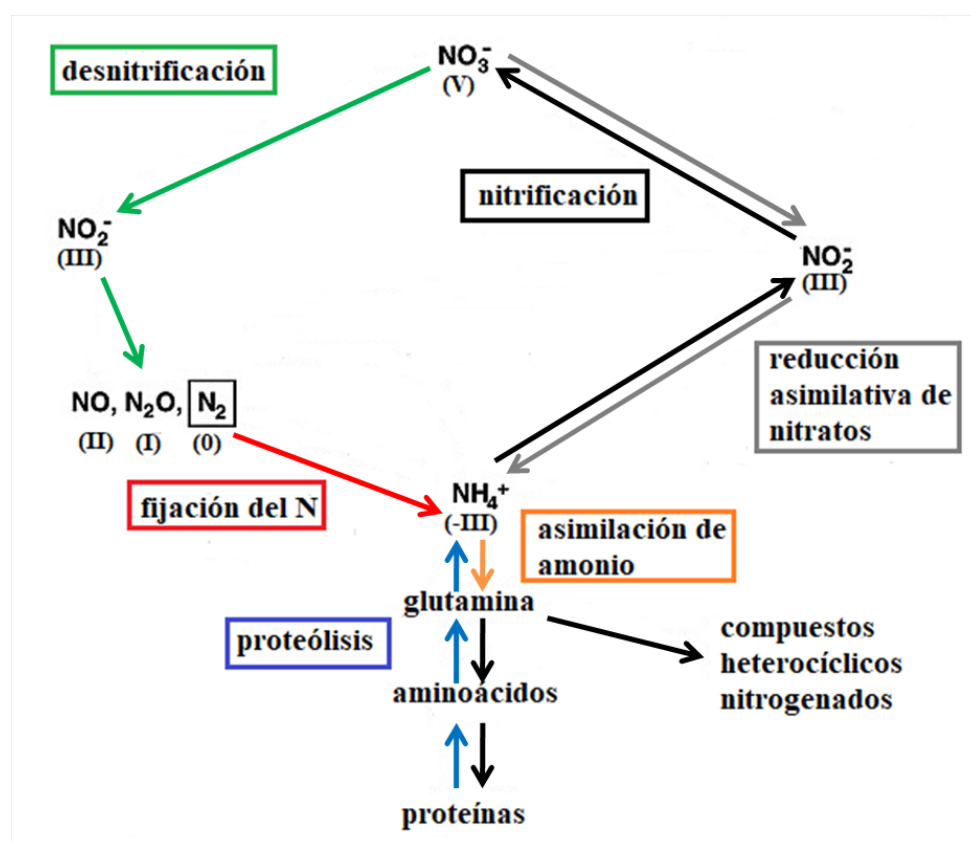


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Los estados de oxidación del N en cada uno de los compuestos intermediarios se indican entre paréntesis. Figura modificada de Bothe y col. [2].

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno está constituido por procesos redox en los que el nitrógeno atmosférico y el nitrógeno reactivo son transformados a diferentes compuestos intermediarios con estados de oxidación que varían entre +V a -III (Figura 2). Estos procesos pueden ser agrupados en *asimilativos* y *no asimilativos*. En los procesos *asimilativos* el nitrógeno es transformado e incorporado a la biomasa, mientras que en los procesos *no asimilativos* el nitrógeno es procesado mediante reacciones que están acopladas a la producción de energía.

Los procesos asimilativos incluyen la *fijación del nitrógeno* (Figura 2, rojo) y *reducción asimilativa de nitratos* (Figura 2, gris), ambas vías producen amonio (NH_4^+) el cual es incorporado a la biomasa [3]. La fijación del nitrógeno es llevada a cabo por organismos procariotas de vida libre y por los que viven en relación simbiótica con plantas, mientras que la reducción asimilativa de nitratos es llevada a cabo tanto por organismos procariotas como eucariotas. El NH_4^+ producido en estos procesos generalmente es utilizado para la síntesis de glutamina, proceso denominado *asimilación de amonio* (Figura 2, naranja), que es el precursor de otros aminoácidos y de compuestos nitrogenados heterocíclicos [2].

Mediante la *nitrificación* y la *desnitrificación*, dos procesos no asimilativos, los microorganismos logran reciclar el NH_4^+ a N_2 . En la *nitrificación* (Figura 2, negro) el NH_4^+ se oxida a NO_3^- , en este proceso el NO_2^- es un intermediario. En la *desnitrificación* (Figura 2, verde) el NO_3^- se transforma a N_2 a través de distintas reacciones sucesivas de reducción, donde el NO_2^- es también un intermediario. Ambos procesos son eficientes energéticamente dado que están acoplados a la producción de ATP [4].

Otros procesos como la *amonificación*, *annamox* y *proteólisis* también forman parte del ciclo del nitrógeno. En la *amonificación* el nitrógeno orgánico es convertido en NH_4^+ como parte del proceso de descomposición de la materia orgánica por acción de microorganismos descomponedores [5]. Otras vías metabólicas agrupadas como *anammox* son utilizadas por microorganismos para oxidar el NH_4^+ y NO_2^- y formar N_2 utilizando como intermediario NO, hidracina o hidroxiaminas [1]. La *proteólisis* (Figura 2, azul) es el proceso a través del cual los organismos degradan proteínas y otros compuestos nitrogenados para abastecer sus requerimientos de nitrógeno y energía [2].

En resumen, el pool de nitrógeno reactivo en la biósfera resulta del balance entre el proceso de fijación del nitrógeno y los procesos no asimilativos que reciclan el nitrógeno devolviéndolo a la biósfera. Todas las reacciones redox que ello implica son catalizadas por complejos enzimáticos que utilizan metales como cofactores, los cuales incluyen Cu, Fe y Mo [6]. El estudio de estos complejos ha sido un campo de investigación muy activo en los últimos 20 años tanto en investigación básica como aplicada. El objetivo final de estas investigaciones es entender las bases moleculares de sus mecanismos catalíticos, investigaciones que impactan en el entendimiento del ciclo global del nitrógeno, y por ende en la ecología, sin contar el sin número de aplicaciones biotecnológicas que se han derivado a partir de estos estudios. Este trabajo de tesis se desarrolló a partir del estudio de ciertos aspectos del mecanismo catalítico de la enzima nitrito reductasa, una proteína que interviene en el proceso de desnitrificación del ciclo del nitrógeno. A continuación se presenta una breve descripción de las reacciones redox que conforman la desnitrificación así como también su importancia ecológica.

I.1.1- Reacciones y enzimas involucradas en la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso mediante el cual se devuelve parte del nitrógeno fijado a la atmósfera para su reutilización. Es un proceso metabólico que ocurre bajo condiciones limitantes de

oxígeno y en el cual los microorganismos utilizan NO_3^- , NO_2^- y ciertos óxidos de nitrógeno en lugar de oxígeno como aceptores de electrones para producir ATP [7]. En la Figura 3 se presentan los cuatro pasos enzimáticos secuenciales que forman parte de la desnitrificación. La enzima nitrato reductasa (Nar) utiliza Mo como cofactor e interviene en el primer paso de reducción. La segunda enzima es la nitrito reductasa (Nir) que puede contener Fe o Cu como cofactores y cataliza la reducción de NO_2^- a óxido nítrico (NO). En un tercer paso interviene el complejo enzimático óxido nítrico reductasa (Nor) que contiene grupos hemo c, b y un cofactor de Fe no hémico. Finalmente, la enzima óxido nitroso reductasa (Nos) utiliza Cu como cofactor y es la responsable de generar el N_2 [7, 8].

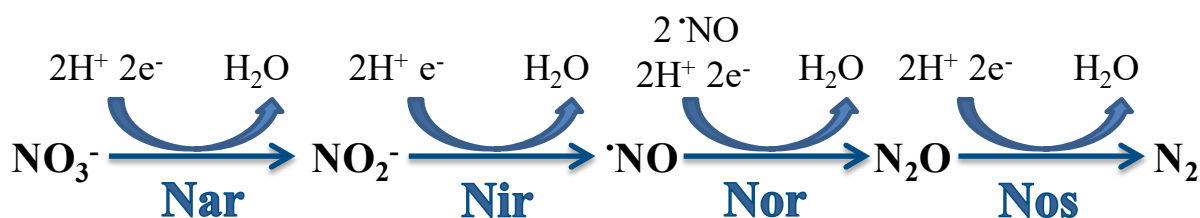


Figura 3. Pasos enzimáticos secuenciales que conforman el proceso de desnitrificación. Enzimas: Nar: nitrato reductasa. Nir: nitrito reductasa. Nor: óxido nítrico reductasa. Nos: óxido nitroso reductasa. Figura modificada de Merkle y col.[9].

Los compuestos nitrogenados involucrados en la desnitrificación juegan un papel clave en el equilibrio ecológico y consecuentemente en la salud humana. El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados sintéticos en la agricultura es una de las actividades humanas que provoca la acumulación de estos compuestos desencadenando el desequilibrio ecológico [3, 10]. Los biofertilizantes son formulaciones comerciales compuestas por microorganismos del orden *Rhizobiales* (colectivamente denominadas como rizobios), y se presentan como una alternativa sustentable a los fertilizantes sintéticos. Estos microorganismos son de gran interés económico dado su rol clave para lograr la sustentabilidad de suelos pobres en nitrógeno e incrementar rendimientos en cultivos [11, 12].

En el presente trabajo se estudió el mecanismo de reacción de la enzima nitrito reductasa, la cual cataliza la segunda reacción redox del proceso de desnitrificación. Las bacterias desnitrificantes utilizan dos clases de Nir que difieren en su estructura y cofactor. Una clase de Nir contienen un citocromo cd_1 (NirS) como cofactor mientras que la otra clase las componen las Nir que poseen cobre (NirK) [7, 13]. Las Nir estudiadas en este trabajo corresponden a NirK obtenidas de dos rizobios que forman parte de los biofertilizantes comercializados en nuestro país. En este capítulo introductorio se recopilan características estructurales, espectroscópicas y catalíticas obtenidas de NirK de otros microorganismos que serán esenciales para la comprensión de los resultados y conclusiones de este trabajo.

I.2- Nitrito reductasas de cobre

Las NirK son proteínas periplasmáticas codificadas en el genoma de bacterias como *Alcaligenes faecalis* y *Rhodobacter sphaeroides*. Estas enzimas se clasifican en verdes o azules de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. En su estructura contienen dos centros de cobre, denominados T1Cu y T2Cu. Cada uno de los centros presenta características espectroscópicas y funciones catalíticas definidas. El T1Cu es el responsable del color de la NirK y actúa como centro de transferencia electrónica (TE). El T2Cu es el sitio activo de la enzima en donde ocurre la unión y posterior reducción del sustrato. Estas enzimas requieren de un dador electrónico para llevar a cabo la catálisis. Pequeñas proteínas de cobre y citocromos *c* han sido identificadas como dadores electrónicos fisiológicos de las NirK [7]. Las características de estas proteínas se recopilan en la sección **I.2.3.** de este capítulo. Independientemente del dador electrónico y del color de las NirK, es aceptado que todas operan según un mismo mecanismo catalítico. En la Figura 4 se muestra la estructura del complejo obtenido al interaccionar la NirK aislada de *Alcaligenes faecalis* (*AfNirK*) con su dador electrónico fisiológico (*AfPaz*). En este caso el centro TE de *AfPaz* también es un T1Cu. En la figura también se ilustra el mecanismo catalítico por el cual ocurre la reducción del NO_2^- . En este mecanismo, la interacción entre las dos proteínas promueve la TE interproteína (flecha roja) desde el T1Cu de *AfPaz* al T1Cu de *AfNirK*. Este último, así reducido, es capaz de transferir el electrón al sitio activo T2Cu mediante un proceso de TE intraproteína $\text{T1Cu} \rightarrow \text{T2Cu}$ (flecha celeste) habilitando la reducción del sustrato unido a este sitio. Esta reacción enzimática es dependiente del pH del medio, aspecto que será tratado más adelante en este capítulo.

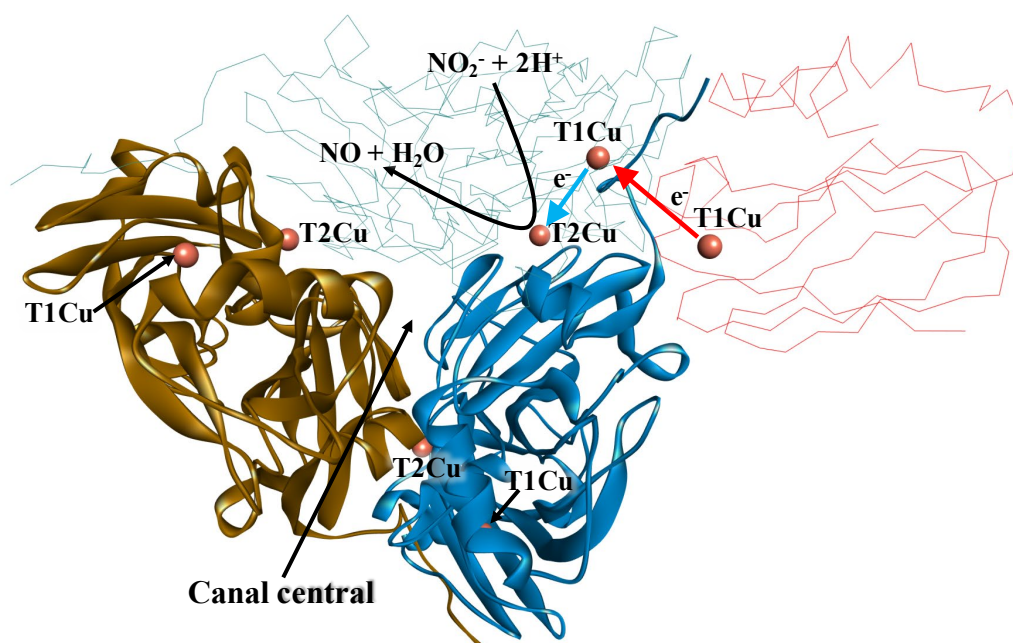


Figura 4. Estructura del complejo *AfNirK*- *AfPaz* (PDB 2P80). Los átomos de Cu que conforman los sitios T1Cu y T2Cu se representan con esferas. Las estructuras como líneas permiten mostrar los procesos de TE entre los sitios de Cu que tiene lugar en el mecanismo catalítico de la enzima. La estructura de *AfPaz* se presenta como líneas de color rojo. Los tres monómeros de *AfNirK* se presentan en colores diferentes y solo la estructura de un monómero es presentada como líneas.

I.2.1- Detalles estructurales relevantes

Las NirK presentan un elevado grado de homología (entre 70 y 80 %) en sus estructuras primarias. Se han reportado varias estructuras cristalográficas de las NirK de diferentes microorganismos con resoluciones media y alta y en todas se reconocen características estructurales que son conservadas independientemente de su color. En la Tabla 1 se resumen las características de las NirK más estudiadas con los respectivos códigos PDB de sus estructuras. En su mayoría, las NirK son proteínas homotriméricas con subunidades de masa molecular que promedian ~40 kDa y que contienen 2 átomos de Cu/monómero. En la estructura cuaternaria de *AfNirK* (Figura 4) los tres monómeros se disponen formando un canal central, conformación que se repite en todas las NirK caracterizadas. En cada uno de los monómeros que conforman el trímero se distinguen dos dominios (I y II) con estructuras β -barril. Ambos dominios se disponen uno sobre otro en una conformación similar a la encontrada en la familia de proteínas cupredoxinas [14]. El dominio I contiene al T1Cu mientras que el T2Cu se encuentra conformado por residuos pertenecientes al dominio I de un monómero y al dominio II del monómero adyacente. De esta forma el sitio activo T2Cu se encuentra en la interface de dos monómeros [15, 16].

Tabla 1. Características de las NirK aisladas de diferentes microorganismos.

microorganismo	<i>Alcaligenes xylooxidans</i> <i>GIFU1051</i>	<i>Alcaligenes xylooxidans</i> <i>NCIMB 11015</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.3	<i>Achromobacter. Cyclocastes</i> <i>LAM1013</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> S-6	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011
NirK	<i>Axg</i> NirK	<i>Axn</i> NirK	<i>Pa</i> NirK	<i>Rs</i> NirK	<i>Ac</i> NirK	<i>Af</i> NirK	<i>Sm</i> NirK
Color	azul	azul	azul	Verde-azul	verde	verde	verde
Código de PDB	1NDT	2XWZ	-	1ZV2	2NRD	2AFN	-
Masa molecular de subunidad (kDa); conformación molecular.	36; trímero	36.5; trímero	40	~46; trímero	36; trímero	37; trímero	42.5; trímero
Número de átomos de Cu/trímero.	~6	6.3	~6	~6	~6	~6	~6
λ (nm) de absorbancia en UV-vis	470, 593, 785	460,593 y 770	474, 595, 780	390, 457, 589, 700, 810	400, 460, 589, 690	460,590, 700	456, 586
ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) [λ_{\max} (nm)]	3.8 [593]	6.3 [593]	7 [595]	2.3 [589-457]	2.4 [460]	2.9 [460]	9.1 [456]
Parámetros de EPR g//; A// (mT) T1Cu: T2Cu:	2.22; 6.9 2.32;12.8	2.29; 6.4 2.41; 12.5	2.21; 6.36 Presente; 10	2.19; 6.7 2.34; 12.5	2.19; 7.3 2.33; 13	2.19; 6.6	2.190; 5.8 2.304; 14
Potenciales de reducción E ^{0'} vs NHE (mV), ~ pH 7 T1Cu T2Cu	+280 +250	+240 +230		+247 ≤ +200	+240 +250	+260	+224 +108
pH de actividad máxima	5.5	5.2		6	5.2	5.9	~5
Dadores electrónicos fisiológicos E ^{0'} vs NHE (mV), ~ pH 7 ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) [λ_{\max} (nm)]	Cyt ₅₅₁ +241 118 [418]	<i>Axn</i> AzI -II +305 6.27 (AzI) – 5.73 (AzII) [620]	<i>Pa</i> Az +319 5.7 [638]		<i>Ac</i> Paz +260 3.7[593]	<i>Af</i> Paz +270 2.9 [593]	<i>Sm</i> Paz +278 3.17[597]
Referencias	[15, 17–20]	[21–25]	[26–28]	[29, 30]	[17, 31, 32]	[33–36]	[37, 38]

En la Figura 5 se representa el entorno de coordinación de cada uno de los sitios de Cu presente en las NirK. En el centro de transferencia T1Cu, el Cu está coordinado a dos residuos de His, una Met y una Cis. La coordinación de estos residuos se produce mediante los átomos N δ_1 (His), S δ (Met) y S γ (Cis), respectivamente. El sitio presenta una geometría tetraédrica distorsionada tanto en las NirK azules como verdes. Las dos His se coordinan con distancias Cu-N entre los 2.00 y 2.11 Å y la Cis con distancias Cu-S en el rango 2.08-2.18Å, mientras que las distancias Cu-S para Met están entre 2.62-2.64Å. El T1Cu se encuentra inmerso en el interior de la estructura de la proteína, a unos 7 Å por debajo de una pequeña cavidad de la superficie de la proteína. Esta cavidad ha sido propuesta como el sitio de interacción con el dador electrónico fisiológico y de TE interproteína [16].

En el sitio activo T2Cu, el Cu está coordinado a tres N ϵ_2 (His), dos His pertenecen al dominio I de un monómero mientras que la tercer His pertenece al dominio II del monómero adyacente (Figura 5, His300B). El cuarto ligando es una molécula de solvente (H₂O u OH⁻). La enzima en su estado oxidado (Cu²⁺) presenta un T2Cu con geometría tetraédrica distorsionada y distancias de 1.91 a 2.25 Å para las uniones Cu-N y de 2.00- 2.25 Å para las uniones Cu-O [15, 39]. El T2Cu se encuentra posicionado a unos 12-13 Å del exterior de la proteína y la puerta de acceso del sustrato al sitio consiste en un canal constituido por aminoácidos predominantemente hidrofóbicos [15].

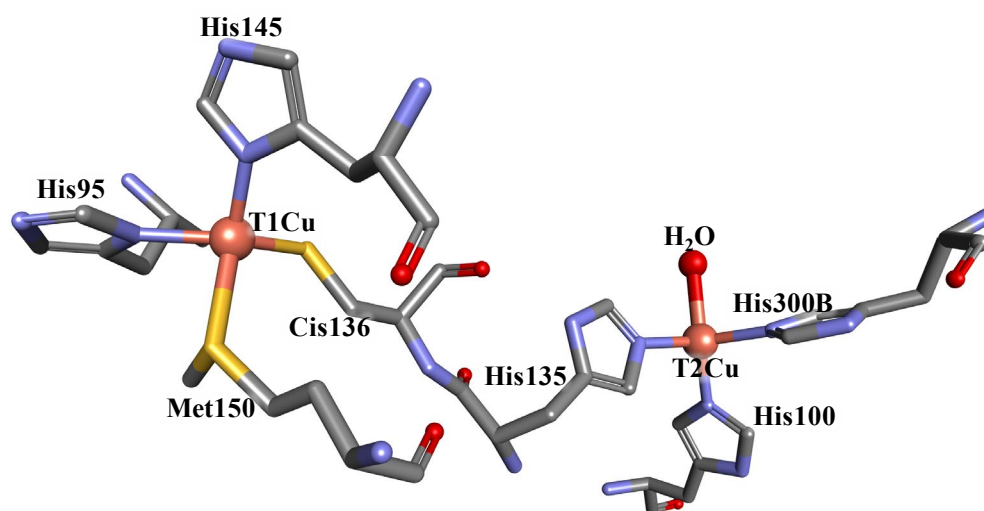


Figura 5. Estructura de los sitios T1Cu y T2Cu de las NirK (PDB 5F7B). La estructura corresponde a la enzima con una molécula de H₂O coordinada al T2Cu.

Los centros T1Cu y T2Cu en la estructura de la proteína están separados $\sim 12 \text{ \AA}$ y se comunican mediante dos vías estructurales, las cuales son presentadas en la Figura 6. El puente estructural Cis-His constituido por la Cis coordinante del T1Cu y una de las His coordinante del T2Cu es una de las vías de comunicación más corta y por la que ocurre la TE intraproteína entre los dos centros (Figura 4, flecha celeste). La segunda vía denominada *sensing loop* está constituida por seis residuos y permitiría que el T1Cu detecte la unión del sustrato en el T2Cu, permitiendo que se inicie el proceso de TE T1Cu \rightarrow T2Cu [15]. Evidentemente, un proceso de esta naturaleza implicaría un cambio en la configuración electrónica del T1Cu pero hasta el momento no se ha demostrado ninguna evidencia experimental sobre esta especulación.

Además de los residuos que coordinan los átomos de Cu y los que forman el *sensing loop*, hay otros aminoácidos conservados en la estructuras de las diferentes NirK a los que se les han asignado roles catalíticos. Dos de estos residuos fueron incluidos en la Figura 6 dado su rol fundamental en la catálisis se los denomina como Asp_{CAT} y His_{CAT}. Ambos residuos pertenecen a la segunda esfera de coordinación del T2Cu y son parte fundamental de la red de puentes de hidrógeno en la que se encuentra sumergido el sitio activo. Notar que el Asp_{CAT} es un residuo central en la función propuesta para el *sensing loop*, ya que el proceso de TE se originaría a partir de distintas conformaciones estructurales que puede adoptar este residuo [40]. En la Figura 6 se muestran algunas de las interacciones en la que están involucrados el Asp_{CAT} y la His_{CAT} y que son consideradas importantes para su rol catalítico. Tal como se ve en la figura, la molécula de agua coordinada al T2Cu se mantiene ligada mediante un puente de hidrógeno al Asp_{CAT}. A través de una molécula de agua intermediaria, el Asp_{CAT} también se encuentra unido por puentes de hidrógeno a la His_{CAT}. Estas interacciones se conservan aún cuando el sustrato se une al sitio reemplazando el H₂O ligada al Cu, en este caso el Asp_{CAT} se mantiene unido a uno de los O del nitrito coordinado. A su vez, estos residuos se interconectan con moléculas de H₂O que forman parte de una red de moléculas que se extienden hasta el exterior de la estructura de la proteína [41]. Más detalles de las funciones propuestas para estos residuos serán discutidos en la sección **I.3.3** de este capítulo. Otro residuo relevante ubicado en las cercanías del T2Cu es una Ile (Ile_{CAT}) la cual se ha demostrado que es indispensable, junto con el Asp_{CAT}, para la unión del sustrato al sitio activo en una conformación favorable para la catálisis [42].

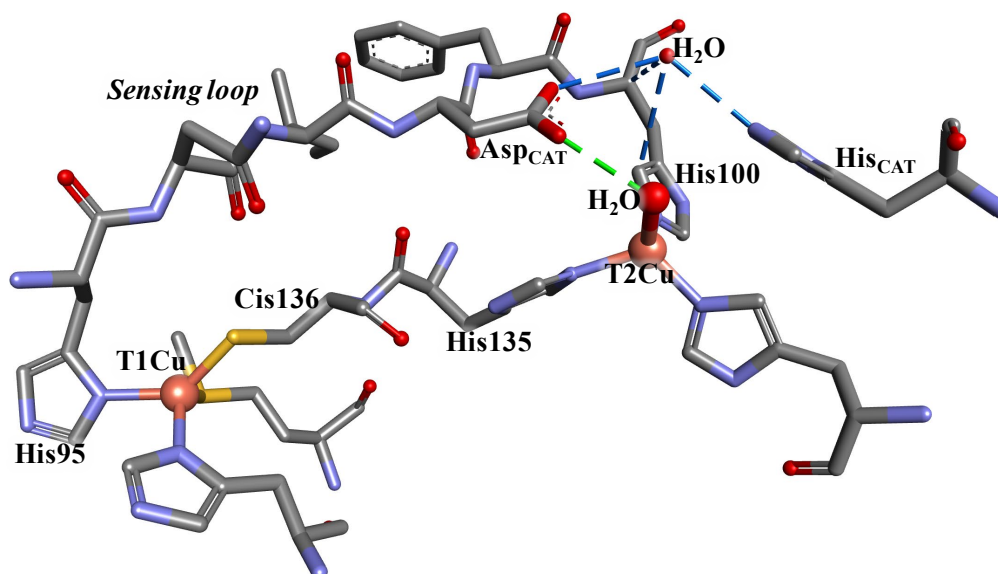


Figura 6. Estructura de los centros T1Cu y T2Cu de las NirK (PDB 5F7B) en donde se muestran las dos vías de comunicación entre los dos sitios de Cu. El puente Cis-His es la vía por la que ocurre la TE intraproteína. El *sensing loop* está conformado por los aminoácidos ubicados entre la His 100 coordinante del T2Cu y la His 95 coordinante del T1Cu. Se presentan el Asp_{CAT} y la His_{CAT} junto a sus interacciones relevantes para la catálisis. Las esferas de color rojo representan las moléculas de H₂O.

1.2.2- Espectroscopía de absorción UV-vis y EPR

El T1Cu, centro de TE y responsable del color de las NirK, se puede clasificar en verde y azul de acuerdo con sus propiedades UV-vis. Los T1Cu azules puros se encuentran en algunas proteínas mononucleares de cobre, las mismas son proteínas azules y sus espectros UV-vis se caracterizan por una banda de absorción intensa a 600 nm ($\epsilon = 3\text{-}6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [43, 44]. El sitio T2Cu, también llamado cobre normal, presenta propiedades electrónicas similares a las observadas en complejos de Cu con ligandos pequeños. Los espectros de absorción de estos complejos presentan absorciones débiles que se originan a partir de transiciones entre orbitales *d* que derivan de transiciones prohibidas en complejos de alta simetría [45]. Este hecho determina que el T2Cu no contribuye de manera apreciable al espectro UV-vis de las NirK, lo cual se verificó experimentalmente al producir muestras de NirK que solo contienen el T1Cu [31].

La Figura 7 muestra espectros UV-vis representativos de diferentes tipos de NirK y en la Tabla 1 se detallan las longitudes de onda (λ) de absorción junto con los respectivos coeficientes de absorptividad molar (ϵ) correspondiente a las longitudes de onda con máxima absorción (λ_{max}). Las NirK azules (Figura 7, espectro de línea azul) presentan una banda de absorción intensa a $\sim 590 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6\text{-}7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra banda de absorción a $\sim 460 \text{ nm}$ con una intensidad aproximadamente cuatro veces menor. Las NirK verdes presentan también máximos de absorción a estas longitudes de onda, pero con diferente relación de intensidades; la banda a 460 nm ($\epsilon = 2\text{-}3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Figura 7, espectro de líneas de punto verde) presenta una intensidad ~ 1.5 veces mayor que la banda a 590 nm . Espectros intermedios entre estos dos extremos son proporcionados por las NirK verdes-azules, una clasificación adicional que se empezó a utilizar recientemente (Figura 7, espectros de línea sólida

verde). Un ejemplo de este tipo de enzima es la *RsNirK* que presenta un espectro con las dos bandas de igual intensidad (Tabla 1).

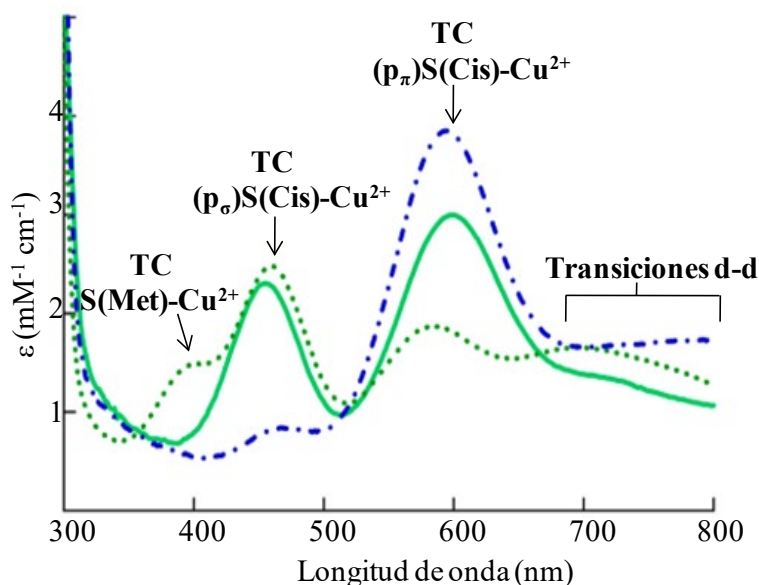


Figura 7. Espectros UV-vis de diferentes NirK. NirK azul: línea azul. NirK verde: línea de puntos verde. NirK verde-azul: línea continua verde (corresponde a un caso intermedio entre los otros dos espectros). Se indican las transiciones asignadas de cada banda de absorción. Figura modificada de Moura I y col. [46].

Las transiciones electrónicas que tienen lugar a 600 y 450 nm en los espectros de absorción debido a los T1Cu caracterizan los diferentes espectros de las NirK. Su origen, así como el de las otras bandas de absorción que integran los espectros, ha sido ampliamente estudiado. Estas dos bandas son atribuidas a las transiciones de transferencias de carga (TC) que se producen a nivel del enlace S(Cis)-Cu. En la Figura 8 se muestra el origen de estas transiciones en los T1Cu azules y verdes. En los espectros de absorción UV-vis de los T1Cu azules la banda de absorción a 600 nm se atribuye a la transición de TC ligando-metal del tipo $(3p_{\pi})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ (Figura 8, A). Esta transición ocurre debido a que la estructura geométrica del T1Cu azul permite que predomine el solapamiento de los orbitales p_{π} del S_{γ} de la Cis con el orbital $3d_{x^2-y^2}$ del Cu. Por el contrario, en los T1Cu verdes (Figura 8, B) se favorece la TC ligando-metal del tipo $(3p_{\sigma})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ debido a un solapamiento mayor de los orbitales p_{σ} del S_{γ} de la Cis con el orbital $3d_{x^2-y^2}$ del Cu. A esta transición se atribuye la banda de absorción a 450 nm presente en los espectros de las NirK verdes. Estas diferencias electrónicas entre los dos sitios son debidas a que los T1Cu verdes presentan distorsiones estructurales puntuales respecto al T1Cu azul puro, las mismas incluyen: 1) disminución en la distancia del enlace S(Met)-Cu, 2) incremento en la distancia del enlace S(Cis)-Cu y 3) rotación del plano S(Met)-Cu-S(Cis) relativo al plano N(His)-Cu-N(His) [43, 47, 48]. Las intensidades de las dos bandas de absorción en los espectros de las NirK son proporcionales a la extensión del solapamiento de los orbitales correspondientes. En las NirK azules se favorece una transición de TC de carácter π resultando en un espectro con una banda de absorción a 600 nm más intensa, mientras que en las NirK verdes se favorece una transición de TC de carácter σ resultando en un incremento de

la intensidad de la banda de absorción a 450 nm [43, 44]. En resumen, los distintos grados de distorsión estructural en el sitio permiten diferentes extensiones en los solapamientos de los orbitales y definen los espectros de absorción UV-vis de las diferentes NirK [18, 47].

Además de las bandas de absorción asignadas al enlace S(Cis)-Cu, el T1Cu presenta generalmente bandas adicionales correspondientes a transiciones de TC asignadas a la unión Cu-S(Met) y bandas del tipo d-d. La banda correspondiente a la unión S(Met)-Cu se visualiza a ~ 385 nm y se atribuye al solapamiento significativo del orbital p del S $_{\delta}$ -Met con el orbital $d_{x^2-y^2}$ o d_{xy} del Cu. Las transiciones d-d se encuentran cerca de los 700-800 nm y son transiciones que ocurren debido al solapamiento de los orbitales d de la Cis o Met con el Cu [43, 44].

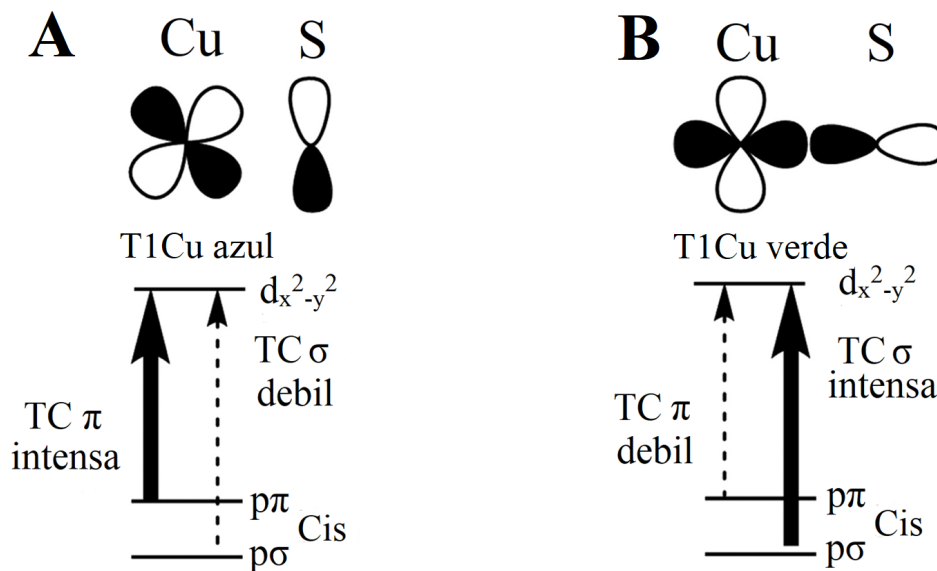


Figura 8. Representación de las transiciones electrónicas entre los orbitales p_{π} o p_{σ} del S $_{\gamma}$ -Cis y $3d_{x^2-y^2}$ del Cu en los T1Cu azules y verdes. En los T1Cu azules el mayor solapamiento de los orbitales p_{π} y $3d_{x^2-y^2}$ permite transiciones de TC $(3p_{\pi})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ que originan una banda de absorción a 600 nm intensa y el leve solapamiento $p_{\sigma}-3d_{x^2-y^2}$ produce transición de TC $(3p_{\sigma})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ débiles (poco intensas) y bandas de absorción a 450 nm poco intensas. Para los T1Cu verdes el mayor solapamiento $p_{\sigma}-3d_{x^2-y^2}$ produce transiciones de TC $(3p_{\sigma})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ intensas y una banda de absorción a 450 nm de mayor intensidad y el menor solapamiento $p_{\pi}-3d_{x^2-y^2}$ produce transiciones de TC $(3p_{\pi})S(Cis) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ más débiles y bandas a 600 nm menos intensas. Figura modificada de Ghosh y col. [49].

Al contrario de la espectroscopía de absorción UV-vis, la espectroscopía de EPR permite diferenciar los dos sitios de Cu de las NirK dado que ambos presentan señales con igual intensidad caracterizadas por parámetros diferentes. En el anexo II se describen los fundamentos de la espectroscopía de EPR y en la Tabla 1 se resumen las características espectroscópicas de las NirK que serán analizadas durante el desarrollo de este trabajo. Como se observa en la Figura 9 los espectros consisten en dos señales superpuestas las cuales están asociadas a cada centro de Cu. El hecho que $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$ en ambas señales indica que el estado fundamental (estado que contiene el electrón desapareado) es el $d_{x^2-y^2}$ en ambos sitios de Cu [44]. Los T1Cu presentan valores inferiores en g_{\parallel} y A_{\parallel} en comparación a los observados para los T2Cu. El menor valor de A_{\parallel} se atribuye a la covalencia del

enlace S(Cis)-Cu, lo que provoca que el electrón desapareado esté fuertemente deslocalizado sobre el ligando cisteína disminuyendo su interacción con el spin nuclear del cobre [50]. En todas las NirK caracterizadas las señales de EPR del T2Cu corresponden a señales axiales, mientras que las señales del T1Cu presentan distintos grados de rombicidad. Se ha postulado que los T1Cu azules y verdes están caracterizados por señales de EPR axiales y rómbicas respectivamente [46], aunque esta regla no es general.

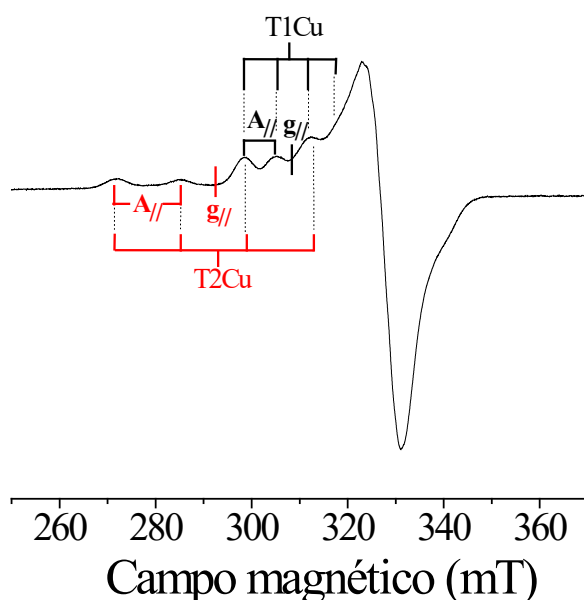


Figura 9. Espectro representativo de EPR de las NirK donde se observan las señales superpuestas del T1Cu y T2Cu.

I.2.3- Dadores electrónicos fisiológicos

Según el proceso catalítico descrito en la Figura 4, la interacción de la NirK/dador electrónico permite la TE desde el centro redox del dador al T1Cu de las NirK, produciendo la reducción del centro y la posterior TE T1Cu→T2Cu. En condiciones fisiológicas estos dadores electrónicos son pequeñas proteínas de Cu como las azurinas (Az) y las pseudoazurinas (Paz) o citocromos *c* (Cite). Las Az y los Cite han sido identificados como los dadores electrónicos fisiológicos de las NirK azules, mientras que las Paz como dadores de las NirK verdes [7].

Las Az y las Paz son pequeñas proteínas (~14 kDa) mononucleares de Cu pertenecientes a la familia de las cupredoxinas que contienen un T1Cu estructuralmente similar al de las NirK. Sus espectros de absorción están conformados por las mismas bandas de absorción que componen los espectros de las NirK y su origen se debe a las transiciones de TC ya discutidas. En la Tabla 1 se detallan los ϵ para las λ_{\max} de los espectros UV-vis de estas proteínas. En ambos casos los picos de máxima absorción ocurren en el rango de 590 a 620 nm y se originan por las transiciones de TC $(3p_{\pi})S(\text{Cis}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$. Los espectros de las Paz también presentan una banda a 450 menos intensa debido a la transición $(3p_{\sigma})S(\text{Cis}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$. Como es de esperar, sus espectros de EPR presentan

una única señal con parámetros similares a los encontrados para los T1Cu de las NirK, sin embargo, la señal presenta simetría rómbica para las Paz y axial para las Az [16].

Los Citc reportados como dadores electrónicos de las NirK presentan propiedades espectroscópicas típicas de los citocromos ya caracterizados [51]. Brevemente, los espectros de absorción de estas proteínas en su forma reducida (Fe^{+2}) consisten en tres bandas de absorción denominadas α , β y γ que aparecen de mayores a menores longitudes de onda respectivamente. La banda de absorción más intensa es la γ , también denominada banda de Soret, con valores de ϵ que rondan los $100 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y se observa a 417 nm. Las bandas β aparecen a 520 nm y la α , para los Citc, aparecen a 550 nm. En el estado oxidado de la proteína (Fe^{+3}), la banda de Soret sufre un pequeño corrimiento hacia el azul y las bandas α y β se fusionan en una banda ubicada a los $\sim 530 \text{ nm}$.

I.3- Mecanismo catalítico de las NirK

El estudio del mecanismo catalítico de las NirK se puede dividir en tres procesos (Figura 4): la reducción del T1Cu como consecuencia de la TE interproteína a partir de la interacción dador electrónico/NirK, la TE intraproteína $\text{T1Cu} \rightarrow \text{T2Cu}$ y la reducción del nitrito en el T2Cu.

I.3.1- Interacción enzima/dador electrónico y transferencia electrónica interproteína

La reacción de TE desde el dador electrónico fisiológico al T1Cu de las NirK obedece a un mecanismo de dos pasos: la interacción de las proteínas para formar un complejo enzima/dador electrónico transitorio y la posterior TE interproteína. Las interacciones dador electrónico/NirK son dinámicas y de naturaleza transitoria, lo que le permite al dador repetir la entrega de electrones varias veces logrando una bioenergética y metabolismo adaptativo efectivo de la célula viva [46]. Sin embargo, se requiere de una determinada especificidad para asegurar la interacción enzima/dador electrónico y el flujo direccional de electrones en este y en todos los sistemas biológicos. Como se mencionó antes, una cavidad superficial ubicada sobre el T1Cu de las NirK es el sitio por el cual se produce la interacción con el dador electrónico y a través de la cual ocurre la TE interproteína. Esta cavidad, así como el área de contacto de la superficie del dador electrónico, está conformada principalmente por residuos hidrofóbicos. Sin embargo estas características superficiales al parecer no son requisitos únicos para asegurar la especificidad de la interacción. Residuos cargados ubicados en las cercanías de estas áreas hidrofóbicas se han propuesto también como esenciales en la interacción. El patrón de distribución de tales residuos alrededor de la zona de TE también sería un factor clave en las interacciones transitorias y en la especificidad requerida en las condiciones fisiológicas dentro de la célula [28, 36, 52].

Otro aspecto relevante a considerar en este proceso de TE son los valores de los potenciales de reducción (E) de los centros redox involucrados en la TE interproteína. En la Tabla 1 se recopilan los valores de potencial formal de reducción (E^0) medidos experimentalmente para las NirK y sus respectivos dadores electrónicos. En todos los casos se observa que el centro de TE del dador electrónico presenta E^0 mayores o cercanos al T1Cu de la NirK ($E^0_{\text{dador}} \geq E^0_{\text{T1Cu-NirK}}$). Esto implica

que la TE interproteína es termodinámicamente desfavorable, afirmación que contradice los ensayos cinéticos que demuestran que la velocidad de TE desde el dador a la NirK ocurre a velocidades elevadas [46]. Las posibles explicaciones para esta aparente contradicción serán analizadas en el transcurso de esta tesis.

I.3.2- Transferencia electrónica intraproteína

El puente estructural T1Cu-T2Cu conformado por los aminoácidos Cis-His (Figura 6), la vía estructural más corta entre los dos sitios de Cu, ha sido propuesto como el camino químico por donde ocurre la TE T1Cu→T2Cu en las NirK. Mediante mutagénesis sitio dirigida se logró modificarlo, obteniéndose en todos los casos variantes catalíticamente inactivas. En estos estudios la Cis fue reemplazada por Ala en *AxNirK* y la His por Lis en *AfNirK* y Val en *AxNirK*. El análisis espectroscópico de estas proteínas revelan que la variante construida con Ala perdió el T1Cu y solo contiene el T2Cu en su estructura [23], mientras que ambas variantes de His presentan los dos sitios. En la estructura cristalográfica de la variante construida con Val se observa un T2Cu coordinado a solo dos His, esta interrupción en la vía de TE explicaría la falta de actividad catalítica [53]. Si bien no existe estructura cristalográfica disponible para la variante construida con Lis, su larga cadena lateral y la carga positiva en el grupo ε- amino a pH fisiológico impedirían que este residuo coordine el Cu obteniendo un T2Cu similar al de la variante de Val [33]. Claramente, los aminoácidos seleccionados para construir estas variantes no poseen capacidad de coordinar el Cu en condiciones fisiológicas, interrumpiéndose así la conexión entre ambos centros por esta vía estructural. Estos resultados dan indicios de que el puente estructural es relevante para la TE entre ambos sitios, sin embargo las variantes construidas no permiten tener los dos centros de Cu unidos por un puente. Este aspecto será analizado en este trabajo mediante la construcción de variantes que permitan no solo la coordinación de cada Cu sino también que ellos estén unidos por un puente estructural.

Similarmente a lo explicado para la TE interproteína, en las NirK el potencial de reducción del T1Cu es mayor o similar al potencial del T2Cu ($E^{0'}_{T1Cu} \geq E^{0'}_{T2Cu}$) (Tabla 1), estableciendo así un proceso de TE T1Cu→T2Cu también termodinámicamente desfavorable. El hecho que la reacción enzimática ocurre independientemente de estos valores, llevó a pensar que la presencia de nitrito modularía el potencial de reducción del T2Cu favoreciendo la TE [46, 54, 55]; aunque no existen evidencias experimentales concretas al respecto. Pinho y col. [54] realizaron un experimento en el cual se monitoreó los estados de oxidación de los centros de Cu de *PcNirK* en condiciones catalíticas mediante EPR usando un dador de electrones no fisiológico. En este ensayo los espectros obtenidos corresponden a un estado de punto final en el cual, luego de varios ciclos redox de la enzima, el dador electrónico fue oxidado debido al exceso de sustrato en el medio de reacción. En estos espectros la intensidad de la señal de EPR del T1Cu oxidado (T1Cu_{ox}) resultó mayor que la intensidad del T2Cu (T2Cu_{ox}), contrario a lo esperado para la enzima *as-purified* en base a los $E^{0'}$ de cada centro medidos experimentalmente ($T2Cu_{ox} \geq T1Cu_{ox}$). Si bien este experimento corresponde a un estado de punto

final, y no a un estado catalítico intermedio, da una posible explicación sobre porqué la TE $T1Cu \rightarrow T2Cu$ en presencia de sustrato se hace termodinámicamente favorable. En otras palabras, la unión del sustrato al sitio activo $T2Cu$ incrementaría el $E^{0'}_{T2Cu}$ invirtiendo así los valores relativos de $E^{0'}$ de ambos centros ($E^{0'}_{T1Cu} < E^{0'}_{T2Cu}$). Estudios de mutagénesis realizados en *AxnNirK* dan pruebas adicionales que sustentan esta hipótesis. Al modificar un aminoácido perteneciente a la segunda esfera de coordinación del $T1Cu$ se logró incrementar el potencial de reducción del centro en ~ 60 mV; en esta variante solo se observó la TE entre ambos sitios en presencia del sustrato [56]. El hecho que estas evidencias indirectas de la modulación del $E^{0'}_{T2Cu}$ debida a la unión del sustrato no se verifican en todas las NirK, podría sugerir que la TE sea un proceso complejo y que además podría involucrar alteraciones estructurales producto de la interacción enzima/dador [22] contribuyendo a la modulación de los $E^{0'}$ de ambos centros.

Estudios computacionales recientes, han planteado la coexistencia de dos posibles vías de TE en el puente Cis-His que pueden ser selectivamente activadas dependiendo de la estructura geométrica y electrónica del $T1Cu$ [48]. Para las NirK azules se propone que la TE ocurre mediante la vía covalente Cis-His (Figura 10), mientras que para las NirK verdes la TE se produciría mediante una vía que involucra el puente de hidrógeno establecido entre el O del carbonilo de la Cis y el $N_{\delta 1}$ del imidazol de la His (de ahora en más denominado $N_{\delta 1}H \dots O=C$). Esta segunda vía acortaría parcialmente la vía utilizada por las NirK azules. Hasta el momento no existen evidencias experimentales que demuestren esta hipótesis.

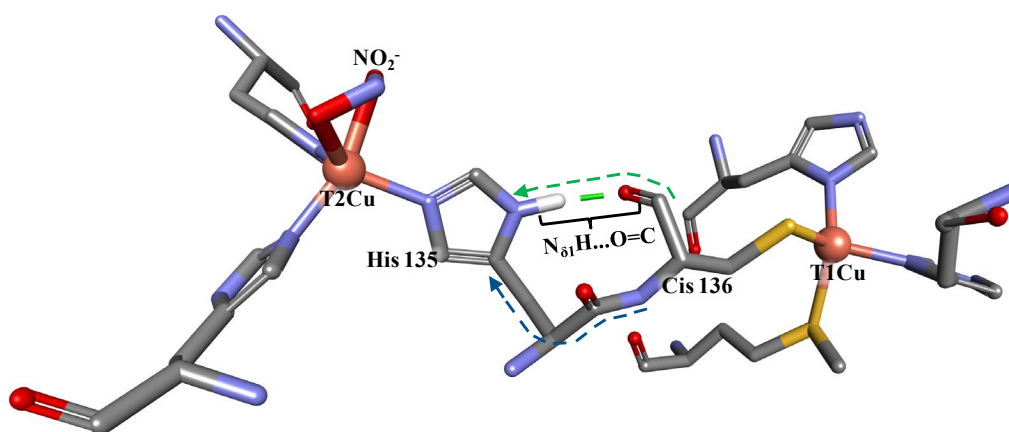


Figura 10. Vías de TE propuestas por Hadt y col. [48]. La vía marcada en azul se propone para las NirK azules y la vía verde para las NirK verdes. Estructura correspondiente a *A/NirK* (PDB 1SJM). El NO_2^- se presenta unido al $T2Cu$ en coordinación bidentada.

I.3.3- Reducción del sustrato y dependencia de la actividad catalítica con el pH

El mecanismo por el cual las NirK llevan a cabo la reducción del nitrito se ha debatido extensamente. Datos experimentales y resultados obtenidos a partir de resolución de estructuras cristalográficas han permitido formular diferentes mecanismos [9], uno de los cuales se muestra en la

Figura 11. Este mecanismo se inicia a partir de la enzima con una molécula de H_2O u OH^- unida al T2Cu (paso A, Figura 11). El nitrito se coordina de manera bidentada al Cu^{+2} desplazando la molécula de H_2O (Figura 10 y 11, paso B). En esta conformación del sustrato ambos enlaces son asimétricos, siendo que el enlace Cu-O más corto se ubica más cercano al Asp_{CAT} . De esta forma, y como ya fue mencionado en sección **I.2.1**, se establece un puente de hidrógeno entre este residuo y el oxígeno más cercano del nitrito formando el intermediario NOOH-Cu^{+2} . Esta interacción es considerada relevante para la unión del sustrato en una conformación favorable para la catálisis [57, 58]. La unión del sustrato al sitio activo desencadena la TE $\text{T1Cu} \rightarrow \text{T2Cu}$ formando un intermediario NOOH-Cu^+ (paso C). En esta instancia, la His_{CAT} facilita el segundo protón (paso D, Figura 11) promoviendo la ruptura del enlace N-O liberando el producto NO y regenerando el sitio al estado inicial de la enzima (paso E, Figura 11). Notar que en los diferentes mecanismos propuestos, el rol asignado al Asp_{CAT} y a la His_{CAT} es transferir los protones requeridos para la reducción del sustrato.

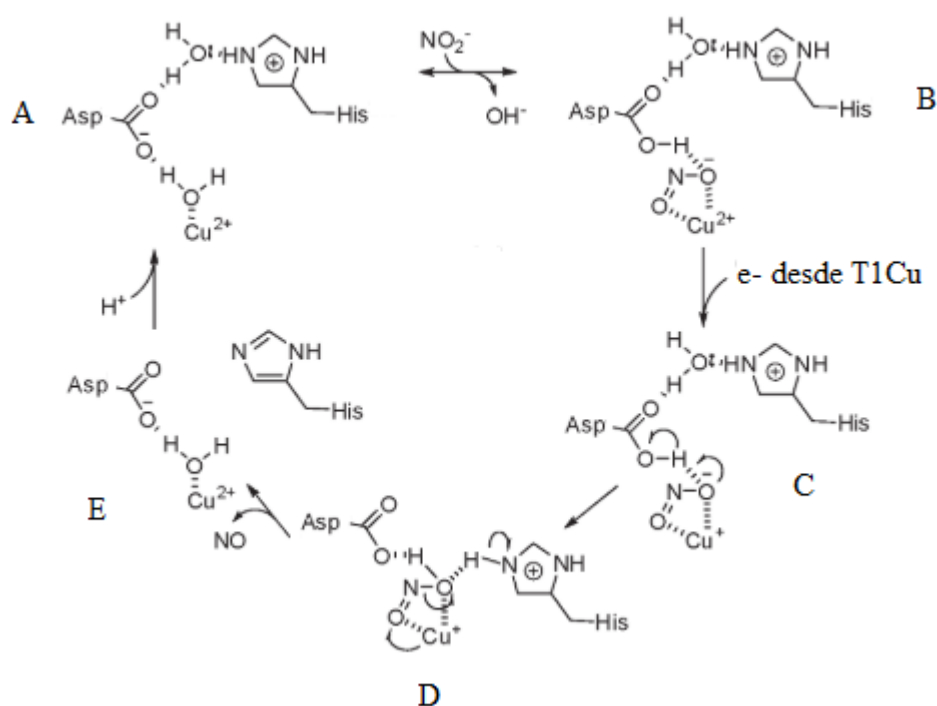


Figura 11. Mecanismo catalítico propuesto para las NirK. Figura modificada de Merkle y col. [9].

Tal como fue mencionado anteriormente, la actividad catalítica de las NirK es dependiente del pH, teniendo un máximo de actividad a pH 5 y 6 (Tabla 1) y actividad no detectable a pH mayores a 8. Esta dependencia se ha atribuido a modificaciones en los residuos Asp_{CAT} e His_{CAT} responsables de la transferencia de protones necesarios para la reducción. Esto se fundamenta en el pKa reportado para el Asp_{CAT} en *AxnNir* de ~ 6.4 cuando el sustrato es coordinado al Cu [57] y un pKa estimado para la His_{CAT} entre 7 y 8 [59], de esta forma a pH cercanos a 8 ambos residuos se encontrarían desprotonados siendo incapaces de transferir protones al sustrato unido. Existen otros factores

adicionales que darían cierto soporte a esta hipótesis. Uno de ellos es que la desprotonación del Asp_{CAT} desestabilizaría la red de puentes de hidrógeno en la que está involucrado (Figura 6), lo que implicaría que el sustrato se une al sitio activo en una conformación poco favorable para la catálisis. Otro factor es que la perturbación de estas interacciones también podría modificar la conformación de ciertos residuos ubicados en las cercanías del T2Cu como la His_{CAT}, la cual se posiciona muy cercana al átomo de Cu a elevados pH posiblemente dificultando la unión del sustrato [60]. Las modificaciones estructurales que ocurren en la cercanías del sitio activo a elevados pH también serían las responsables de la disminución del potencial de reducción del centro activo haciendo aún más desfavorable la TE T1Cu→T2Cu [59].

La modulación de los potenciales de reducción de los centros de Cu en las NirK debido a la interacción proteína/dador en condiciones catalíticas así como el rol del puente N_{δ1}H...O=C en el proceso de TE intraproteína y en la dependencia con el pH del medio de reacción, este último hasta el momento no tenido en cuenta en la bibliografía, son aspectos también analizados en esta tesis.

II- *Objetivos*

II.1- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento del mecanismo catalítico de la NirK, una enzima clave del proceso de desnitrificación del ciclo del nitrógeno. Para lograr este objetivo se trabajó con una NirK verde aislada de *Sinorhizobium meliloti* (Sm) y una azul aislada de *Bradyrhizobium japonicum* (Bj) y sus respectivos dadores electrónicos fisiológicos. La información sobre estos sistemas fue obtenida por medio de técnicas de biología molecular, estudios cinéticos, espectroscópicos y electroquímicos.

II.1.1- Objetivos específicos

- I. *Caracterizar a SmNirK y BjNirK y sus respectivos dadores electrónicos fisiológicos, SmPaz y BjCitc₅₅₀, desde una perspectiva:*
 - a- Molecular, incluyendo la determinación de la masa molecular del monómero, la estructura cuaternaria y el contenido de metales/cofactores.
 - b- Espectroscópica, mediante UV-vis y EPR.
 - c- Electroquímica, mediante voltametría cíclica.
- II. *Caracterizar la cinética de reducción del NO₂⁻ llevada a cabo por SmNirK y BjNirK frente a los respectivos dadores electrónicos fisiológicos y dadores artificiales mediante ensayos cinéticos de estado estacionario y técnicas electroquímicas.*
- III. *Evaluar el efecto de la interacción SmNirK/SmPaz sobre los potenciales de reducción de los sitios de Cu de SmNirK en condiciones catalíticas mediante espectroscopía de EPR.*
- IV. *Estudiar la relevancia de las interacciones covalentes, no covalentes y coordinación con Cu presentes en el puente Cis- His en la TE intraproteína. Este objetivo incluye la mutación de la Cis y la His en SmNirK por residuos con potencial capacidad de coordinar Cu manteniendo los centros conectados mediante un puente estructural, y la caracterización de estas variantes mediante espectroscopías de absorción UV-vis y EPR y ensayos cinéticos y electroquímicos.*
- V. *Evaluar el rol del puente Cis-His en la dependencia de la actividad catalítica con el pH. Este objetivo incluye la realización de ensayos cinéticos a diferentes pH monitoreados por espectroscopías de absorción UV-vis y de EPR con el fin de evaluar el rol de N_{δ1}H...O=C en la TE intraproteína de SmNirK y BjNirK.*

III- *Materiales y métodos*

En este trabajo de tesis se implementaron técnicas nuevas y otras ya estandarizadas en el laboratorio, algunas de las cuales requirieron ser adaptadas para lograr cumplir los objetivos planteados.

Los resultados que forman parte de este trabajo fueron obtenidos a partir del estudio realizado con las proteínas *BjNirK*, *BjCitc₅₅₀*, *SmNirK* y *SmPaz* y variantes obtenidas a partir de *SmNirK*. La nomenclatura *BjNirK* y *SmNirK* serán utilizadas para las formas salvajes de estas proteínas (*wild type*), mientras que para las variantes de *SmNirK* se utilizará H171D y C172D. En la Tabla 2 se detallan las notaciones utilizadas para los vectores de expresión construidos a partir del clonado de los genes codificantes de las proteínas en el plásmido pET-22b(+) junto con el *locus tag* y tamaño en pares de bases de cada gen.

El trabajo que involucró la amplificación del gen que codifica para cada proteína a partir del ADN genómico y el clonado de genes en vectores de expresión fue realizado por otros integrantes del grupo de investigación (Dr. Ferroni y estudiantes de grado). Los resultados que forman parte de esta tesis corresponden al trabajo iniciado a partir de la optimización de los protocolos de expresión y purificación de estas proteínas y de la obtención de variantes de *SmNirK* mediante técnicas de mutagénesis sitio dirigida. En el anexo I de este trabajo se detallan materiales utilizados y metodologías de uso rutinario de un laboratorio de biología molecular que fueron implementadas para el desarrollo de los objetivos experimentales propuestos.

Tabla 2. Notación de los vectores de expresión construidos para la producción de proteínas solubles.

Vector de expresión	Proteína codificante	<i>Locus tag</i>	Tamaño del Inserto (pb)
p22SK	<i>SmNirK</i>	<i>SMA 1250</i>	1131
p22SK-H171D	H171D		1131
p22SK- C172D	C172D		1131
p22SPaz	<i>SmPaz</i>	<i>SMA 1243</i>	444
p22BK	<i>BjNirK</i>	<i>blr7089</i>	1104
p22BC	<i>BjCitc₅₅₀</i>	<i>blr7544</i>	411

III.1- Clonado molecular de *BjNirK* y *BjCitc₅₅₀*

La obtención de ADN genómico a partir de células de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 fue realizado a partir de un cultivo saturado de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 como se describe en Ferroni y col. [37].

Los genes *blr7089* y *blr7544* (<http://genome.annotation.jp/rhizobase/Bradyrhizobium>) que codifican para *BjNirK* y *BjCitc₅₅₀*, respectivamente, fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN genómico como molde. La PCR se realizó utilizando un termociclador Boeco TC-PRO con un programa que consistió en 30 ciclos realizados según

condiciones especificadas en la Tabla 3 para cada gen. Previo al primer ciclo se realizó un paso de desnaturalización a 94 °C de 5 min y posterior al último ciclo se incluyó un paso de elongación a 72 °C durante 10 min. Los oligonucleótidos se diseñaron estratégicamente de manera que se incorporen, en los extremos 5' y 3' del gen, sitios de restricción específicos que permitan el clonado en los vectores de expresión elegidos (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos, enzimas de restricción, temperatura de hibridación (T_m) y programa de PCR utilizados para la amplificación de los genes codificantes de *BjNirK* y *BjCitc₅₅₀*.

	Secuencia (5'-3')	Enzimas restricción	T _m (°C)	Orientación	Programa de PCR
<i>BjNirK</i>	<u>CATATG</u> CTTCCGATGTTACCCG	NdeI	70	forward	94 °C- 1 min 61 °C- 30 s 72 °C-2 s
	<u>GAGCTC</u> CTAGTTGGTGTGGC	SacI	66	reverse	
<i>BjCitc₅₅₀</i>	<u>CATATG</u> ACAAACTGACTTTCGG	NdeI	64	forward	94 °C- 1 min 59 °C- 30 s 72 °C-1 min
	<u>GGATCC</u> TTACTGCTTGATCTCC	BamHI	68	reverse	

El volumen final de reacción de cada amplificación fue de 20 µL y la solución mezcla consistió en: tampón comercial 1X (PB-L), 0.05 U/µL de *Pfu* DNA polimerasa (PB-L), 1 ng de ADN genómico, 4 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.2 mM de dNTPs (desoxirribonucleótidos, Genbiotech) y 5% de DMSO (dimetilsulfóxido).

Los fragmentos de ADN amplificados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1% p/v) preparados en tampón TAE y visualizados mediante tinción con GelGreen (BIOTIUM). Las bandas visualizadas de tamaño esperado se purificaron a partir del gel con un kit comercial según especificaciones del fabricante (Bionner) y se clonaron en el vector pJET 1.2 Blunt utilizando el kit comercial CloneJET™ PCR cloning kit (Fermentas). Para esto último, se preparó una solución conteniendo tampón comercial 1X, 0.15 pmol de producto de PCR purificado, 0.05 pmol de pJET1.2/blunt Cloning Vector, 0.25 U/µL de T4 DNA ligasa en agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL durante 30 min a 22 °C tal como lo especifica el fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes TOP 10 de *E. coli* (**anexo I**) y la selección de clones positivos se realizó en placas de LB-agar con ampicilina. Las secuencias de los insertos clonados de las construcciones pJBK (contiene gen que codifica para *BjNirK*) y pJBC (contiene gen que codifica para *BjCitc₅₅₀*) fueron confirmadas por secuenciación.

Tanto pJBK como pJBC fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (Tabla 3), los insertos liberados fueron separados mediante electroforesis (**anexo I**) y purificados a partir del gel de agarosa mediante kit comercial (Bionner). El inserto obtenido de cada digestión fue ligado al vector pET-22b(+) (Novagen) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. En este paso se obtuvieron las construcciones p22BK y p22BC (Tabla 2).

III.2- Mutagénesis sitio dirigida para la obtención de las variantes de *SmNirK*

Los residuos C172 (coordinante de T1Cu) y H171 (coordinante de T2Cu) fueron reemplazados por ácido aspártico (D) obteniendo las variantes C172D y H172D, respectivamente. Las variantes fueron construidas a partir del plásmido p22SK que codifica para *SmNirK* [37]. La técnica de mutagénesis sitio dirigida consiste en la amplificación del vector de expresión utilizando oligonucleótidos que contienen la mutación deseada, los cuales se hibridan a las cadenas simples del vector y son elongados incorporando la mutación deseada. Posteriormente se trata el producto de reacción con la enzima de restricción DpnI la cual reconoce y degrada el ADN doble cadena que contiene bases marcadas con grupos metilos (ADN molde). De esta forma, se enriquece el producto de la reacción de amplificación con el vector mutado.

La amplificación del vector p22SK se realizó utilizando dos oligonucleótidos sintéticos complementarios (sentido *forward* y *reverse*) que contienen la mutación deseada (Tabla 4) en un volumen de reacción de 25 µL siguiendo el programa descrito en la Tabla 5. En cada reacción se usó 1 µM de cada primer, 8 ng de ADN molde, 0.05 U/µL de Long Enzyme Mix (ThermoScientific), tampón comercial de reacción de PCR 1 X suplementado con 15 mM de MgCl₂ (ThermoScientific) y 0.2 mM de dNTPs (Genbiotech). Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) y luego se purificaron usando kit comercial (Bionner) siguiendo indicaciones del fabricante. Los productos de la reacción de amplificación se trataron con DpnI (Promega) en un volumen final de 20 µL de solución mezcla conteniendo: 5 µL del producto de PCR purificado, tampón comercial 1X, 0.1 µg/µL de BSA acetilada y 0.25 U/µL de enzima DpnI. La solución se incubó 1 h a 37 °C y posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C durante 20 min. El producto obtenido se utilizó para transformar células competentes TOP 10 de *E. coli* (**anexo I**). Un total de cinco colonias aisladas fueron crecidas separadamente en medio LB líquido suplementado con ampicilina para posterior extracción de ADN plasmídico y secuenciación para confirmar la mutación. A partir de este procedimiento se obtuvieron las construcciones que contienen las mutaciones, de ahora en más denominadas p22SK-H171D y p22SK-C172D (Tabla 2).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de mutagénesis sitio dirigida. Los nucleótidos que codifican para el ácido aspártico se encuentran subrayados.

Variante	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Orientación
C172D	GTCTACCACG <u>ACG</u> CACCTC	61.3	Forward
	GAGGTGCGT <u>CGT</u> GGTAGAC		Reverse
H171D	CTTCGTCTAC <u>GACT</u> GCGCA	64.4	Forward
	TGCGCAGT <u>CGT</u> AGACGAAG		Reverse

Tabla 5. Programa de PCR para la mutagénesis sitio dirigida.

Etapas	Número de ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	180	94
Desnaturalización	10	20	94
Hibridación		30	57
Elongación		420	68
Desnaturalización	20	20	94
Hibridación		30	57
Elongación		420 +2 s/ciclo	68
Elongación final	1	600	68

III.3- Expresión y purificación de proteínas recombinantes

III.3.1- Crecimiento de células *E. coli* y expresión de proteínas

Diferentes condiciones de trabajo fueron evaluadas en pequeña escala (5 a 10 mL) para optimizar los protocolos de cultivos de células de *E. coli* y expresión de proteínas. En estas pruebas preliminares se evaluaron los medios de cultivos LB modificado y ZYM para el crecimiento de células, distintas cepas de expresión de *E. coli* e inductores (IPTG y lactosa) así como también la temperatura de crecimiento e inducción. A continuación se presentan los protocolos de crecimiento de células de *E. coli* y de expresión que permitieron obtener las proteínas solubles y en mayor cantidad.

Para la expresión de las diferentes proteínas se transformaron bacterias BL21(DE3) (**anexo 1**) con cada una de los vectores de expresión (Tabla 2). En el caso de la expresión de BjCitc₅₅₀, el proceso de transformación de células competentes se realizó en dos pasos. Primeramente se transformaron las células BL21(DE3) con la construcción p22BC y luego se les incorporó el vector *helper* pEC86 siguiendo el mismo protocolo de transformación de células competentes.

Los crecimientos se realizaron siempre en condiciones aeróbicas y todos los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo saturado de las células transformadas. Se utilizaron erlenmeyers de 2 L y un agitador orbital con temperatura controlada. Todos los crecimientos se realizaron en presencia de los correspondientes antibióticos y se monitoreó el crecimiento celular midiendo la DO₆₀₀ (Densidad óptica medida a 600 nm)

Las células BL21(DE3) transformadas con las construcciones p22SK, p22SK-H171D o p22BK fueron crecidas en medio ZYM en inducción continua con lactosa durante 30 h a 200 rpm y temperatura ambiente. El medio de cultivo fue suplementado con 100 µg/µL de ampicilina y 0.6 mM de CuSO₄, este último fue adicionado durante las últimas 4 h de cultivo.

Durante la expresión de *BjCitC₅₅₀* el crecimiento de las células BL21(DE3) transformadas con la construcción p22BC se realizó en medio ZYM según protocolo anteriormente descrito utilizando 100 µg/µL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol y suplementado el medio de cultivo con 0.05 mM de FeCl₃ durante todo el procedimiento.

El crecimiento de las células BL21(DE3) transformadas con p22SK-C172D se realizó en medio LB a 37 °C hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0.6 unidades de absorbancia. A partir de ese momento, se inició la inducción de la expresión de la proteína con 0.2 mM de IPTG durante 3 h a temperatura ambiente, asegurando así la producción de proteínas en su forma soluble. Este mismo protocolo fue utilizado para la producción de *SmPaz* a partir del cultivo de células BL21(DE3) transformadas con p22SPaz.

Una vez finalizado el crecimiento, se procedió a la recolección de las células mediante centrifugación a 5000×g y 4 °C por 15 min utilizando una centrífuga Sorvall RC6+ (ThermusScientific). Las células obtenidas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

III.3.2- Obtención del extracto soluble

Las células obtenidas durante los cultivos celulares se resuspendieron en tampón de baja fuerza iónica (5 mM de Tris-HCl a pH 7). A las células suspendidas que expresaban proteínas de cobre se les adicionó CuSO₄ (1-10 mM), con el objetivo de inducir la formación de los centros metálicos de las enzimas. La disrupción celular se realizó en baño de hielo utilizando un sonicador Vibra CellTM VC 750 realizando ciclos de 1.5 min a 50 % de amplitud, obteniéndose así el extracto bruto. Para la obtención del extracto soluble, se procedió a la centrifugación del extracto bruto durante 30 min a 10000×g y 4 °C, se descartó el pellet y la fracción soluble se dializó por al menos 12 h contra el tampón utilizado en el paso posterior de purificación.

III.3.3- Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas se realizó mediante cromatografía líquida. El seguimiento de las proteínas en las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación y la evaluación del grado de pureza se llevaron a cabo mediante espectroscopía de absorción UV-vis y en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) de 12 o 15 % según la masa molecular de la proteína analizada. Dado que todos los protocolos consistieron en dos o más pasos de purificación fue requerido luego de cada columna cromatográfica un paso de diálisis durante aproximadamente 12 h contra el tampón de equilibrado utilizado en el paso de purificación posterior.

III.3.3.1- Purificación de *SmNirK* y sus variantes

La purificación de *SmNirK* se realizó según protocolo previamente publicado [37] incorporando algunas modificaciones. En todo el proceso se utilizó 10 mM de Tris-HCl a pH 7 como tampón de equilibrado. El primer paso incluyó una columna empaquetada con resina de intercambio aniónico DE52 (Watman) en la cual se sembró el extracto soluble previamente dializado. Luego de la siembra se realizaron lavados con dos volúmenes de columna con el mismo tampón. La elución de la proteína se realizó aplicando gradiente salino lineal de NaCl (0- 600 mM) preparado en el tampón de equilibrado. En un segundo paso cromatográfico se utilizó una resina de intercambio iónico DEAE Sepharosa Fast Flow (GE-Healthcare) en la que se sembró la fracción que contenía la proteína de interés proveniente del primer paso de purificación. Luego del lavado con dos volúmenes de columna se procedió a la elución de la proteína aplicando gradiente salino de NaCl (0-300 mM) en 20 volúmenes de columna.

La variante H171D se logró obtener con alto grado de pureza utilizando un protocolo de purificación similar al previamente descripto para *SmNirK*. El tampón de trabajo en cada paso de purificación fue de 10 mM Tris-HCl a pH 8.

Para el caso de C172D el extracto soluble obtenido contenía una elevada carga lipídica que dificultó el proceso de purificación. Para esta variante se incorporó un primer paso de purificación mediante precipitación salina con sulfato de amonio el cual fue adicionado al extracto soluble a una concentración final de 20 % (p/v) en continua agitación y posteriormente se incubó por 30 min a 4 °C. Luego de dializado contra tampón 10 mM Tris-HCl a pH 8, el cual también fue utilizado como tampón de equilibrado en los sucesivos pasos de purificación, se procedió a sembrar la muestra en columna con resina DE52 primero y posteriormente en columna con resina iónica DEAE Sepharosa Fast Flow, trabajando con el mismo procedimiento de *SmNirK*.

Durante todo el proceso de purificación de H171D y C172D los pasos de diálisis se realizaron contra solución de CuSO₄ a una concentración molar diez veces inferior a la estimada de proteína. Ambas variantes presentaron un comportamiento cromatográfico similar al de *SmNirK* en las condiciones de trabajo.

Tanto para *SmNirK* como para H171D cada paso cromatográfico fue facilitado debido al color verde y verde grisáceo de las proteínas, respectivamente. La variante C172D no era detectada visualmente.

Las fracciones puras obtenidas de la última columna fueron agrupadas y dializadas contra tampón 10 mM de Tris-HCl a pH 7, concentradas hasta ~18 mg/mL con un Amicon Ultra 30 K NMWL, y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

III.3.3.2- Purificación de *SmPaz*

Para esta proteína todos los pasos cromatográficos se realizaron con un tampón 5 mM de PBS (tampón fosfato salino) a pH 6. El primer paso de purificación se realizó con resina DE52 utilizando

un protocolo de purificación similar al de *SmNirK* aunque no fue requerido gradiente salino para la elución de la proteína dado que *SmPaz* no interacciona con la resina en las condiciones de trabajo. Las fracciones que contenían a *SmPaz* fueron sembradas en columna empaquetada con resina de intercambio catiónico SP Sepharosa (GE-Healthcare) previamente equilibrada con 5 mM de PBS a pH 6. La elución de la proteína se realizó mediante gradiente salino con NaCl (0-300 mM) preparado en el mismo tampón PBS en 15 volúmenes de columna. La proteína purificada fue dializada contra el mismo tampón, concentrada y almacenada a -80 °C.

III.3.3.3- Purificación de *BjNirK*

Primeramente se utilizó columna empaquetada con resina DEAE Sepharosa Fast Flow y se trabajó con tampón de equilibrado 10 mM de Tris-HCl a pH 8. Luego de la siembra del extracto soluble, previamente dializado, se procedió al lavado con dos volúmenes de columna del mismo tampón. La elución de la proteína se realizó con gradiente salino de NaCl (0-300 mM) en 10 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían *BjNirK* se distinguían por su color azul y fueron concentradas en *Amicon*® y sembradas en columna Superdex 200 equilibrada con un tampón 150 mM NaCl -50 mM PBS a pH 6. La elución se realizó a un flujo de 0.5 mL/min. La enzima purificada se dializó contra tampón 50 mM de Tris-HCl a pH 7.4, se concentró y almacenó en freezer a -80 °C hasta su uso.

III.3.3.4- Purificación de *BjCitC₅₅₀*

Primeramente se utilizó columna empacada con resina SP Sepharosa Fast Fflow utilizando como tampón de equilibrado 5 mM de PBS a pH 6. Dado que la proteína interacciona con muy baja afinidad, la elución de la misma se realizó con 500 mM NaCl- 5 mM PBS a pH 6 en un volumen de columna. Las fracciones que contenían *BjCitC₅₅₀*, que se distinguían por su color naranja, fueron concentradas en *Amicon*® y posteriormente sembradas en una columna Superdex 200 equilibrada con un tampón 150 mM NaCl - 50 mM PBS a pH 6. La elución en este paso cromatográfico se realizó a un flujo de 0.5 mL/min. La proteína purificada se dializó contra el mismo tampón, se concentró y se almacenó a -80 °C.

III.4- Métodos espectroscópicos

III.4.1- Espectroscopía de absorción UV-vis

La espectroscopía de absorción UV-vis fue utilizada como herramienta de rutina durante la purificación de proteínas, para el estudio de sus propiedades espectroscópicas, en ensayos cinéticos, en la cuantificación de proteínas y su contenido de cobre y para el seguimiento del crecimiento de microorganismos midiendo la OD₆₀₀. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente con un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu.

III.4.2- Espectroscopía de EPR

Las mediciones de EPR se realizaron en banda X en un espectrómetro Bruker EMX Plus equipado con una cavidad de alta sensibilidad (HSW10819 model) y un criostato de flujo continuo

para nitrógeno. Todas las muestras fueron preparadas en una mezcla de tampones MES/CAPS/Tris-HCl a pH requerido, cada uno a una concentración de 150 mM, con una concentración de proteínas de ~200 µM. Los espectros fueron adquiridos en condiciones no saturantes y con los siguientes parámetros experimentales: frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación; 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K. Los fundamentos de la técnica de EPR así como detalles técnicos del equipo se pueden consultar en el Anexo II de esta tesis.

III.4.2.1- Simulación de espectros de EPR

Las simulaciones de los espectros de EPR en las diferentes condiciones de trabajo se realizaron utilizando el programa EasySpin del entorno Matlab® (<https://www.easyspin.org/>). Los espectros fueron simulados asumiendo el Hamiltoniano de espín:

$$\hat{H} = \mu_B \mathbf{B} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{\mathbf{S}}$$

donde, el primer y segundo término corresponden a las interacciones Zeeman e hiperfina, respectivamente, μ_B es el magnetón de Bohr, \mathbf{B} es el campo magnético externo, $\hat{\mathbf{S}}$ e $\hat{\mathbf{I}}$ son los operadores del espín electrónico y nuclear, respectivamente, \mathbf{g} y \mathbf{A} son matrices de dimensión 3×3. En los casos donde los espectros consistieron de la superposición de las señales de EPR de distintos centros metálicos, cada componente espectral fue simulada individualmente y normalizada mediante doble integración, procedimiento que permitió calcular la proporción de cada componente espectral en el espectro resultante.

III.4.2.2- Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por EPR

La reducción controlada y posterior reacción con sustrato monitoreada por EPR se llevó a cabo bajo atmósfera de argón. Tanto las muestras de proteínas como las soluciones de reductores (ácido ascórbico y ditionito de sodio) y sustrato fueron preparadas en una solución de mezcla de tampones MES/CAPS/Tris-HCl cada uno a una concentración de 150 mM y mantenidas bajo atmósfera de argón hasta su uso. El rango de concentraciones de las soluciones de ácido ascórbico, ditionito de sodio y nitrito de sodio fue de 50 a 100 mM según requerimiento. La adición de reductores y sustrato en las soluciones de proteínas (~200 µM) fue realizada utilizando jeringas *gas-tight* Hamilton asegurando las condiciones anaeróbicas. Luego de cada agregado la mezcla de reacción fue homogenizada, congelada en nitrógeno líquido y almacenada en esas condiciones hasta su medición.

III.5- Métodos electroquímicos

Los ensayos electroquímicos (voltametría cíclica y cronoamperometría) se realizaron utilizando un sistema convencional de tres electrodos en una celda de vidrio. El sistema de detección consistió en un electrodo de platino que fue empleado como contra electrodo y un electrodo de referencia de Ag/ClAg saturado (197 mV vs. SHE a temperatura ambiente). Un electrodo de disco de

oro se utilizó como electrodo de trabajo con un radio nominal de 0.8 mm y una superficie efectiva de 0.0195 cm^2 . El mismo fue pulido con suspensión de alúmina de diferentes tamaños de partícula (1, 0.3 y $0.05 \text{ }\mu\text{m}$), y luego sonificado en agua milliQ. El electrodo pulido fue inmerso en una solución 1 mM de 4,4'-ditiopiridina por unos pocos minutos. Este compuesto actúa como promotor en la interacción proteína- electrodo. Luego $2 \text{ }\mu\text{L}$ de una solución de *SmPaz* o *BjCitc*₅₅₀ de aproximadamente 0.7 mM fue depositada en el extremo del electrodo pulido aplicando posteriormente una pieza de membrana de diálisis (*cut off* de 3.5 kDa). La membrana fue sostenida con un anillo de goma (*O-ring*) colocado alrededor del cuerpo del electrodo, de esta forma se logró obtener una capa delgada y uniforme de proteína atrapada en la superficie del mismo. Esta construcción permite que pequeños iones difundan a través de la membrana manteniendo la enzima próxima a la superficie del electrodo impidiendo su difusión al seno de la solución electrolítica [61]. Todos los ensayos se realizaron en una solución electrolítica que consistía en una mezcla de tampones MES/CAPS/Tris-HCl a pH 6 cada uno a una concentración de 30 mM con 0.1 M de NaCl como electrolito soporte. Para los ensayos realizados con *BjCitc*₅₅₀ a la solución electrolítica se adicionó 500 mM de glicina para incrementar la afinidad de la proteína hacia la superficie del electrodo. Se trabajó siempre manteniendo baja la concentración de oxígeno disuelto mediante burbujeo con argón en todas las soluciones utilizadas, en agitación constante y a temperatura ambiente. Todos los reactivos y tampones utilizados fueron de grado analítico (Sigma) y se prepararon utilizando agua milliQ con una resistividad de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Todos los potenciales son referidos al electrodo estándar de hidrógeno (SHE).

Mediante voltametría cíclica se realizó la caracterización electroquímica de *SmPaz* y *BjCitc*₅₅₀ variando el potencial a diferentes velocidades de barrido ($5 \text{ mV/s} < \nu < 100 \text{ mV/s}$). Los voltamogramas obtenidos de cada dador electrónico y del ensayo cinético *SmPaz-SmNirK* se realizaron a una ν de 10 mV/s . En los ensayos cinéticos realizados mediante cronoamperometría se trabajó a potencial constante (100 mV) adicionando de manera secuencial cantidades iguales de solución de sustrato y registrando la corriente faradaica proporcionada por el par dador electrónico-NirK.

En el anexo III se detallan los conceptos fundamentales de electroquímica y de las técnicas utilizadas en este trabajo requeridos para la interpretación de los resultados.

III.6- Métodos cinéticos. Ensayos de actividad enzimática

III.6.1- Modelo linealizado de Michaelis-Menten: gráficos de Hanes-Woolf

El gráfico $[S]/v$ vs $[S]$ (Figura 12), también denominado gráfico de Hanes-Woolf [62], permite el cálculo de parámetros cinéticos mediante la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1). En esta ecuación $[S]$ es la concentración de sustrato, v es la velocidad inicial de consumo de sustrato, V_M es la velocidad máxima y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Tal y como se observa en la gráfica y a partir de la ecuación se define a la ordenada al origen como K_M/V_M y la pendiente como la inversa de V_M . La intersección de la recta con el eje x corresponde a $-K_M$.

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} \quad (\text{Ecuación 1})$$

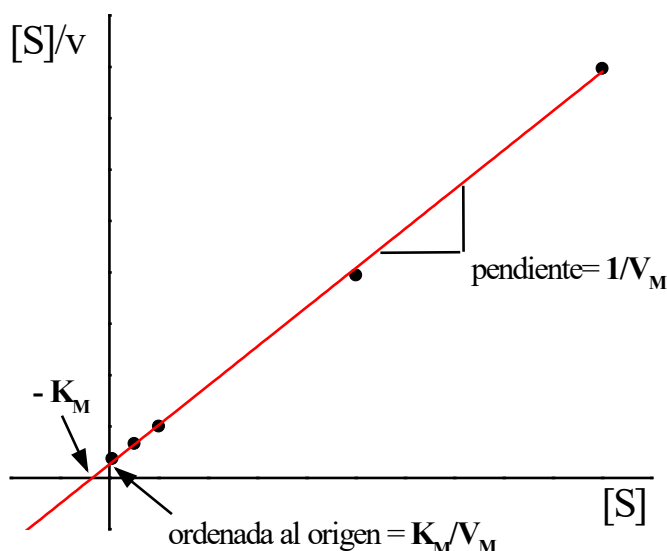


Figura 12. Gráfico de Hanes obtenido a partir de la linealización de la ecuación de Michaelis- Menten (Ecuación 1).

III.6.2- Método continuo

La actividad enzimática de tanto *SmNirK* como de *BjNirK* frente a sus respectivos dadores electrónicos se evaluó mediante un ensayo cinético continuo de estado estacionario.

Para el estudio de *SmNirK*, el ensayo consistió en monitorear espectrofotométricamente a 597 nm la oxidación de *SmPaz* en presencia de *SmNirK* y nitrito. Brevemente, una solución que contiene una mezcla de *SmNirK* y *SmPaz* preparada en una mezcla de tampones MES/CAPS/Tris-HCl a pH 6 cada uno a una concentración de 30 mM fue reaccionada con una solución 50 mM de ditionito de sodio hasta la reducción completa (Absorbancia 597 nm ~ 0). La reacción cinética fue iniciada mediante la adición de 20 µL de solución de nitrito con jeringa Hamilton *gas-tight*. La concentración final fue de 25 nM para *SmNirK*, 20 µM para *SmPaz* y NaNO₂ (0-0.5 mM), en un volumen final de 1050 µL. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante y bajo atmósfera de argón. Todas las soluciones de reactivos fueron preparadas en la misma mezcla tampón y burbujeadas con argón antes de su uso para minimizar la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción. Los parámetros cinéticos de este ensayo fueron obtenidos a partir de una curva realizada a partir de 5 repeticiones para cada uno de las concentraciones de sustrato.

Para verificar si la presencia del reductor en el medio de reacción interfería en la reacción cinética se logró obtener una solución de *SmPaz* reducida sin la presencia del reductor. Para ello, una solución de *SmPaz* concentrada fue reducida con cantidades mínimas de solución 50 mM de ditionito de sodio hasta obtener solución incolora. El reductor se separó de la proteína utilizando una columna PD-10 *desalting* (GE-Healthcare). Todas las soluciones fueron preparadas en una mezcla de tampones

MES/CAPS/Tris-HCl a pH 6 cada uno a una concentración de 30 mM y mantenidas bajo atmósfera de argón hasta su uso. Durante la reducción de *SmPaz* y el uso de la columna PD-10 se trabajó bajo atmósfera de argón para minimizar la presencia de oxígeno. La solución de *SmPaz* fue cuantificada por espectroscopía de absorción UV-vis previa oxidación con solución concentrada de $K_4Fe(CN)_6$ y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}C$ hasta su uso. El ensayo cinético con *SmPaz* reducida se realizó siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito pero sin el agregado de reductor.

El ensayo para *BjNirK* se realizó de un modo similar al descrito para *SmNirK*. En este ensayo se monitoreó la oxidación de *BjCitc*₅₅₀ siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon_{550nm} = 15.3\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 920 μL , a temperatura ambiente y con agitación continua. La mezcla de reacción consistió de 3 μM de *BjCitc*₅₅₀, 30 nM de *BjNirK* y NaNO_2 (0-1 mM). La reacción se inició con el agregado de 20 μL de solución de NaNO_2 y se utilizó la misma mezcla de tampones usada en el ensayo de *SmNirK*. Dado que el elevado costo de producción y el bajo rendimiento en la obtención de *BjCitc*₅₅₀, los parámetros cinéticos de este ensayo se obtuvieron a partir de una única curva, es decir no fue posible realizar repeticiones en la reacción para cada una de las concentraciones de sustrato.

III.6.3- Método discontinuo

La actividad enzimática de ambas NirK también se ensayó mediante un método cinético discontinuo utilizando metil viologeno (MV) como dador electrónico artificial. Para este ensayo se procedió según el protocolo previamente descrito [37, 63] pero con algunas modificaciones. El ensayo se inició con el agregado de 50 μL de dilución de enzima a una solución de MV (1.4 mM), ditionito de sodio (100 mM) y una concentración variable de NaNO_2 (0 – 4000 μM), en un volumen final de 250 μL . Todas las soluciones de cada uno de los componentes fueron preparadas en la mezcla tampón MES/CAPS/Tris-HCl 30 mM a pH 6. La reacción cinética en cada ensayo se llevó a cabo con 50 nM de *SmNirK* y 500 nM de *BjNirK*. Luego de 2.5 min de reacción, 25 μL de la solución fueron diluidos en la solución mezcla de tampones en un volumen final de 250 μL . La solución resultante fue agitada con vortex para oxidar el MV reducido y detener reacción. Posteriormente se procedió a cuantificar la concentración de sustrato remanente por el método colorimétrico midiendo la absorbancia a 540 nm. Para la reacción de color la solución fue reaccionada con 250 μL de una solución sulfanilamida al 1% (p/v) preparada en 3M de HCl y 250 μL de N-naftiletilendiamina al 10% (p/v). Al cabo de 10 min de reacción, se obtuvo una solución de color rosado estable y apto para la medición espectrofotométrica. El nitrito consumido fue determinado a partir de la concentración inicial en la solución de reacción usando una curva de calibrado que relaciona concentración de nitrito con absorbancia a 540 nm, la cual fue realizada bajo las mismas condiciones de reacción pero en ausencia de enzima.

IV- *Resultados y discusión*

IV.1- Caracterización de *Sm*NirK y *Bj*NirK

IV.1.1- Características moleculares

Tanto *Sm*NirK como *Bj*NirK en sus formas *as-purified* concentradas presentan un color verde y azul intenso, respectivamente (Figura 13). Ambas enzimas tienen una conformación estructural homotrimérica con subunidades de 42.5 kDa para *Sm*NirK y de 40 kDa para *Bj*NirK (Tabla 6, Figura 13). La relación cobre/proteína fue de 2 átomos de cobre por monómero para ambas enzimas (Tabla 6). Estos resultados están en línea con los obtenidos para las NirK aisladas de diferentes microorganismos (Tabla 1).

Tabla 6. Características estructurales y espectroscópicas (UV-vis y EPR) de *Sm*NirK y *Bj*NirK.

Nitrito reductasas (NirK)	<i>Sm</i> NirK	<i>Bj</i> NirK
Microorganismo	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
Color	verde	azul
Masa molecular de la subunidad (kDa)	42.5	40
Conformación estructural	trímero	
Átomos de Cu /monómero	2	
Espectro UV-vis	λ (nm) [ϵ ; mM ⁻¹ cm ⁻¹]	
	400; 456 [3,25]; 586 [2,93]; 700-800	458 [2.58]; 592 [4.41]; 700-800
Espectro de EPR	$g_{1,2,3}$; A// (mT)	
	2.190, 2.052, 2.023 ($g_2 \approx g_3$); 7.1 2.315, 2.070, 2.065 ($g_2 \approx g_3$); 15	2.192, 2.052, 2.021($g_2 \approx g_3$); 7.1 2.315, 2.074, 2.064 ($g_2 \approx g_3$); 14.5
Reacción con NO ₂ ⁻ T2Cu	2.307, 2.075, 2.035; 13.5	2.307, 2.085, 2.045; 13.3

IV.1.2- Caracterización espectroscópica

IV.1.2.1- Espectroscopía de absorción UV-vis

Como se puede observar en la Figura 13, los espectros de absorción UV-vis de *Sm*NirK y *Bj*NirK (espectros verde y azul respectivamente) a pH 6 se componen principalmente de las bandas de absorción ubicadas a ~ 600 y ~ 450 nm que caracterizan los espectros de las NirK (Figura 7). La primera se atribuye a la transición de TC (3p _{π})S(Cis) \rightarrow (d_{x²-y²})Cu²⁺ mientras que la banda a 450 nm se atribuye a (3p _{σ})S(Cis) \rightarrow (d_{x²-y²})Cu²⁺. En la Tabla 6 se detallan las λ de absorción y los ϵ para las λ_{\max} de las dos NirK. En el espectro de *Sm*NirK las dos bandas se ubican a los 586 nm y 456 nm, mientras que para *Bj*NirK se observan a los 592 nm y 458 nm. Para *Sm*NirK ambas bandas poseen intensidades similares, característico de las NirK verdes; mientras que para *Bj*NirK la banda a 592 nm presenta una mayor intensidad respecto de la banda a 458 nm, característico de las NirK azules. Los espectros presentan otra banda de absorción más ancha centrada a los 700-800 nm correspondiente a las

transiciones d-d y el espectro de *SmNirK* presenta además una banda de absorción ubicada a los 400 nm atribuida a la transición de TC que ocurre debido al enlace S(Met)-Cu.

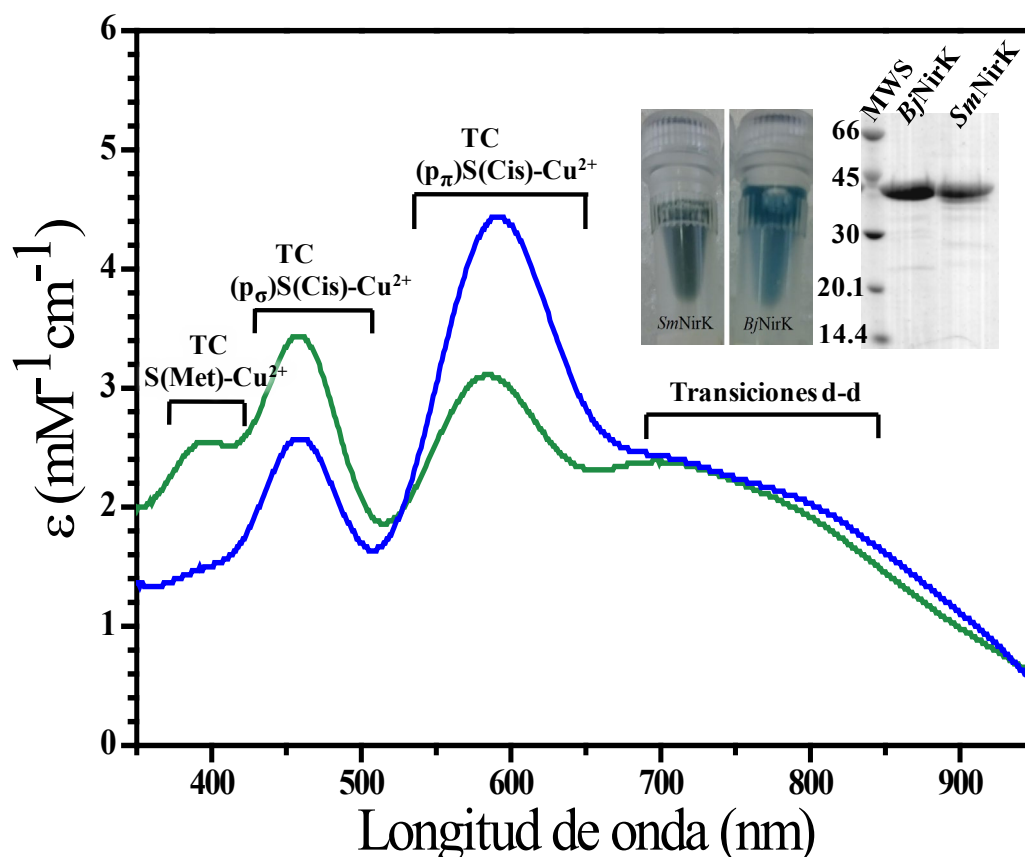


Figura 13. Espectros de absorción UV-vis de *SmNirK* (verde) y *BjNirK* (azul) a pH 6 en los que se encuentran indicadas las transiciones asignadas a cada banda de absorción (TC: transferencia de carga). Extremo superior derecho: *SmNirK* (verde) y *BjNirK* (azul) en la forma *as-purified* (~ 1mM). SDS-PAGE de ambas enzimas con marcadores de masa molecular comercial (Productos Biológicos- www.pb-l.com.ar) y sus respectivas masas moleculares en kDa.

IV.1.2.2- Espectroscopía de EPR

En la Figura 14 se presentan los espectros de EPR de ambas NirK a pH 6 junto con los espectros obtenidos a partir de las simulaciones. Los espectros de las dos proteínas están constituidos por dos señales superpuestas con simetría aproximadamente axial correspondientes a los centros T1Cu y T2Cu (espectro negro). Ambas señales presentan estructura hiperfina resuelta en la región del $g_{||}$ debido al núcleo de Cu ($I = 3/2$). En la figura se presentan los espectros en colores obtenidos a partir de las simulaciones de los espectros experimentales y en la Tabla 6 se resumen los parámetros relevantes de las simulaciones. Para las dos NirK las señales de los dos sitios se presentan con intensidades en una relación 1:1 y son consistentes con el estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ dado que se cumple $g_{||} > g_{\perp} > 2.0023$. Estas características espectrales son similares a las obtenidas en NirK aisladas de diferentes microorganismos (sección I.2.2).

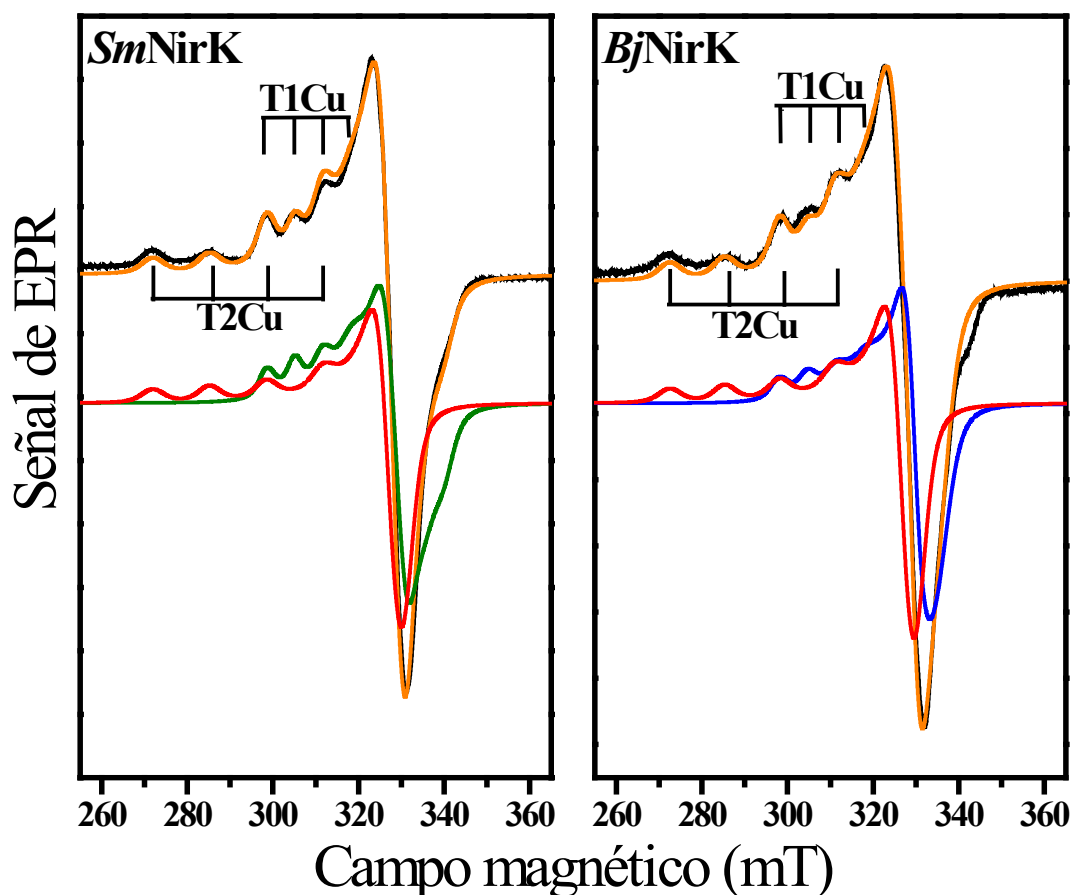


Figura 14. Espectros de EPR de *SmNirK* (izquierda) y *BjNirK* (derecha) con sus respectivas simulaciones. Negro: espectros experimentales, naranja: simulación T1Cu+T2Cu, verde: T1Cu de *SmNirK*, azul: T1Cu de *BjNirK* y rojo: T2Cu. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia de microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia de microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

IV.1.2.3- Influencia del pH en los espectros de absorción UV-vis y de EPR

Para las dos NirK se observa que los espectros de absorción UV-vis y las señales de EPR correspondientes al T1Cu no cambian notablemente con el pH del medio en el rango de 6 a 10. Estos resultados evidenciarían que en las cercanías de este sitio no ocurrirían equilibrios ácido-base que alteren la estructura electrónica de los sitios al modificar el pH. No obstante, la señal correspondiente al T2Cu en los espectros de EPR si presentan modificaciones a pH mayores a 8. Esto implicó que para obtener una buena simulación de los espectros a pH 10 (sección IV.6.2) fue necesario incluir dos componentes espectrales en la señal del T2Cu, situación diferente a las simulaciones de los espectros a pH 6 que solo contienen una única componente.

IV.1.2.4- Caracterización redox de los cofactores

Las propiedades redox de los cofactores de ambas NirK se estudió reaccionando las enzimas con agentes reductores como ácido ascórbico ($E^0 \sim 0$ mV) y ditionito de sodio ($E^0 \sim -400$ mV), y oxidantes como ferricianuro de potasio ($E^0 \sim +360$ mV). Estas reacciones fueron monitoreadas mediante espectroscopías de EPR (Figura 15, panel superior) y de absorción UV-vis (Figura 15, panel

inferior) a pH 6. Los espectros *a* de la figura corresponden a los espectros obtenidos a partir de las enzimas en su forma *as-purified*, tal como se presentan en la Figura 13 y 14. Al reaccionar ambas enzimas con ferricianuro de potasio no se observaron cambios en la intensidad de ninguno de los espectros, lo que indica que ambas proteínas en su forma *as-purified* contienen todos los átomos de cobre en la forma oxidada (Cu^{2+}). En la reacción con agentes reductores, ambas NirK presentan el mismo comportamiento. El espectro obtenido al reaccionar las enzimas con ácido ascórbico (espectros *b*) no presenta ninguna característica correspondiente al T1Cu, lo que implica que el cobre de este centro está presente en su estado de oxidación diamagnético Cu^+ . En estos espectros pueden observarse que una pequeña fracción de la señal del T2Cu es aún detectable, indicando que este centro no fue reducido por completo. Estos resultados indican que los T1Cu de estas enzimas presentan $E^{0'}_{\text{T1Cu}}$ mayor que los $E^{0'}_{\text{T2Cu}}$, en línea con los valores de $E^{0'}$ de *SmNirK* ($E^{0'}_{\text{T1Cu}} = 224 \text{ mV}$ y $E^{0'}_{\text{T2Cu}} = 108 \text{ mV}$, ambos *vs.* SHE) determinados mediante titulaciones espectro-potenciométricas [38]. La reducción completa de ambos centros de Cu en las dos proteínas se logró mediante el agregado de ditionito de sodio (espectros *c*). El comportamiento descrito frente a estos agentes reductores es similar al caracterizado para otras NirK bajo las mismas condiciones de reacción [29, 54, 59]. Dado que *BjNirK* presenta un comportamiento comparable al obtenido en otras NirK, los $E^{0'}$ de sus centros de cobre están en el orden de los calculados para *SmNirK* y otras NirK (Tabla 1).

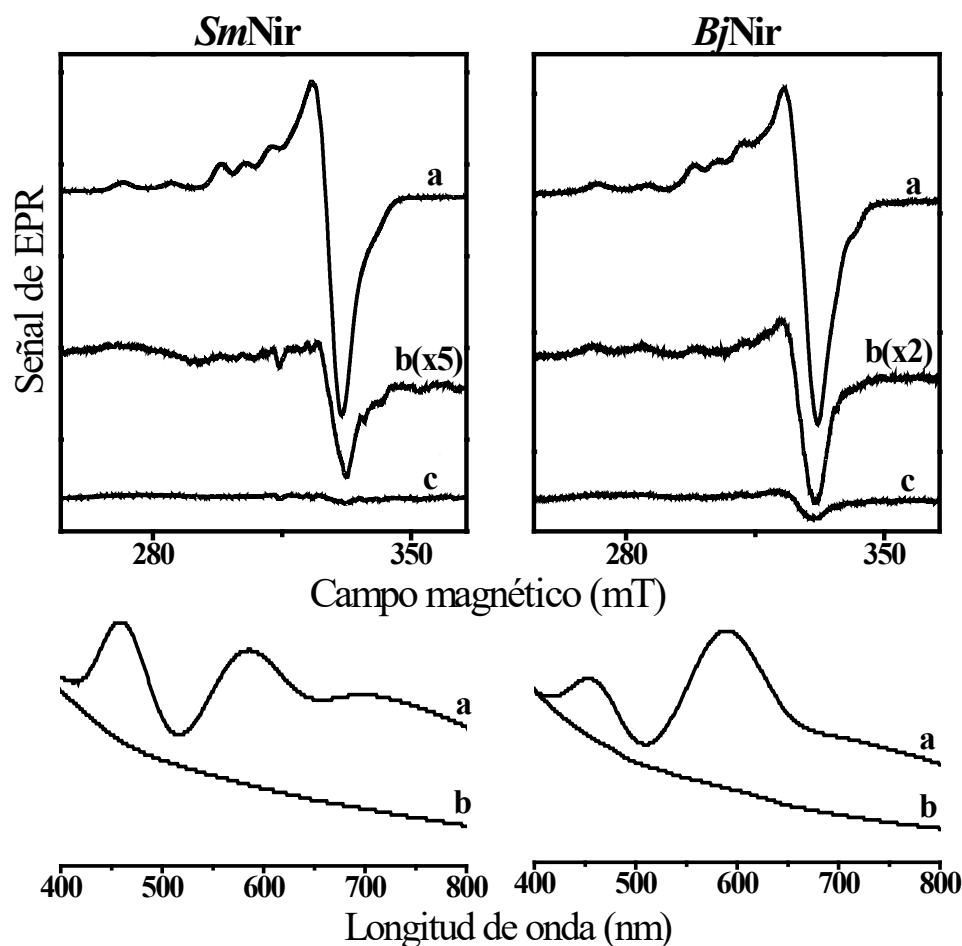


Figura 15. Panel superior: espectros de EPR de *SmNirK* (izquierda) y *BjNirK* (derecha). a- NirK *as-purified*, b- NirK + ácido ascórbico y c- NirK + ditionito de sodio. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K. Panel inferior: espectros de absorción UV-vis de *SmNirK* (izquierda) y *BjNirK* (derecha). a- NirK *as-purified* y b- NirK + ácido ascórbico.

IV.1.2.5- Reacción con sustrato monitoreada por EPR

La Figura 16 muestra los espectros de EPR (panel superior) y de absorción UV-vis (panel inferior) a pH 6 al reaccionar *SmNirK* y *BjNirK* con nitrito. En el panel superior de la figura, los espectros *a* corresponden a los espectros de las enzimas en su forma *as-purified* y los espectros *b* se obtienen luego de reaccionar las enzimas con nitrito. Estos espectros son presentados con las respectivas simulaciones en diferentes colores y cuyos parámetros relevantes se presentan en la Tabla 6. Ambas enzimas presentan una disminución del g_{\parallel} y A_{\parallel} en la señal T2Cu, estas modificaciones se atribuyen a la interacción T2Cu-NO₂⁻. Cambios similares han sido reportadas en la reacción con sustrato de otras NirK [29, 54]. En los espectros *b* de EPR no se observan modificaciones en las señales del T1Cu, sus parámetros de simulación son similares al T1Cu de la enzima *as-purified*. Los espectros *d* se obtienen a partir de la oxidación de las enzimas, previamente reducidas con ditionito de sodio (espectro *c*), al reaccionarlas con nitrito. Estos espectros se recuperan con modificaciones en la señal T2Cu debido al exceso de sustrato en el medio de reacción. Es importante notar que en este

último espectro se recupera la señal correspondiente a los dos sitios, dado que el T2Cu es oxidado debido a la reducción del sustrato y el T1Cu debido a la TE que ocurre entre los dos sitios.

Los espectros de absorción UV-vis presentados en el panel inferior de la Figura 16 corresponden a la misma secuencia de reacciones presentada en el panel superior. En este caso el espectro recuperado luego de reaccionar con nitrito (espectro *c*) la enzima previamente reducida (espectro *b*), no presenta modificaciones respecto al espectro de la enzima *as-purified* (espectro *a*). Esto sugiere que el sustrato no interacciona con el sitio T1Cu, en línea con los resultados obtenidos en el panel superior de la figura.

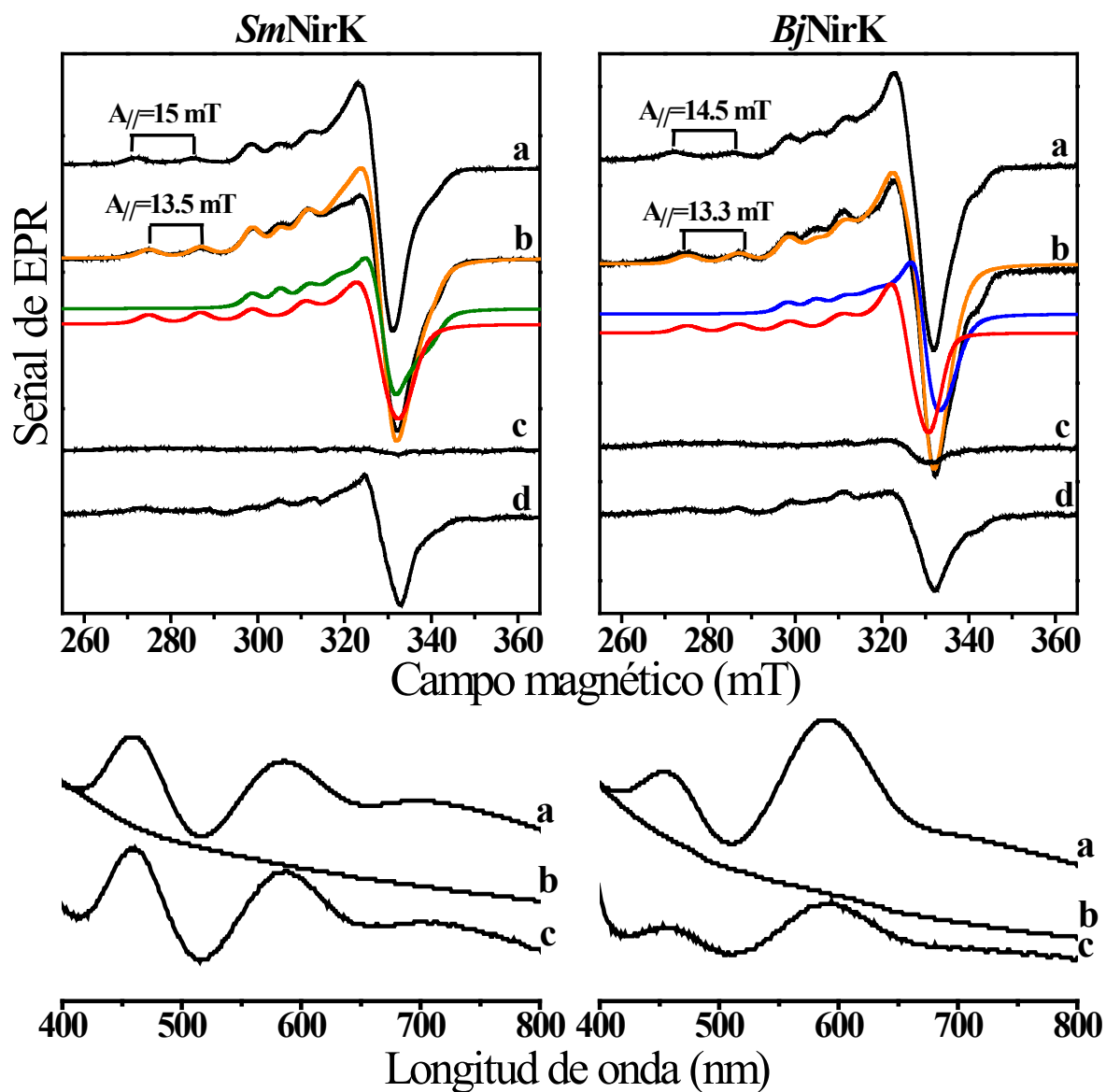


Figura 16. Reacción con sustrato monitoreada por espectroscopía de EPR (panel superior) y de absorción UV-vis (panel inferior) de *SmNirK* (izquierda) y *BjNirK* (derecha). Panel superior: a- NirK *as-purified*, b- NirK + nitrito de sodio, c- NirK + ditionito de sodio y d- idem c + nitrito de sodio. En colores se presentan simulaciones obtenidas de los espectros b. Naranja: simulación T1Cu + T2Cu, verde: T1Cu de *SmNirK*, azul: T1Cu de *BjNirK* y rojo: T2Cu. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K. Panel inferior: a- NirK *as-purified*, b- NirK + ditionito de sodio y c- idem b + nitrito de sodio.

IV.2- Caracterización de los dadores electrónicos fisiológicos de *SmNirK* y *BjNirK*

IV.2.1- Caracterización molecular de *SmPaz*

SmPaz en su forma *as-purified* concentrada presenta un color azul intenso (Figura 17). Mediante cromatografía de exclusión molecular se determinó una masa molecular de ~16 kDa, mientras que por SDS-PAGE se observa una masa molecular cercana a los 13 kDa (Figura 17). Estos resultados indican que *SmPaz* presenta una conformación molecular monomérica (Tabla 7) en las condiciones de trabajo. La relación cobre/proteína determinada fue de 1 átomo de cobre por proteína. Estos resultados están en línea con los obtenidos para Paz extraídas de otros microorganismos [64 - 67].

Tabla 7. Características moleculares, espectroscópicas (UV-vis y EPR) y electroquímicas de *SmPaz* y *BjCitc₅₅₀*.

Dadores electrónicos fisiológicos	<i>SmPaz</i>	<i>BjCitc₅₅₀</i>
Masa molecular (kDa) de subunidad; conformación molecular	16; monómero	14; dímero
Espectro UV-vis	λ de absorbancia (nm) [ϵ ; mM ⁻¹ cm ⁻¹]	
	460 [2,25]; 597 [5,12]; 700-800	Proteína oxidada: 410, 525[15] Proteína reducida: 413,520 y 550 [15.3]
Espectro de EPR	$g_{1,2,3}$; A ₁ , A ₂ , A ₃ (mT)	
	2.221, 2.060, 2.019; 3.5, 0.9, 6.9	--
E ⁰ (mV) vs SHE	278	~270

IV.2.2- Espectroscopía de absorción UV-vis y EPR de *SmPaz*

Al igual que los espectros anteriormente descriptos para las NirK, el espectro de absorción UV-vis de *SmPaz* a pH 6 también presenta las dos bandas de absorción características de los centros T1Cu correspondiente a las transiciones de TC (3p _{π})S(Cis)→(d_{x²-y²})Cu²⁺ y (3p _{σ})S(Cis)→(d_{x²-y²})Cu²⁺. En el espectro mostrado en la Figura 17, estas bandas se posicionan a los 597 y 460 nm, respectivamente. La primer banda presenta una intensidad mayor que la segunda, siendo la relación de intensidad de ~2 (Tabla 7). En estos espectros la relación de intensidades entre la banda de absorción a 280 y 597 nm fue siempre ~1, este parámetro se utilizó en las sucesivas purificaciones para corroborar el contenido de Cu en la proteína. En el espectro también se observa una banda de absorción a ~750 nm correspondiente a la superposición de las bandas de absorción de las transiciones d→d. Espectros similares fueron observados para Paz extraídas de otros microorganismos [67].

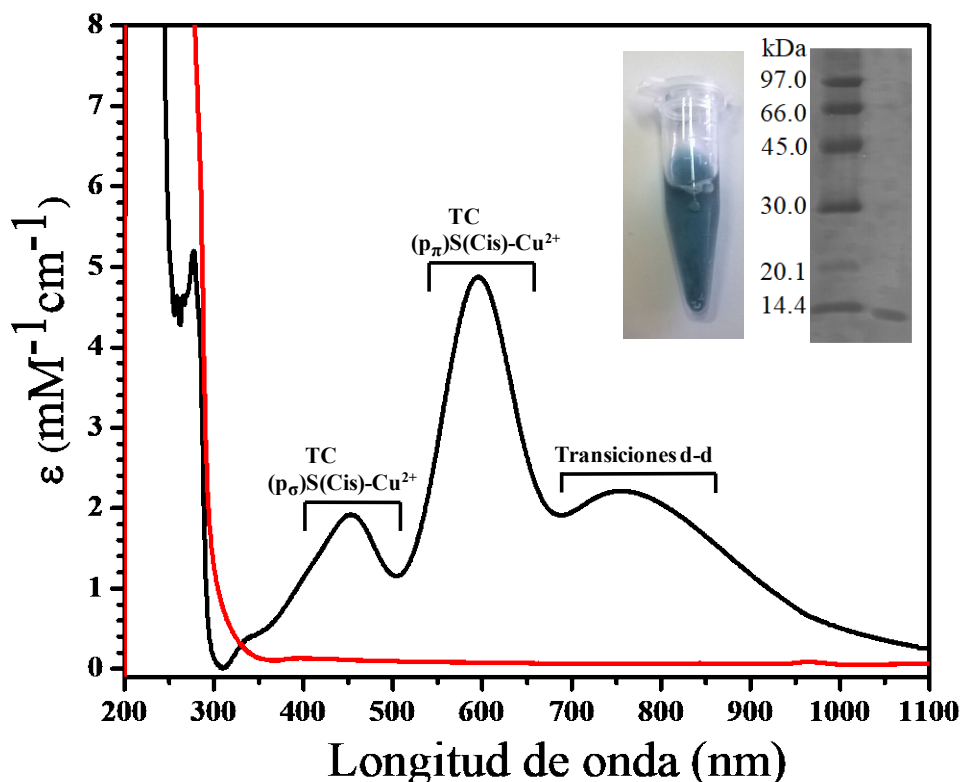


Figura 17. Espectro de absorción UV-Vis de *SmPaz* a pH 6. Negro: enzima *as-purified*, rojo: *SmPaz* + ditionito de sodio. En el espectro de la proteína *as-purified* se indican las transiciones asignadas a cada banda de absorción. Extremo superior derecho: *SmPaz* en su forma *as-purified* (~ 1mM). SDS-PAGE con marcadores de masa molecular comercial (Productos Biológicos- www.pb-l.com.ar) y sus respectivas masas moleculares en kDa.

En la Figura 18 se muestra el espectro de EPR de *SmPaz* a pH 6, el cual presenta simetría rómbica con estructura hiperfina resuelta en g_1 y g_3 . Los parámetros relevantes obtenidos en la simulación son presentados en la Tabla 7. Con el agregado de agentes reductores como ácido ascórbico o ditionito de sodio se logró reducir completamente el T1Cu (espectro *b*), lo que también se puede observar en los espectros de absorción UV-vis (Figura 17, espectro rojo). Este comportamiento está en línea con lo previamente descripto para *SmNirK*, indicando que el valor del potencial de reducción del sitio T1Cu de *SmPaz* sería del mismo orden que los reportados para *SmNirK* y otras Paz (Tabla 1), esto es en el rango 0- 300 mV.

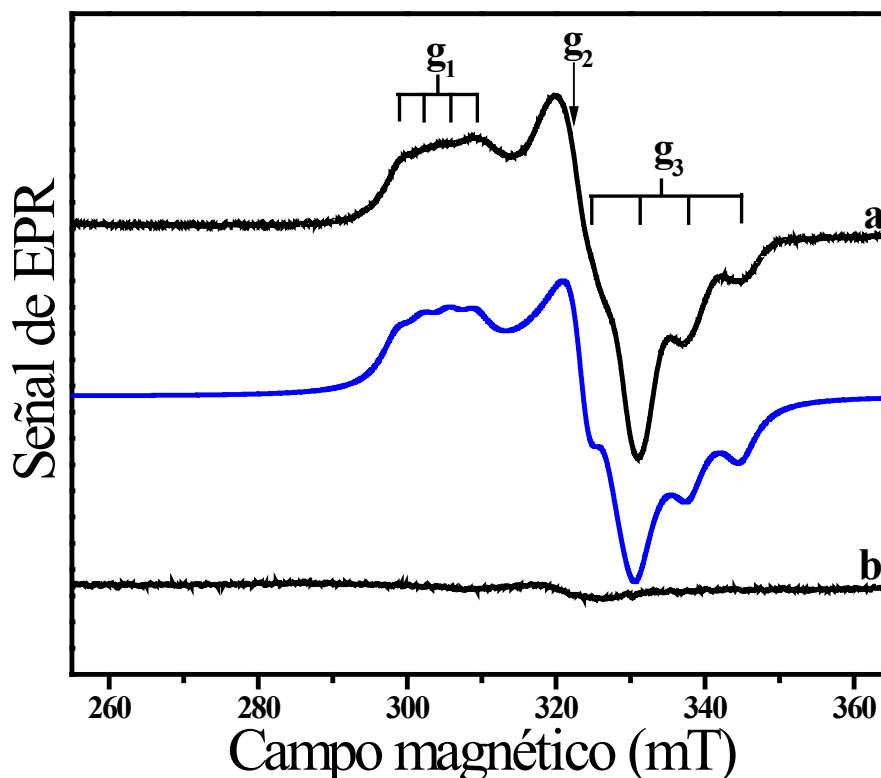


Figura 18. Espectros de EPR. a- *SmPaz as-purified* (negro) y su respectiva simulación (azul), b- *SmPaz* + ácido ascórbico. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia: 9.45 GHz, Campo de modulación: 100 kHz, amplitud demodulación: 2 Gpp, potencia de microondas: 0.2 mW y temperatura 60 K.

IV.2.3- Caracterización molecular de *BjCitc*₅₅₀

La purificación de *BjCitc*₅₅₀ dio como resultado una proteína de color rojo (Figura 19) con una masa molecular de 27 kDa calculada mediante cromatografía de exclusión molecular y una subunidad con una masa de ~14 kDa en SDS-PAGE, confirmando la conformación homodimérica de la proteína (Tabla 7).

IV.2.4- Espectroscopía de absorción UV-vis de *BjCitc*₅₅₀

La Figura 19 muestra el espectro de absorción UV-vis de *BjCitc*₅₅₀ en distintas condiciones. La forma *as-purified* (espectro rojo) presenta un espectro de absorción característico de los citocromos *c* reducidos (sección I.2.3) donde las bandas alfa (550 nm) y beta (521 nm) son claramente visibles. El hecho que *BjCitc*₅₅₀ en la forma *as-purified* permanezca reducido en presencia de O_{2(g)} es posible debido al elevado potencial de reducción de este tipo de citocromos. El espectro de la forma oxidada (espectro negro) fue adquirido luego de reaccionar *BjCitc*₅₅₀ con *BjNirK*, en relación de concentraciones 100:1 y en presencia de nitrito. Este espectro presenta un ligero desplazamiento hipsocrómico de la banda de Soret respecto de la forma reducida y una única banda a los 525 nm, característica típica del estado férrico del grupo hemo en esta clase de citocromos.

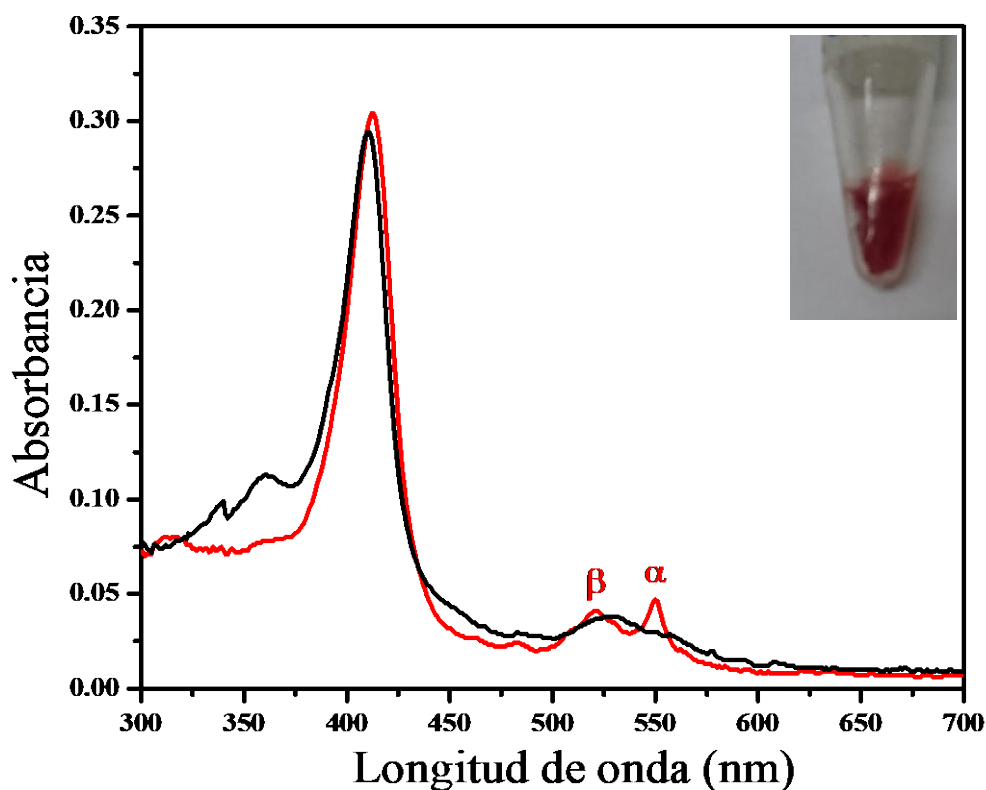


Figura 19. Espectro de absorción UV-vis de *BjCitc₅₅₀* a pH 6 en sus formas *as-purified* (rojo) y oxidada (negro). Extremo superior derecho. *BjCitc₅₅₀* *as-purified* concentrado (~ 0.5 mM).

IV.2.5- Caracterización electroquímica de *SmPaz* y *BjCitc₅₅₀*

La caracterización electroquímica de los dadores electrónicos se realizó mediante voltametría cíclica. Los voltamogramas obtenidos presentan una respuesta reversible caracterizada por un pico catódico (*pc*) y otro anódico (*pa*) definidos, lo que permitió calcular el E^0 para cada una de las proteínas (**anexo III**). Para *SmPaz* se obtuvo un E^0 de +278 mV y para *BjCitc₅₅₀* de +270 mV. El valor obtenido para *SmPaz* está en línea con el obtenido para las Paz de otras bacterias (Tabla 1). Dado que la interacción electrodo-*SmPaz* resultó estable durante los sucesivos ciclos de variación de potencial, fue posible realizar estudios variando la velocidad de barrido (v) (Figura 20). El rango de v trabajado fue de 5 a 100 mVs^{-1} y se obtuvieron dos comportamientos definidos. A bajas velocidades ($v < 50 \text{ mVs}^{-1}$) la intensidad de corriente faradaica de los picos (i_p) presentó una correlación lineal con la velocidad de barrido, correspondiente a un comportamiento de capa fina. Para velocidades de barrido elevadas ($v > 50 \text{ mVs}^{-1}$) la i_p varió linealmente con la raíz cuadrada de la misma, típico de un sistema controlado por la difusión limitado por procesos de transferencia de masa. El ancho de la altura media de la señal tanto para el pico catódico como para el anódico fue cercano a 90 mV en todo el rango de velocidades de barrido ensayado, indicando un proceso reversible de un electrón [68]. Similares resultados fueron obtenidos utilizando un electrodo de grafito pirolítico (HOPG) de corte basal donde la interacción de *SmPaz* con este electrodo no requirió un promotor de la adsorción como por ejemplo neomicina o polimixina.

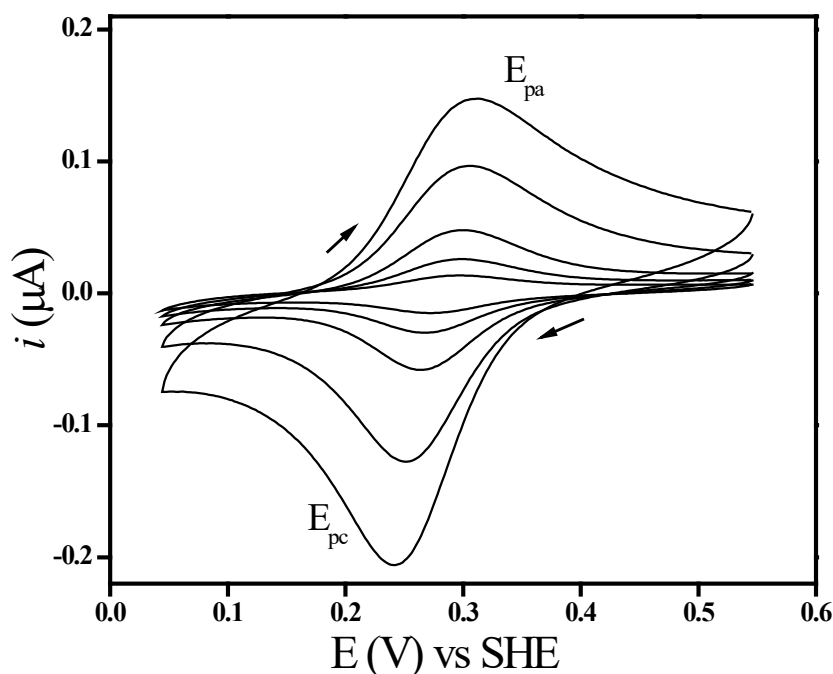


Figura 20. Voltametría cíclica de *SmPaz* para diferentes ν ($5 < \nu < 100 \text{ mVs}^{-1}$). Las flechas indican la dirección del barrido del potencial. E_{pc} : potencial del pico catódico, E_{pa} : potencial del pico anódico.

Contrariamente a lo observado para *SmPaz*, la interacción electrodo-*BjCit*₅₅₀ no resultó estable durante los sucesivos ciclos de barrido de potencial (Figura 21 A). Sin embargo, se logró mejorar la estabilidad de la interacción con el agregado de 500 mM glicina a la solución electrolítica (Figura 21 B). La mayor estabilidad se evidencia debido a que las i_p (catódicos y anódicos) no decaen abruptamente durante los sucesivos ciclos de barrido de potencial cuando se trabaja a ν constante. En estas condiciones, el valor de $E^{0'}$ obtenido resultó similar al ya reportado para ésta proteína [69] y muy cercano al obtenido para *SmPaz* y citocromos *c* que actúan como dadores de electrones de las NirK (Tabla 1).

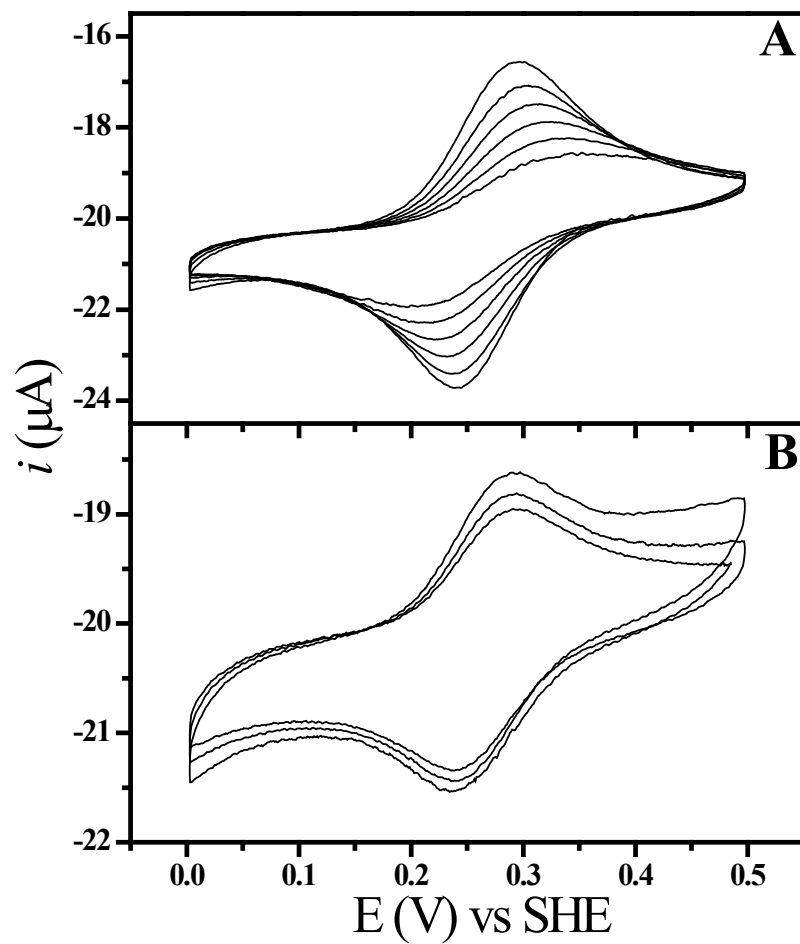


Figura 21. Voltametría cíclica de *BjCitc*₅₅₀ a $\nu = 10 \text{ mVs}^{-1}$. A-Voltamograma obtenido sin glicina y B-Voltamograma obtenido con 500 mM glicina.

IV.3- Caracterización de la interacción de *SmNirK* y *BjNirK* con los dadores electrónicos

La habilidad de *SmPaz* y *BjCitC550* para actuar como dadores electrónicos de las respectivas NirK se evaluó en primera instancia mediante ensayos electroquímicos (sección III.5). Notar que para ambas NirK todos los intentos para obtener señales (corrientes faradaicas) de electroquímica directa, es decir sin la participación del dador electrónico fisiológico, resultaron improductivos. En otras palabras, no fue posible lograr la interacción y/o la TE directa de las NirK con la superficie del electrodo aún probando diferentes compuestos como promotores de la adsorción. Idéntico comportamiento se obtuvo con un electrodo HOPG con corte basal.

Las cinéticas de reacción de las NirK-dadores electrónicos se caracterizaron mediante dos ensayos cinéticos de estado estacionario, un ensayo continuo utilizando los respectivos dadores electrónicos fisiológicos y un ensayo discontinuo utilizando un dador electrónico artificial.

IV.3.1- Ensayos electroquímicos

IV.3.1.1- Transferencia electrónica de *SmPaz*→*SmNirK*

En la Figura 22 A se muestran los ensayos de voltametría cíclica realizados con *SmPaz* y *SmNirK* en presencia de nitrito. El voltamograma *a* de la figura se obtuvo con *SmPaz* en ausencia de *SmNirK*, el mismo presenta características similares a los voltamogramas mostrados en la Figura 20 realizados en ausencia de nitrito. Estos resultados indican que *SmPaz* por sí sola no es capaz de transferir electrones al sustrato, es decir, catalizar la reducción del nitrito. Los voltamogramas *b* y *c* de la figura se obtuvieron con ambas proteínas confinadas en la superficie del electrodo y en diferentes relaciones de concentración. Estos voltamogramas exhiben una forma sigmoideal con aumento de corriente faradaica catalítica (i_{cat}) al incrementar la concentración de *SmNirK*. Los voltamogramas obtenidos con ambas proteínas pero en ausencia nitrito (datos no mostrados) no presentan modificaciones en la i_{cat} , por lo que los cambios observados en los voltamogramas *c* y *d* son debido a la reducción del nitrito. Estas observaciones confirman a *SmNirK* como el componente catalítico del par de proteínas.

La Figura 22 B muestra la variación de la i_{cat} frente a diferentes concentraciones de nitrito de sodio ([S]) para una relación *SmPaz:SmNirK* cercana a 1:1. Los resultados muestran que al incrementar la [S] se produce un incremento en i_{cat} hasta la saturación, de esta forma los datos se ajustan al modelo de Michaelis-Menten. En la figura se presentan los resultados en una gráfica de Hanes-Woolf (sección III.6.1) y a partir del ajuste se obtuvo una constante cinética $K_M^{app} = 94(6) \mu M$ para este par de proteínas.

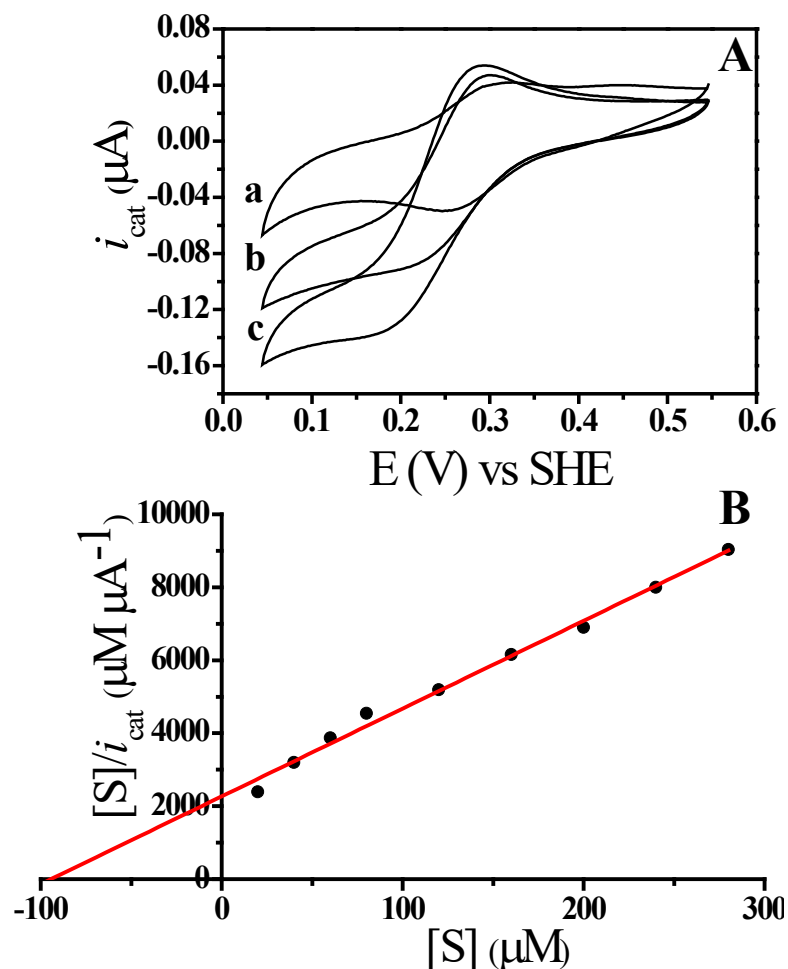


Figura 22. A- Voltametría cíclica del par *SmPaz-SmNirK* en presencia de NaNO₂ (1mM) a diferentes relaciones de concentración *SmPaz:SmNirK*. a- Sin *SmNirK*, b- 10:1, c- 10:5. B- Gráfica de $[S]/i_{cat}$ vs $[S]$ obtenida a partir de la variación de la i_{cat} frente a diferentes $[S]$ y relación *SmPaz:SmNirK* 1:1.

En los ensayos de cronoamperometría se observó un comportamiento similar al previamente descrito, la i_{cat} incrementó hasta la saturación frente a los sucesivos agregados de sustrato. En la Figura 23 A se presenta el cronoamperograma obtenido experimentalmente (negro) junto con los datos corregidos (rojo) para compensar la pérdida del film electroactivo debido a inactivación de la enzima y/o pasivación del electrodo [70] y en la Figura 23 B se presenta la gráfica $[S]/i_{cat}$ en función de la $[S]$ con el ajuste de los datos para los dos cronoamperogramas (los colores se corresponden con la figura A).

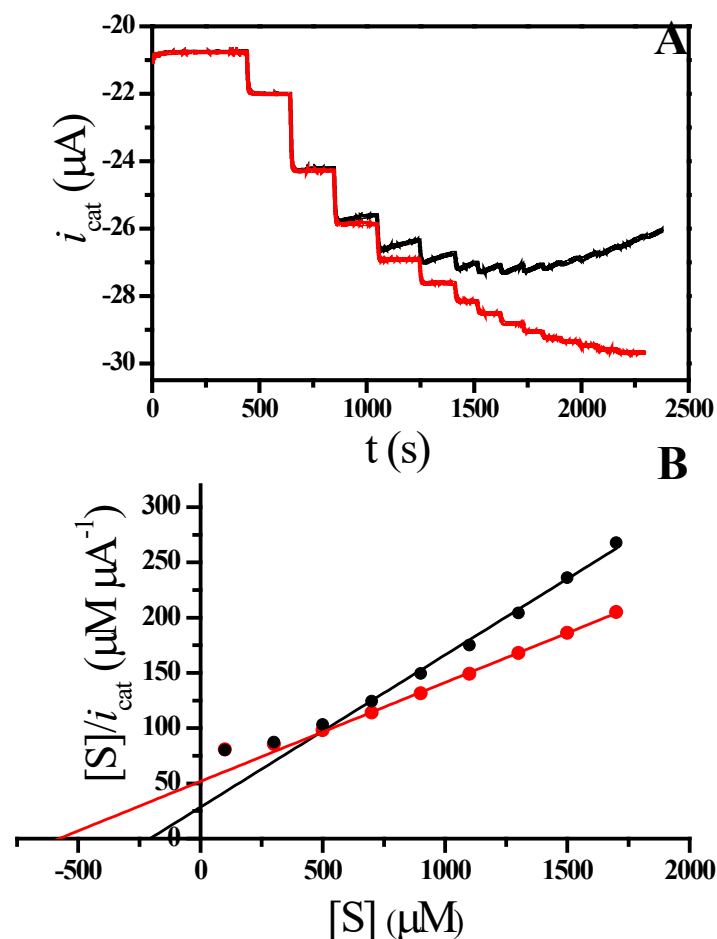


Figura 23. Cronoamperometría del par *SmPaz-SmNirK*. Negro: datos experimentales, rojo: datos experimentales corregidos. A- Cronoamperograma del par *SmPaz-SmNirK* en una relación de concentraciones 10:1. El potencial del electrodo aplicado es de 100 mV vs SHE. B- $[S]/i_{\text{cat}}$ vs $[S]$ obtenida a partir de la variación de la i_{cat} frente a sucesivos agregados de sustrato.

Dos fenómenos que afectan la cinética de reacción en los ensayos electroquímicos se ponen en evidencia a partir de los resultados obtenidos por cronoamperometría. A bajas concentraciones de sustrato ($[S] < 500 \mu\text{M}$) los procesos de transferencia de masa presentan una marcada influencia en la velocidad global de reacción. Esto se evidencia en la Figura 23 B dado que se observa desviación a la linealidad para los puntos experimentales obtenidos a bajas $[S]$ debido a la reducción de la i_{cat} . A elevadas concentraciones de sustrato ($[S] > 500 \mu\text{M}$) la disminución de la i_{cat} (Figura 23 A, cronoamperograma negro) se atribuye a la inactivación del film electroactivo, uno de los inconvenientes que se presenta de manera habitual al trabajar con films de proteínas confinadas en la superficie de un electrodo. Estos procesos de inactivación provocan decaimiento de las i_{cat} en el tiempo, que se hace más notorio al incrementar la $[S]$. De esta manera, los parámetros cinéticos (K_M y k_{cat}) obtenidos a partir de los datos experimentales resultan inferiores. A partir de la corrección de los datos experimentales (Figura 23 A y B, datos en rojo) fue posible obtener un $K_M^{\text{app}} = 580(20) \mu\text{M}$ para este par de proteínas.

En los ensayos de voltametría cíclica (Figura 22), los sucesivos ciclos de barrido del potencial aplicados contribuyen aún más a la pérdida del film electroactivo. Esto se evidencia experimentalmente dada la deformación observada en los voltamogramas frente a las diferentes concentraciones de sustrato (datos no mostrados). Para estas técnicas no hay disponibles metodologías para eliminar los efectos de inactivación del film electroactivo, esto explica el K_M^{app} inferior al obtenido a partir de los ensayos de cronoamperometría.

IV.3.1.2- Transferencia electrónica de *BjCitc*₅₅₀→*BjNirK*

La Figura 24 presenta los resultados obtenidos a partir del estudio por cronoamperometría de la capacidad de TE de *BjCitc*₅₅₀ a *BjNirK*. Para este par se observó un comportamiento similar al descrito para el par *SmPaz-SmNirK*, es decir, solo en presencia de ambas proteínas y de nitrito se observaron modificaciones en la i_{cat} . En este caso la corriente también varió hasta valores de saturación a concentraciones elevadas de sustrato. En los cronoamperogramas presentados en la Figura 24 A el efecto de los procesos de transferencia de masa a bajas concentraciones de sustrato, como los observados en la Figura 23, son menos evidentes. También se observa que los cambios de i_{cat} frente a los sucesivos agregados de nitritos resultaron menores a los obtenidos para el par *SmPaz-SmNirK*. Esto es debido a la interacción más débil del *BjCitc*₅₅₀ con la superficie del electrodo, lo que conlleva a la formación de un film de proteínas conformado con un menor número de moléculas electroactivas por unidad de área de la superficie del electrodo. A partir de los resultados corregidos de la Figura 24 B (datos en rojo) se calculó un valor de $K_M^{app} = 220(10) \mu M$.

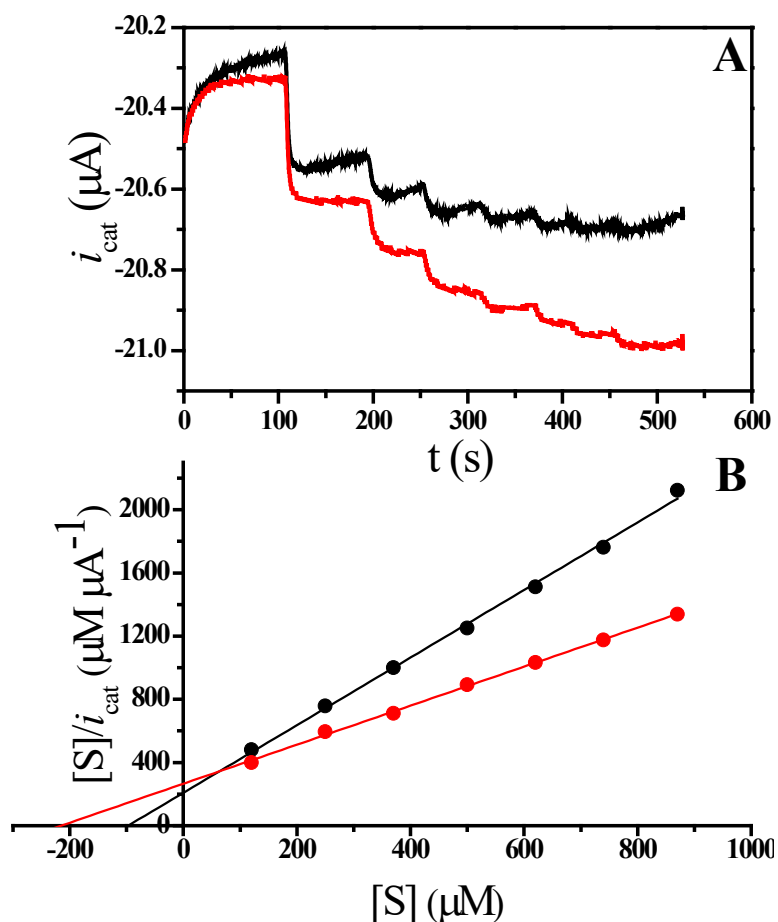


Figura 24. Cronoamperometría del par *BjCitc550-BjNirK*. Negro: datos experimentales, rojo: datos experimentales corregidos. A-Cronoamperograma del par *BjCitc550-BjNirK* en una relación de concentraciones 10:1. El Potencial del electrodo aplicado es de 100 mV vs SHE. B- $[S]/i_{cat}$ vs $[S]$ obtenida a partir de la variación de la i_{cat} frente a sucesivos agregados de sustrato.

IV.3.2- Caracterización cinética

Mediante un ensayo cinético continuo utilizando el dador electrónico fisiológico se caracterizó la cinética de reacción de cada par de proteínas. Estos ensayos nos permiten evaluar la actividad catalítica en función del proceso de TE dador electrónico $\rightarrow (T1Cu \rightarrow T2Cu)NirK$. En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos para ambos pares de proteínas.

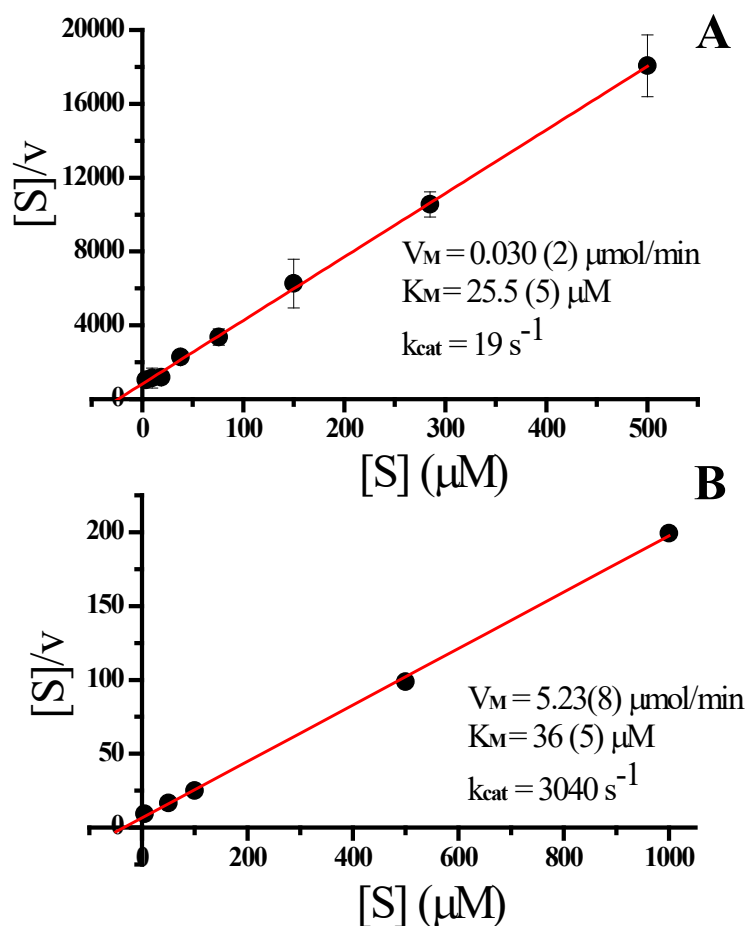


Figura 25. $[S]/v$ vs $[S]$ de los resultados obtenidos a partir de ensayo cinético continuo de A-*SmPaz-SmNirK* (R^2 : 0.99) y B- *BjCitC₅₅₀-BjNirK* (R^2 : 0.99). La velocidad inicial de consumo de nitrito (v) se define como μmol de sustrato consumido por min .

En la Figura 25 A se muestra los resultados obtenidos a partir del ensayo cinético del par *SmPaz-SmNirK*. El valor del K_M obtenido se encuentra en el orden de los valores publicados para otros pares Paz-NirK, mientras que el k_{cat} resultó inferior. Por ejemplo, para el par *AcPaz-AcNirK* se reportó un K_M de $20 \mu\text{M}$ y un k_{cat} de 163 s^{-1} [71] y para el par *AfPaz-AfNir* de $50 \mu\text{M}$ y 387 s^{-1} [28]. Cabe aclarar que los parámetros cinéticos presentados en la Figura 25 son calculados sobre la base de una concentración de enzima obtenida a partir de la masa molecular del monómero. En la bibliografía no se especifica si la concentración de enzima utilizada para el cálculo de los parámetros cinéticos es calculada a partir de la masa molecular del monómero o trímero. En este caso, en la comparación de valores de k_{cat} también se debería tener en cuenta el k_{cat} del par *SmPaz-SmNirK* calculada con una concentración de enzima obtenida a partir de la masa molecular del trímero ($k_{\text{cat}} = 57 \text{ s}^{-1}$). Siendo que la metodología empleada en este trabajo para realizar el ensayo cinético difiere de las publicadas en que el reductor se encuentra en la mezcla de reacción, surgió la hipótesis de que el valor inferior del k_{cat} obtenido podría deberse a la interferencia del agente reductor en la cinética global de reacción. Para corroborar esta suposición se trabajó en obtener la *SmPaz* reducida aislada del agente reductor, lo que permitió realizar el ensayo cinético en condiciones similares a las publicadas por otros autores.

No obstante, las constantes cinéticas obtenidas no difieren significativamente con las presentadas en la Figura 25 A, por lo que el bajo k_{cat} obtenido no es consecuencia de la presencia del agente reductor en la mezcla de reacción.

Para el par *BjCitc*₅₅₀-*BjNirK* (Figura 25 B) el K_M obtenido es del mismo orden al obtenido para *SmPaz*-*SmNirK*, pero con una actividad catalítica mucho mayor. En este ensayo no fue necesario utilizar un reductor debido a que el *BjCitc*₅₅₀ en su forma *as-purified* está reducido (Figura 19). Los K_M obtenidos en estos ensayos resultaron inferiores a los obtenidos en los ensayos cinéticos electroquímicos, lo que se debe a que en los ensayos cinéticos en solución los efectos de los procesos de limitación de transferencia de masa o inactivación de las moléculas electroactivas son despreciables.

La cinética de reacción también se evaluó utilizando metil viológeno (MV) como dador electrónico artificial. Los compuestos pertenecientes a la familia de los viológenos son ampliamente utilizados como dadores electrónicos artificiales en ensayos cinéticos de enzimas redox, esto es debido a que en su forma reducida son potentes dadores electrónicos con potenciales de reducción en el rango de -300 a -500 mV *vs* SHE [72, 73]. Las propiedades cinéticas de ambas NirK se determinaron mediante el ajuste de los datos obtenidos de velocidad de consumo de sustrato frente a diferentes [S] (0-4 mM) utilizando el modelo de Michaelis-Menten (Figura 26). La actividad catalítica en este ensayo resultó inferior para *BjNirK* (Figura 26 B; $k_{cat} = 9 \text{ s}^{-1}$) comparada con los resultados obtenidos para *SmNirK* (Figura 26 A; $k_{cat} = 240 \text{ s}^{-1}$). La baja actividad de *BjNirK* podría deberse a la inestabilidad de la enzima en presencia de altas concentraciones de ditionito de sodio, suposición que se basa al observar que la enzima es menos estable que *SmNirK* frente a las diferentes condiciones de ensayos y almacenamiento. Es muy probable que a elevadas concentraciones del agente reductor utilizadas en el ensayo cinético produzcan precipitación y/o liberación de iones cobres de la estructura de la proteína, afectando así la cinética de reacción.

La significativa reducción de los valores de K_M obtenidos al utilizar *SmPaz* y *BjCitc*₅₅₀ como dadores electrónicos, junto con el hecho de que los genes que los codifican son expresados bajo condiciones desnitrificantes simultáneamente con los genes que codifican las NirK [74, 75], sugieren fuertemente que ambas proteínas funcionan como dadores electrónicos fisiológicos de las respectivas NirK dentro de la célula bacteriana.

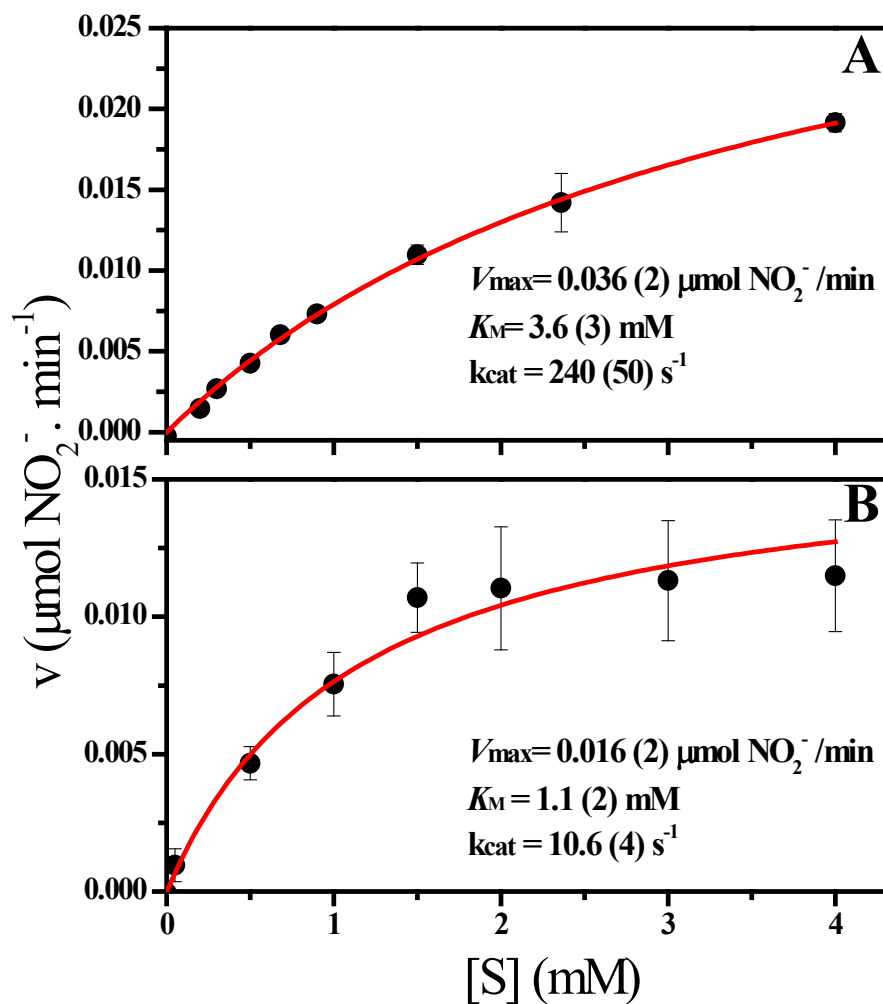


Figura 26. Caracterización cinética frente a MV como dador electrónico. Los datos fueron ajustados con el modelo de Michaelis –Menten. A- cinética del par MV- *SmNirK* y B- cinética del par MV-*BjNirK*. Los valores de R^2 para *SmNirK* y *BjNirK* fueron 0.99 y 0.98, respectivamente.

IV.4- Estudios de transferencia electrónica interproteína monitoreada por EPR

IV.4.1- Modulación de los potenciales de reducción de los cofactores de *SmNirK*

Mediante titulación potenciométrica monitoreada por espectroscopías de absorción UV-vis y EPR se determinaron los E^0 de los centros redox de *SmNirK* ($E^0_{T1Cu} = 224$ mV y $E^0_{T2Cu} = 108$ mV) [38]. Estos valores se encuentran en el orden a los reportados para otras NirK, en las cuales también se cumple que $E^0_{T1Cu} > E^0_{T2Cu}$ (sección I.2.1, Tabla 6). Los valores obtenidos para *SmNirK* y el E^0 de 278 mV calculado para *SmPaz* (sección IV.2.5), indican que el flujo de electrones en la dirección $T1Cu-SmPaz \rightarrow (T1Cu \rightarrow T2Cu)-SmNirK$ requerido para la reducción de nitrito es termodinámicamente desfavorable. Tal como ya fue presentado en las secciones I.3.1 y I.3.2, una de las hipótesis planteadas para intentar explicar la TE observada en los ensayos cinéticos propone que la interacción del nitrito con el T2Cu-NirK invierte el orden de los potenciales de reducción de ambos centros de las NirK favoreciendo la TE. Otros resultados también han sugerido que la formación del complejo NirK/dadores electrónicos favorecería la TE debido a modificaciones conformacionales en la NirK. Los resultados presentados a continuación se obtuvieron al evaluar el efecto del nitrito y *SmPaz* sobre los cofactores de *SmNirK* en condiciones catalíticas (objetivo específico III).

En la Figura 27 se presentan los resultados obtenidos al monitorear mediante EPR el proceso de TE *SmPaz-SmNirK* en condiciones catalíticas. El espectro *a* de la figura es un espectro de la solución de ambas proteínas en el cual se observan las señales de los centros T1Cu y T2Cu de *SmNirK* en relación 1:1, la señal correspondiente al T1Cu de *SmPaz* no es detectable debido a su baja concentración. El espectro *b* es el resultante de reaccionar la solución que origina el espectro *a* con exceso de ditionito de sodio. El espectro *d* corresponde al espectro que resulta de reaccionar la solución del espectro *b* con nitrito, mientras que el espectro *c* se obtiene a partir del mismo experimento pero sin la presencia de *SmPaz* en la solución de reacción. De la comparación de los dos últimos espectros puede observarse que en el espectro *c* la intensidad de la señal correspondiente al T2Cu es mayor que la del T1Cu luego de la reacción con nitrito, mientras que el espectro *d* muestra lo opuesto. La muestra correspondiente al espectro *d* fue oxidada con ferricianuro (dato no mostrado), dando como resultado un espectro similar al espectro *a* de la figura con una relación en la intensidad de las señales de T1Cu y T2Cu aproximadamente 1. Esto confirma la integridad de los centros metálicos de la proteína durante el ciclo redox de la enzima. Los espectros *d* y *c* de la figura muestran claramente que la interacción de *SmPaz* y *SmNirK* en presencia de nitrito modifica los valores relativos de potenciales de reducción de tanto el T1Cu como el T2Cu en *SmNirK*. Para el caso del espectro *c* la mayor intensidad de la señal del T2Cu indica que $E^0_{T1Cu} > E^0_{T2Cu}$, tal como se mencionó anteriormente para la enzima *as-purified*, mientras que una mayor intensidad de la señal del T1Cu en el espectro *d* indica que $E^0_{T1Cu} < E^0_{T2Cu}$. La interacción de *SmPaz-SmNirK* en ausencia de sustrato no

modifica los potenciales de reducción de los centros T1Cu y T2Cu de *SmNirK*, esto fue corroborado por titulación redox de la solución de proteínas [38]. En la Figura 27 *e* se muestra además la oxidación de *SmPaz* monitoreada por espectroscopía de absorción UV-vis previamente reducida luego de reaccionar con *SmNirK* en presencia de nitrito, tal como se realizó para el ensayo cinético continuo (sección III.6.2). La oxidación completa de *SmPaz* ocurre en los primeros minutos de reacción, esto es, en un período de tiempo inferior al tiempo de incubación de cada una de las soluciones utilizadas para adquirir los espectros de EPR presentados en la figura. Esto sugiere que los cambios observados en los espectros son producidos una vez que la reacción redox entre *SmNirK* y *SmPaz* en presencia de sustrato ha llegado a completarse, es decir, en un estado de punto final. Estos cambios, sin embargo, podrían ocurrir durante un estado catalítico intermedio de la reacción.

Los resultados presentados sugieren que la interacción *SmPaz-SmNirK-NO₂⁻* modifica los potenciales de reducción de los centros de *SmNirK* haciendo más favorable la TE T1Cu-*SmPaz*→(T1Cu→T2Cu)-*SmNirK*. Para esta enzima se comprobó que la interacción T2Cu-NO₂⁻ (espectro *c*, Figura 27) no es suficiente para producir cambios en los potenciales, tal como fue reportado por Pinho y col. (sección I.3.2), sino que además es requerida la interacción con el dado electrónico. Los resultados obtenidos completaría aún más la hipótesis de Prudencio y col. [22], ya que el cambio en los valores de los potenciales evidenciado experimentalmente en el espectro *d* podrían deberse a cambios conformacionales en *SmNirK* producidos luego de la interacción con *SmPaz* en presencia de nitrito.

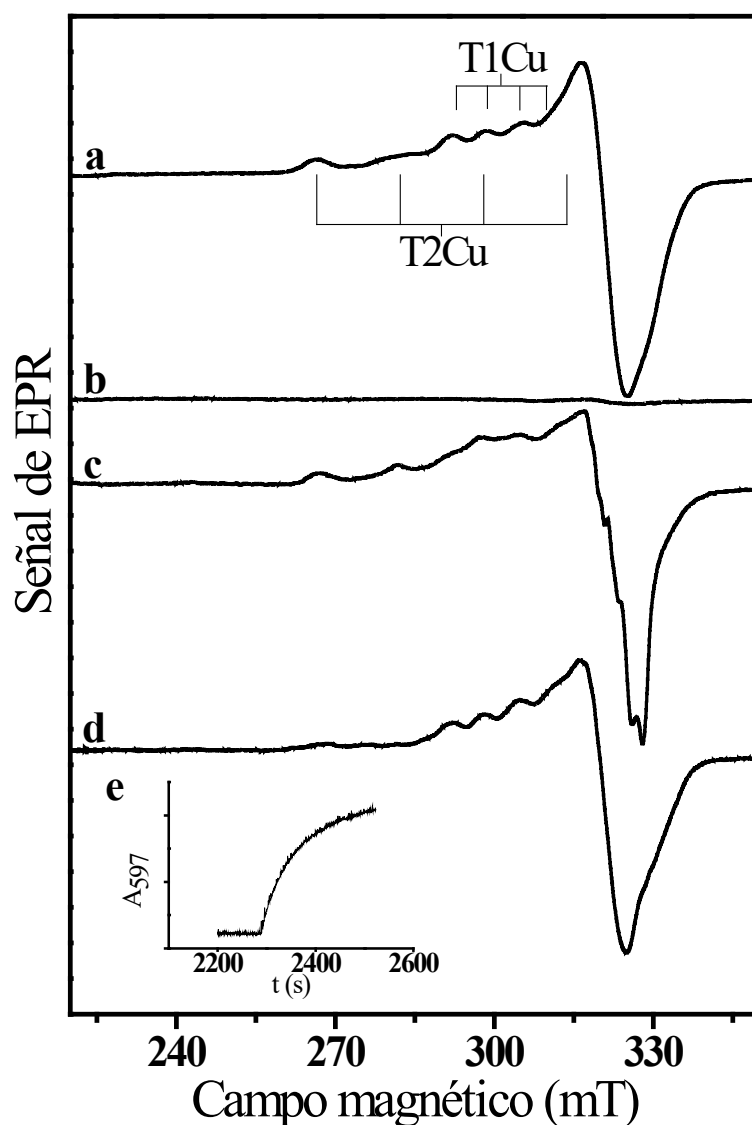


Figura 27. Espectro de EPR de a- solución *SmPaz-SmNirK*, b- solución de proteínas reducida con ditionito de sodio, c- solución de *SmNirK* + nitrito de sodio, d- idem b + nitrito de sodio. Los espectros c y d fueron obtenidos luego de la incubación con nitrito por 10 min bajo atmósfera de argón. Las concentraciones de proteínas utilizadas fueron: $\sim 200 \mu\text{M}$ para *SmNirK* y $\sim 35 \mu\text{M}$ para *SmPaz* en tampón 100 mM Tris-HCl a pH 7. La concentración final de ditionito de sodio y nitrito fue de 2 mM en cada ensayo. e- variación en el tiempo de la absorbancia a 597 nm correspondiente a la oxidación de *SmPaz*, previamente reducida, en una solución que contiene *SmNirK* y *SmPaz* en una relación 1:100 y 2.5 mM de nitrito.

IV.5- Rol de los aminoácidos involucrados en la transferencia electrónica intraproteína

IV.5.1- Mutagénesis sitio dirigida de *SmNirK*

Mediante mutagénesis sitio dirigida se evaluó el efecto en la actividad catalítica al modificar el puente estructural Cis-His que, como se muestra en la Figura 10, comunica los dos sitios T1Cu y T2Cu (objetivo específico IV). Si bien ya se han construido variantes mutando estos residuos en otras NirK (sección I.3.2), estos trabajos no incluyen variantes en los que los aminoácidos hayan sido remplazados por residuos con capacidad de coordinar los átomos de Cu manteniéndolos unidos por un puente estructural. En *SmNirK* este puente estructural está constituido por la Cis 172 (C172) y la His 171 (H171). Estos dos aminoácidos fueron mutados por Asp (D), el cual es un aminoácido con potencial capacidad para coordinar los átomo de Cu a través del grupo carboxilato de su cadena lateral [76, 77]. Las variantes de *SmNirK* obtenidas fueron denominadas C172D y H171D (sección III.3). En la Figura 28 se presentan los resultados de la secuenciación para cada una de las mismas.

```
SmNir  MSEQFQMTRRSMLAGAAIAGAVTPLIGAVSAHAEAEAVAKTAHINVASLPRVKVDLVKPPF 60
H171D  MSEQFQMTRRSMLAGAAIAGAVTPLIGAVSAHAEAEAVAKTAHINVASLPRVKVDLVKPPF
C172D  MSEQFQMTRRSMLAGAAIAGAVTPLIGAVSAHAEAEAVAKTAHINVASLPRVKVDLVKPPF
*****

SmNir  VHAHTQKAEGGPKVVEFTLTIEKKIVIDEQGTELHAMTFNGSVPGPLMVVHQDDYVELT 120
H171D  VHAHTQKAEGGPKVVEFTLTIEKKIVIDEQGTELHAMTFNGSVPGPLMVVHQDDYVELT
C172D  VHAHTQKAEGGPKVVEFTLTIEKKIVIDEQGTELHAMTFNGSVPGPLMVVHQDDYVELT
*****

SmNir  LINPDNTLQHNIDFHSATGALGGGALTVVNPGDTTVLRFKASKAGVFVYHCAPPGMVFW 180
H171D  LINPDNTLQHNIDFHSATGALGGGALTVVNPGDTTVLRFKASKAGVFVYDCAPPGMVFW
C172D  LINPDNTLQHNIDFHSATGALGGGALTVVNPGDTTVLRFKASKAGVFVYHDCAPPGMVFW
*****

SmNir  HVTSGMNGAIMVLPREGLTDGKGNSITYDKVYYVGEQDFYVPRDANGKFKKYESVGEAYA 240
H171D  HVTSGMNGAIMVLPREGLTDGKGNSITYDKVYYVGEQDFYVPRDANGKFKKYESVGEAYA
C172D  HVTSGMNGAIMVLPREGLTDGKGNSITYDKVYYVGEQDFYVPRDANGKFKKYESVGEAYA
*****

SmNir  DTLEVMRTLTPSHIVFNGAVGALTGDSALKAAVGEKVLIVHSQANRDRPHLIGGHGDYV 300
H171D  DTLEVMRTLTPSHIVFNGAVGALTGDSALKAAVGEKVLIVHSQANRDRPHLIGGHGDYV
C172D  DTLEVMRTLTPSHIVFNGAVGALTGDSALKAAVGEKVLIVHSQANRDRPHLIGGHGDYV
*****

SmNir  WATGKFRNAPDQETWFI PGGTAGAAFYTFEQPGIYAYVNHNLIEAFELGAAAHFAVTG 360
H171D  WATGKFRNAPDQETWFI PGGTAGAAFYTFEQPGIYAYVNHNLIEAFELGAAAHFAVTG
C172D  WATGKFRNAPDQETWFI PGGTAGAAFYTFEQPGIYAYVNHNLIEAFELGAAAHFAVTG
*****

SmNir  DWNDLMTSVRAPSCTX 377
H171D  DWNDLMTSVRAPSCTX
C172D  DWNDLMTSVRAPSCTX
*****
```

Figura 28. Secuencia de aminoácidos de *SmNirK* y variantes H171D y C172D. Resaltadas en color se posicionan los aminoácidos modificados.

IV.5.2- Expresión y purificación de las variantes

Cada una de las variantes fue obtenida de manera soluble con grado de pureza electroforético (sección III.4.3.1). Los niveles de expresión de H171D en *E. coli* y los rendimientos en la producción fueron comparables con los obtenidos para *SmNirK*. Este no fue el caso para C172D, dado que su expresión y rendimientos en la producción fueron inferiores.

IV.5.3- Caracterización molecular

La forma *as-purified* de H171D es verde oscuro, mientras que C172D amarilla tenue (Figura 29). Ambas variantes presentan una conformación estructural homotrimérica con subunidades de masa molecular similar a las encontradas para *SmNirK* (Figura 29).

Para H171D la relación Cu/monómero calculada fue de 2, valor que es similar al determinado en la *SmNirK*. Para esta variante fue necesario adicionar pasos de diálisis contra solución de cobre durante el proceso de purificación para obtener una proteína con todos sus sitios de cobre ocupados. El requerimiento de diálisis sugiere cambios de la afinidad al cobre del sitio modificado o de la accesibilidad del metal hacia el sitio.

Para C172D se obtuvo un contenido metálico reducido con valores en el rango de 0.7 a 1.3 Cu/monómero. Estos valores no pudieron ser incrementados aún incorporando pasos de diálisis en el proceso de purificación, lo cual refleja la incapacidad de C172D para incorporar el metal en todos sus sitios.

IV.5.4- Caracterización espectroscópica de las variantes de *SmNirK*

IV.5.4.1- Espectroscopía de absorción UV-vis

En la Figura 29 se presentan los espectros de absorción UV-vis de *SmNirK* y de las dos variantes en sus formas *as-purified*. El espectro de H171D (espectro rojo) es similar al de *SmNirK* (espectro verde), mostrando las bandas de absorción características del T1Cu con intensidades similares. Las bandas centradas en 456 y 586 nm en el espectro de *SmNirK* se encuentran ligeramente corridas hacia 466 nm ($3.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 579 nm ($3.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en el espectro de H171D. Ambas bandas corresponden a las transiciones de TC $(3p_{\pi})S(\text{Cis}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$ y $(3p_{\sigma})S(\text{Cis}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$ respectivamente. El hombro ubicado a los 400 nm en el espectro de *SmNirK* también sufre un corrimiento hacia 383 nm en el espectro de H171D y se lo observa como una banda de absorción definida y más intensa. Esta banda de absorción se asigna a las transiciones correspondientes a $S(\text{Met}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$ y $N(\text{His}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})\text{Cu}^{2+}$ [43, 47]. Estas pequeñas modificaciones en el espectro de esta variante dan indicios de que la mutación produjo algunos cambios en la estructura electrónica del T1Cu. En el espectro también se presenta la banda ancha correspondiente a las transiciones $d \rightarrow d$ centrada aproximadamente a los 750 nm.

El espectro de absorción UV-vis de C172D (Figura 29, espectro azul) está constituido únicamente por la banda de absorción ubicada a ~ 280 nm correspondiente a los aminoácidos aromáticos de la cadena polipeptídica. La ausencia de la Cis 172 elimina la posibilidad de que existan

las TC en las que está involucrada, y por tal el espectro no contiene las bandas de absorción a 450 y 580 nm presentes en el espectro de *SmNirK*.

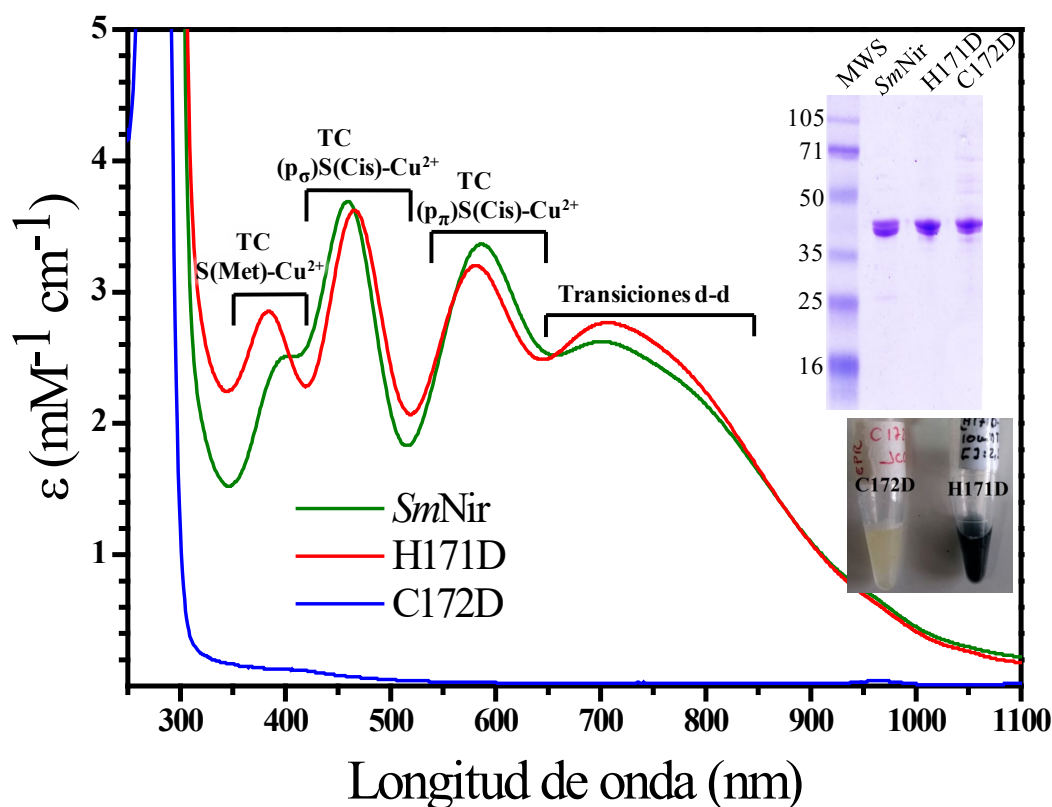


Figura 29. Superposición de espectros de absorción UV-vis a pH 6 de *SmNirK* (verde), H171D (rojo) y C172D (azul). Panel derecho superior: SDS-PAGE de las tres proteínas con marcadores de masa molecular comercial (Productos Biológicos- ww.pb-l.com.ar) y sus respectivas masas moleculares en kDa. Panel derecho inferior: variantes en su forma *as-purified* (~1 mM).

IV.5.4.2- Espectroscopía de EPR

Los espectros de EPR de H171D y C172D a pH 6 y sus respectivas simulaciones son mostrados en la Figura 30. En la Tabla 8 se presentan los parámetros de simulación de las señales espectroscópicas obtenidas de estos espectros. También se incluyen resultados obtenidos para *SmNirK* previamente descriptos (sección IV.1.2.2) para facilitar la comparación.

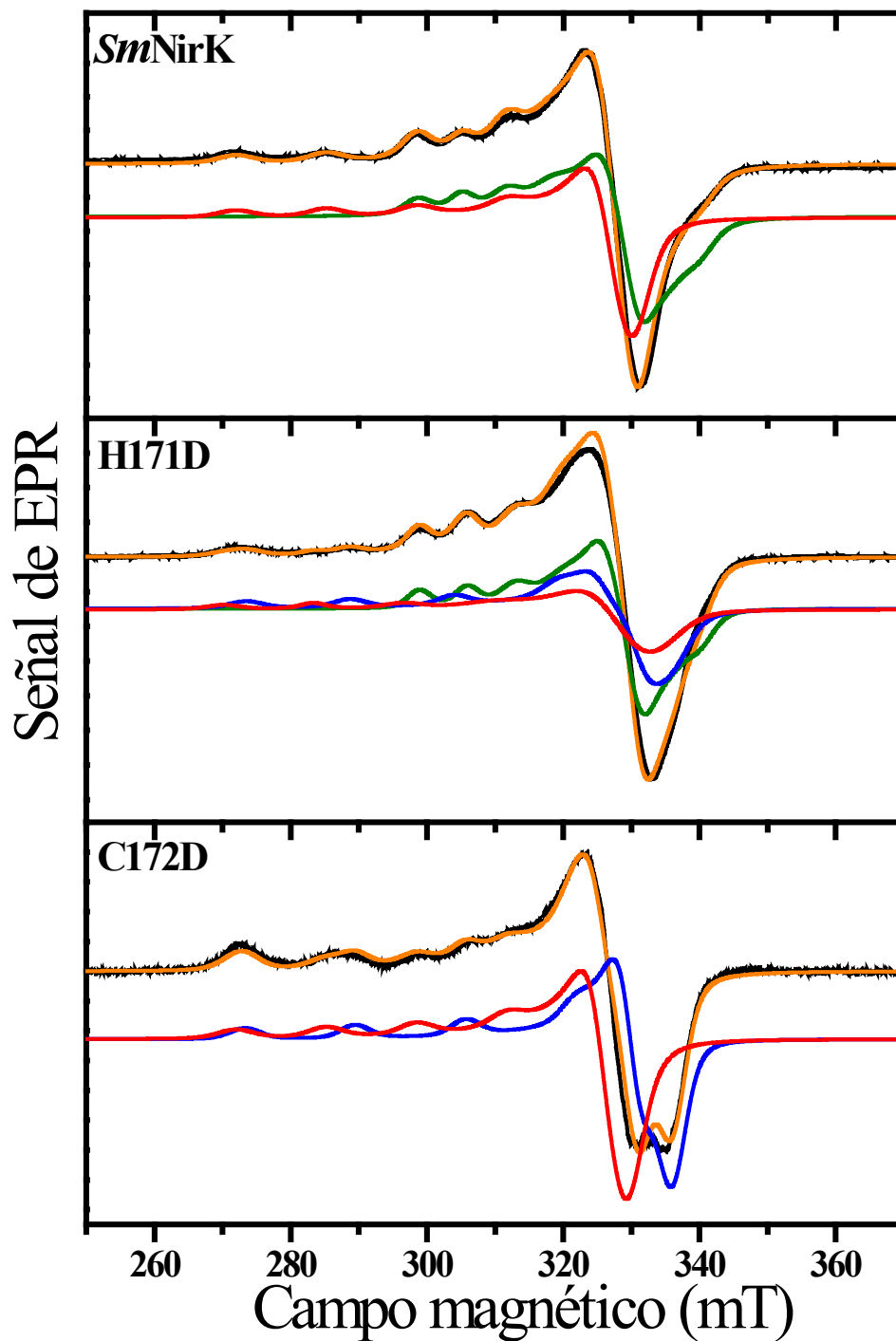


Figura 30. Espectros de EPR y simulaciones. Panel superior: Espectro de EPR de *SmNirK*. Naranja: simulación T1Cu+T2Cu, verde: T1Cu y rojo: T2Cu. Panel medio: Espectro EPR de H171D. Naranja: T1Cu+T2Cu, verde: T1Cu, rojo: T2Cu^{H171D} y azul: T2Cu^{H171D}. Panel inferior: Espectro de EPR de C172D. Naranja: T2Cu^{C172D}+T2Cu^{C172D}, rojo: T2Cu^{C172D} y azul: T2Cu^{C172D}. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

Tabla 8. Parámetros de simulación obtenidos de los espectros de EPR de las variantes de *SmNirK*. Se incluyen parámetros de simulación de los espectros de EPR de *SmNirK* tomados en las mismas condiciones. Los colores se corresponden con los utilizados en la Figura 30.

Componentes espectrales	$g_{1,2,3}; A_{//}$ (mT)		
	<i>SmNirK</i>	H171D	C172D
T1Cu	2.190, 2.052, 2.023; 7,1	2.183, 2.052, 2.023; 7.5	
T2Cu _I	2.315, 2.070, 2.065; 15	2.330, 2.075, 2.035; 15	2.315, 2.075, 2.070; 15
T2Cu _{II}		2.280, 2.075, 2.030; 17	2.270, 2.045, 2.045; 18

El espectro de EPR de H171D (Figura 30, panel medio) está constituido por dos señales superpuestas correspondientes a los sitios T1Cu y T2Cu. Al reaccionar la proteína en su forma *as-purified* con ferricianuro de potasio no se produjo variación de la intensidad de la señal y sumado a que la cuantificación de espines a partir del espectro arrojó ~ 2 espines/monómero, indica que los iones Cu en el T1Cu y T2Cu se encuentran completamente oxidados (Cu^{2+}). La cuantificación de espines está en línea con la cuantificación del Cu mencionado previamente. En el espectro se observa que la señal del T2Cu está conformada por dos componentes espectrales superpuestas (panel medio, T2Cu_I^{H171D} y T2Cu_{II}^{H171D} espectro rojo y azul respectivamente), de las cuales la componente T2Cu_I^{H171D} presenta parámetros de simulación comparables a la señal del T2Cu de *SmNirK*. La inhomogeneidad espectral observada para la señal del T2Cu podría deberse a modificaciones estructurales, lo que fue evaluado mediante estudios computacionales y será presentado en la sección IV.5.6. Sin embargo, en la señal del T1Cu se observa una única componente espectral (panel medio, espectro azul) con parámetros de simulación similares a los obtenidos para el mismo sitio en *SmNirK* (Tabla 8). Para esta variante el espectro de absorción UV-vis muestra modificaciones en las posiciones de las bandas de absorción, lo que sugiere que la mutación produjo algunos cambios estructurales en el T1Cu. Sin embargo, la señal de EPR para este sitio es muy similar al de *SmNirK*; estos resultados indican que el centro no sufrió cambios estructurales sustanciales. En los espectros de EPR de esta variante las tres componentes se presentan con relación de intensidades diferentes, 1:0.35:0.65 para T1Cu:T2Cu_I^{H171D}:T2Cu_{II}^{H171D}.

El espectro de EPR de C172D en su forma *as-purified* (Figura 30, panel inferior) también presenta una señal compuesta por dos componentes espectrales superpuestas en la región de campo magnético del T2Cu (panel inferior, T2Cu_I^{C172D} y T2Cu_{II}^{C172D} espectro rojo y azul respectivamente) con relación de intensidad 1:1. La señal correspondiente a la componente T2Cu_I^{C172D} presenta parámetros de simulación muy similares a los parámetros obtenidos para la señal del T2Cu de *SmNirK* (Tabla 7). En línea con lo observado en el espectro de absorción UV-vis, el espectro de EPR de C172D no presenta señal correspondiente al T1Cu. La cuantificación de espines para esta proteína muestra resultados que están de acuerdo con el contenido metálico, lo que indica que los iones Cu de tanto T2Cu_I^{C172D} como de T2Cu_{II}^{C172D} están completamente oxidados en la forma *as-purified* de la

proteína. El espectro mostrado en la Figura 30 sugiere que en esta variante el metal es incorporado solo a nivel del sitio activo, lo que explicaría la ausencia de las bandas de absorción en el espectro UV-vis y de la señal de EPR correspondiente al T1Cu. Sin embargo, el hecho que se obtenga esencialmente las mismas señales EPR independientemente del contenido metálico dentro del rango obtenido en la cuantificación y que no habría ninguna razón estructural a nivel del sitio activo que justifique una inhomogeneidad en el mismo, se podría sugerir como posibilidad que la señal de EPR asociada a T2Cu_{II}^{C172D} correspondan a iones Cu incorporados en el sitio modificado. En este caso, la mutación produciría modificaciones en el sitio que anularían las transiciones d-d y de TC (S)Met-Cu²⁺. La posibilidad de incorporación del Cu al sitio modificado, también se evaluó mediante cálculos computacionales (sección IV.5.6).

Los espectros de EPR de H171D están constituidos por dos señales correspondientes a los dos sitios, un T1Cu con características espectroscópicas muy similar al de *SmNirK* y un T2Cu modificado. En cambio, el espectro de C172D solo contiene una señal correspondiente al T2Cu que también presenta modificaciones. Las componentes T2Cu_{II} identificadas en estos espectros, si bien no corresponden a la misma señal en las dos proteínas, presentan parámetros de simulación inusuales para las proteínas con T2Cu. Así mismo, estas y todas las componentes espectrales identificadas en los espectros de las variantes, al igual que las señales encontradas en los espectros de *SmNirK*, presentan simetría axial con estructura hiperfina resuelta debido a un núcleo de Cu ($I = 3/2$) en la región del g_{\parallel} y cumplen con $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$ consistentes con un estado fundamental $d_{x^2-y^2}$.

IV.5.4.3- Caracterización redox de los cofactores de las variantes de *SmNirK*

La caracterización redox de los centros de Cu en ambas variantes se llevó a cabo de manera similar a como se procedió para *SmNirK* (sección IV.1.2.4). En la Figura 31 se presentan los espectros de EPR a pH 6 obtenidos al reaccionar las dos variantes con diferentes agentes reductores. En el panel superior de la figura se incluyen los resultados obtenidos para *SmNirK* con el objetivo de facilitar la comparación.

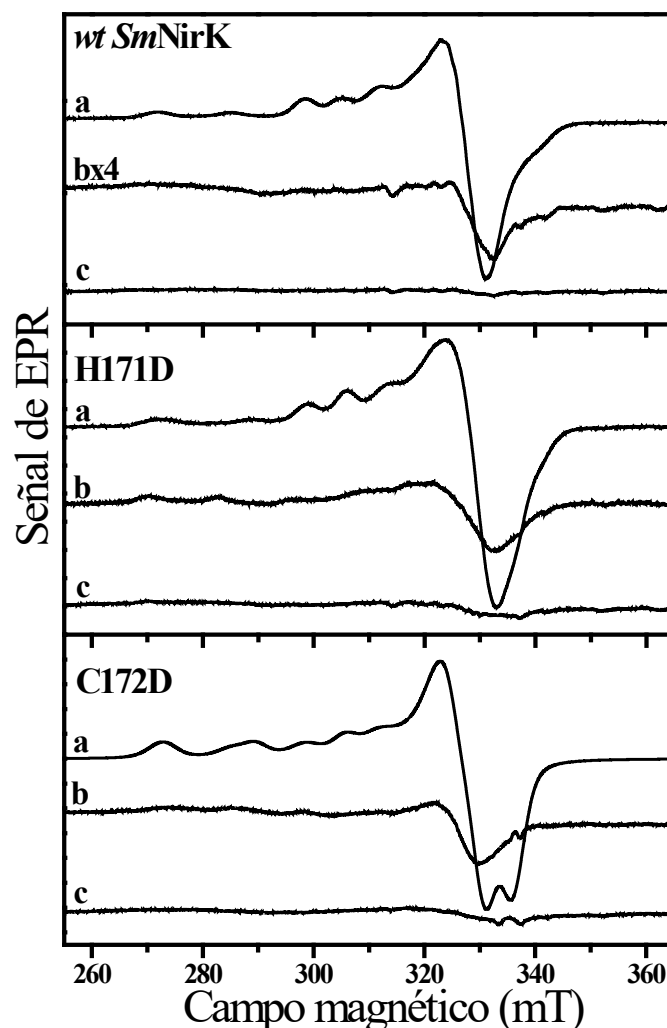


Figura 31. Reacción con agentes reductores monitoreada por EPR para *SmNirK* (panel superior), H171D (panel medio) y C172D (panel inferior). a- NirK *as-purified*, b- NirK + ácido ascórbico y c- NirK + ditionito de sodio. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

En el panel medio de la Figura 31 se presentan resultados obtenidos para H171D. El espectro *a* corresponde al espectro obtenido en la forma *as-purified* de la proteína. El espectro *b* resulta de reaccionar la proteína con ácido ascórbico. En el mismo solo se observa una señal correspondiente a la componente $T2Cu_I^{H171D}$, mientras que los centros cuyas señales corresponden al $T1Cu$ y $T2Cu_{II}^{H171D}$ fueron reducidos al estado cuproso (Cu^+). El comportamiento de estas dos últimas componentes frente a ácido ascórbico es similar al observado para los centros de *SmNirK* (panel superior, espectros *b* y *c* respectivamente) y otras NirK [29, 54, 56, 59]. Esto indica que el potencial de reducción del $T1Cu$ no sufrió grandes modificaciones con la mutación y que la componente $T2Cu_{II}^{H171D}$ presenta un potencial similar y en el rango de 300 a 0 mV vs SHE. El hecho que el ácido ascórbico no reduce la componente $T2Cu_I^{H171D}$ (componente cuyos parámetros de EPR son comparables a los de $T2Cu$ de *SmNirK*) indica que su potencial de reducción sería más negativo que el de las otras dos componentes espectrales. En el espectro *c*, que resulta de la reacción con un exceso de ditionito de sodio, muestra

que todas las componentes espectrales desaparecen, indicando que todos los centros de Cu se han reducido. El hecho que la señal correspondiente al $\text{T2Cu}_I^{\text{H171D}}$ sea completamente reducida con un agente reductor más fuerte como el ditionito de sodio sugiere que su potencial estaría en el rango 0 a -400 mV, valores inusuales para los centros T2Cu de proteínas. El comportamiento del T1Cu frente a cada uno de los agentes reductores también se estudio por espectroscopía de absorción UV-vis (datos no mostrados). La ausencia de las bandas de absorción que caracterizan los T1Cu indica que, en línea con los espectros *b* y *c* de la Figura 31, este centro es reducido por cualquier de los dos agentes reductores.

En el panel inferior de la Figura 31 se presentan los resultados obtenidos para C172D. En el espectro *b* se observa que la señal $\text{T2Cu}_I^{\text{C172D}}$ fue reducida de manera parcial con el ácido ascórbico mientras que para la componente $\text{T2Cu}_{II}^{\text{C172D}}$ la reducción fue completa. Ambas componentes evidencian un comportamiento similar al T2Cu de *SmNirK*, y sus potenciales de reducción tendrían valores en el rango de 0 a 300 mV. Al igual que para *SmNirK* y H171D, ambas señales de EPR se reducen por completo con el agregado de un exceso de ditionito de sodio (panel inferior, espectro *c*).

IV.5.4.4- Reacción con sustrato de las variantes de *SmNirK* monitoreada por EPR

En la Figura 32 se presentan los espectros de EPR obtenidos al reaccionar C172D con nitrito de sodio bajo diferentes condiciones de reacción (panel inferior), también se muestran de la misma forma los espectros obtenidos para *SmNirK* (panel superior). Cada uno de los espectros se presentan con sus respectivas simulaciones, para *SmNirK* se optó por incluir únicamente los espectros obtenidos de la simulación de la señal del T2Cu para mayor claridad. Al reaccionar C172D con nitrito se observan cambios solo en la señal $\text{T2Cu}_I^{\text{C172D}}$ (panel medio, espectro *b*). En la simulación de este espectro se obtuvieron parámetros para la señal $\text{T2Cu}_I^{\text{C172D}}\text{-NO}_2^-$ ($g_{1,2,3} = 2.307, 2.075, 2.035$; $A_{//} = 13.5 \text{ mT}$) idénticos a los obtenidos para la señal T2Cu-NO_2^- de *SmNirK*. La componente $\text{T2Cu}_{II}^{\text{C172D}}$ no fue modificada por la incubación con sustrato.

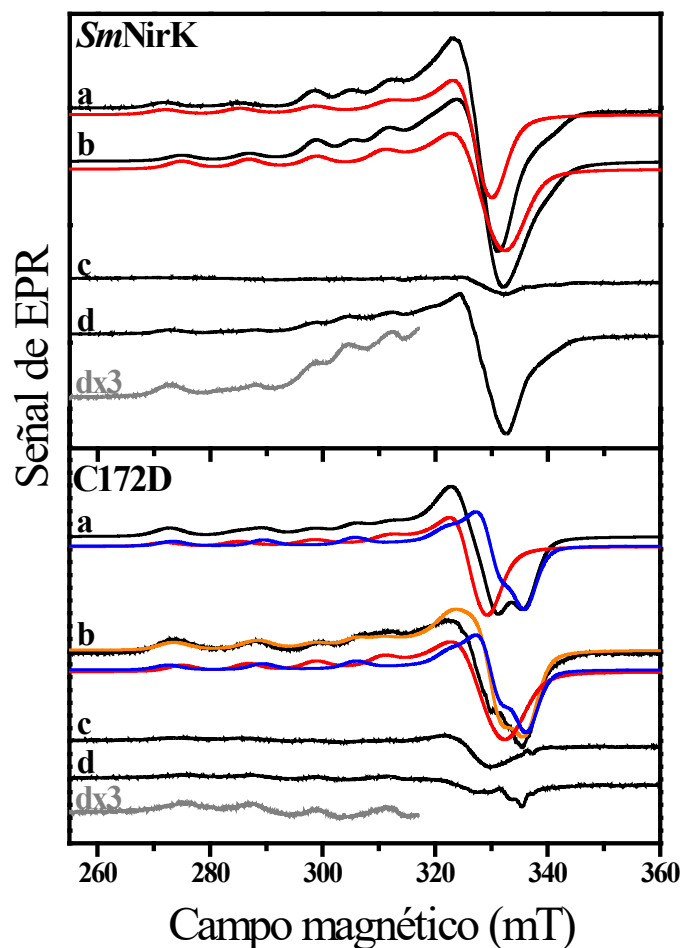


Figura 32. Reacción con sustrato monitoreada por EPR para *SmNirK* (panel superior) y C172D (panel inferior). Panel superior. rojo: T2Cu. Panel inferior. Naranja: T2Cu_I^{C172D} + T2Cu_{II}^{C172D}, rojo: T2Cu_I^{C172D} y azul: T2Cu_{II}^{C172D}. a- proteína *as-purified*, b- proteína + nitrito, c- proteína + ditionito de sodio y d- ídem c + nitrito. Condiciones experimentales: pH 6, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

En la figura también se muestran los espectros obtenidos a partir de la reducción con ditionito de sodio (espectro *c*) y la posterior reacción con nitrito (espectro *d*) para ambas proteínas. La recuperación de la señal en el espectro *d* de C172D evidencia un comportamiento similar a los resultados obtenidos en el mismo espectro para *SmNirK*, lo que indica que el T2Cu de C172D es capaz de catalizar la reducción del sustrato. La señal recuperada en el espectro *d* para C172D corresponde a T2Cu_I^{C172D}-NO₂⁻ debido al exceso de sustrato en el medio. De este espectro es posible obtener dos importantes conclusiones. Una de ellas es que la componente T2Cu_I^{C172D}, por presentar un comportamiento espectroscópico similar a la señal T2Cu de *SmNirK* frente a los reductores y el sustrato, sería la componente catalíticamente activa de esta variante. Y la segunda conclusión es que debido a que en el espectro *c* no se recupera la señal T2Cu_{II}^{C172D}, y suponiendo que esta componente es debida a la coordinación del Cu en el sitio modificado, no sería posible la TE entre los dos centros.

En un experimento similar al mostrado en la Figura 32 se observó que ninguna de las dos componentes que constituyen la señal del T2Cu de H171D fueron modificadas en presencia de un

exceso de sustrato y tampoco ninguna señal fue recuperada luego de reaccionar con sustrato la proteína previamente reducida con ditionito de sodio (datos no mostrados). Estos resultados indican que el T2Cu de H171D no es capaz de catalizar la reducción del sustrato. El potencial de reducción más negativo de la componente espectral T2Cu^{H171D} de esta variante, que presenta parámetros de simulación comparables al sitio activo de *SmNirK*, podría ser la causa de la incapacidad del sitio para reducir el sustrato.

IV.5.5- Ensayos cinéticos

La actividad nitrato reductasa de las dos variantes fue determinada mediante ensayos cinéticos de estado estacionario utilizando *SmPaz* como dador electrónico fisiológico y MV como dador electrónico artificial. Los resultados son comparados con los obtenidos para *SmNirK*.

Los ensayos en los que se evaluó la actividad nitrato reductasa de las dos variantes utilizando a *SmPaz* como dador electrónico se realizaron mediante ensayos cinéticos continuos y cronoamperometría (Figura 33). Tal como fue mencionado (sección IV.3.2), utilizando a *SmPaz* como dador electrónicos es posible evaluar la actividad catalítica en función del proceso de TE *SmPaz*→(T1Cu→T2Cu)*NirK*. En ambos ensayos se observó que ninguna de las variantes presenta actividad catalítica. Por esto, en los ensayos continuos no se observa oxidación de *SmPaz* una vez adicionado el sustrato a la mezcla de reacción (panel A), mientras que en cronoamperometría la corriente no se modifica frente a sucesivos agregados de nitrato (panel B). La modificación del puente Cis-His produce proteínas inactivas, tal como se observó en los ensayos cinéticos de las variantes construidas a partir de la Cis e His en otras *NirK* (sección I.3.2). La falta de actividad para C172D podría explicarse debido a la ausencia del T1Cu o si se considera una proteína con Cu incorporado al sitio modificado, la falta de actividad podría deberse a la imposibilidad de la TE como ya fue observado en la Figura 32. Para H171D la falta de actividad podría deberse a que el nitrato no sería capaz de unirse al sitio activo, tal como sugieren los ensayos de EPR. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en esta proteína también esté bloqueada la TE entre los dos sitios debido a perturbaciones en el puente estructural Asp171-Cis172. Estas posibilidades fueron analizadas mediante cálculos computacionales que serán presentados en la sección IV.5.6. Notar que para ambas variantes no se tuvo en cuenta la posibilidad de que la inactivación se deba a la imposibilidad de que ocurra la interacción con *SmPaz*, dado que las mutaciones realizadas no afectarían la estructura superficial de la proteína. Para H171D también se descartó la posibilidad de que la inactivación se deba a la falta de TE interproteína *SmPaz*→H171D dado que el sitio T1Cu de esta variante no sufrió grandes modificaciones estructurales.

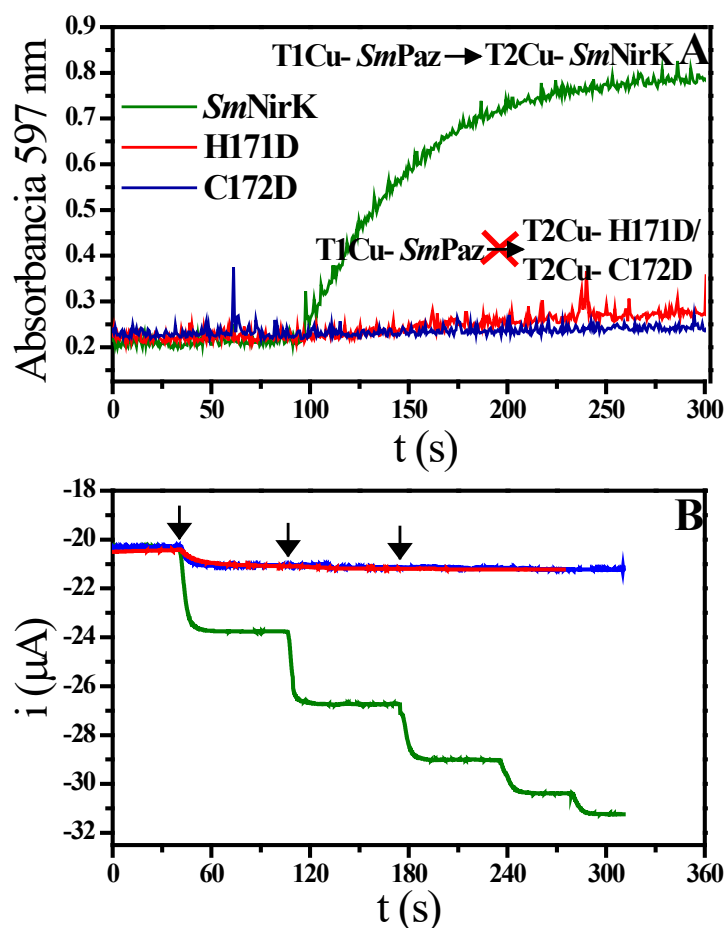


Figura 33. Ensayos cinéticos utilizando *SmPaz* como dador electrónico. A- ensayo continuo en solución. B- ensayos de cronoamperometría. Potencial del electrodo aplicado: 100 mV vs SHE. Los colores utilizados se corresponden con los del panel A.

De las dos variantes, únicamente la C172D resultó activa utilizando MV como dador electrónico. Los resultados demuestran que frente a este dador la C172D es capaz de catalizar la reducción de NO_2^- , en línea con lo observado en los espectros *c* y *d* presentados en la Figura 32. En la Figura 34 se presentan los datos obtenidos de velocidad de consumo de sustrato frente a diferentes $[\text{S}]$ ajustados al modelos de Michaelis-Menten. La variante presenta actividad catalítica considerablemente inferior ($k_{\text{cat}} = 3.9(4) \text{ s}^{-1}$) respecto a la *SmNirK* ($k_{\text{cat}} = 240(50) \text{ s}^{-1}$, Figura 26), lo que podría deberse a dos posibilidades. Una de ellas sería el menor número de sitios activos capaces de unir y reducir el sustrato debido a que únicamente el $\text{T2Cu}_1^{\text{C172D}}$ es capaz de reaccionar con el sustrato (Figura 32). La otra posibilidad podría ser la falta de un T1Cu o, considerando que el cobre fue coordinado en el sitio modificado, la presencia de un sitio incapaz de transferir el electrón al sitio activo como se observa en las Figuras 32 y 33. Esto supone que la oxidación del MV y la reducción del nitrito deberían ocurrir en el T2Cu, lo que implicaría que el nitrito se una a un sitio previamente reducido. La interacción $\text{T2Cu}(\text{Cu}^+)-\text{NO}_2^-$ es electrostáticamente menos favorable que la del complejo $\text{T2Cu}(\text{Cu}^{2+})-\text{NO}_2^-$, lo que implicaría una constante microscópica k_1 (o k_{on}) inferior y por lo tanto menor actividad. El hecho que el T2Cu sea capaz de reducir el sustrato sin la intervención del T1Cu

es muy importante dado que abre otra posibilidad a la que se podría deber la falta de actividad de H171D. Si bien la componente T2Cu^{H171D} de esta variante tiene características espectroscópicas comparables al T2Cu de la *SmNirK*, presenta un potencial de reducción más negativo y podría ser la causa de que el T2Cu de H171D no sea funcional.

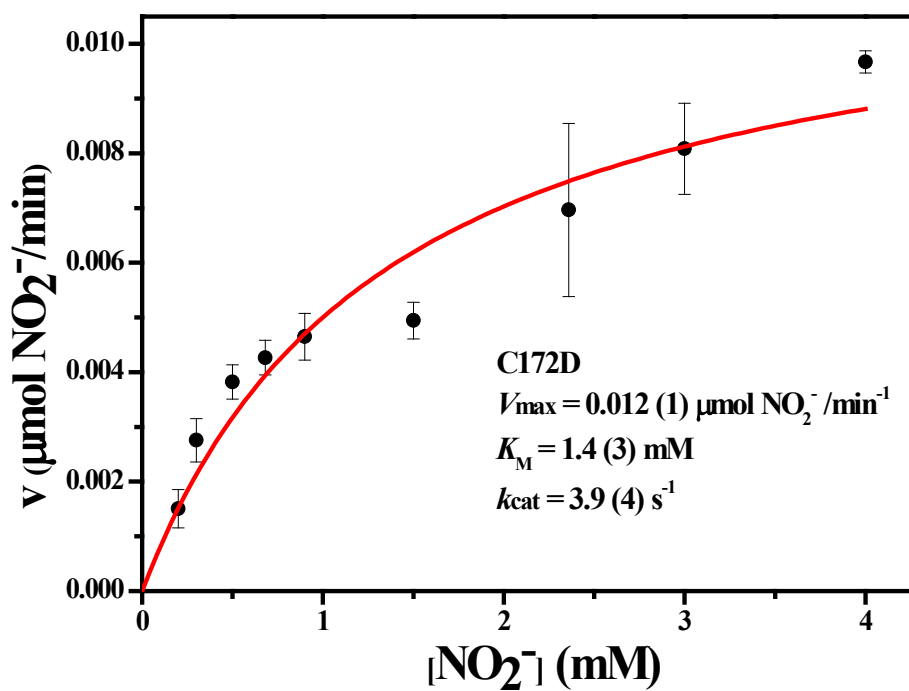


Figura 34. Caracterización cinética de C172D frente a MV como dador electrónico. Los datos fueron ajustados con el modelo Michaelis –Menten. El ajuste arrojó un R² de 0.99.

IV.5.6- Modelos estructurales obtenidos por métodos computacionales

Para muchos de los interrogantes planteados a partir de los resultados presentados hasta el momento se encontrarían respuestas si por ejemplo, entre otras posibilidades, tendríamos disponibles las estructuras cristalográficas de las proteínas. Siendo que no contamos con este tipo de información, se trabajó en obtener datos estructurales mediante estudios computacionales (también denominados estudios *in silico*) que complementen los resultados experimentales obtenidos. Los estudios *in silico* permitieron obtener las estructuras para las NirK mediante homología con estructuras ya resueltas de otras NirK y empleando la metodología QM/MM (*quantum mechanics/molecular mechanics*). Las estructuras de las variantes H171D y C172D fueron obtenidas a partir de la estructura de *SmNirK*. En este apartado solo se presentan las estructuras obtenidas para cada una de las proteínas sin brindar detalles de las metodologías utilizadas en el estudio ya que los mismos forman parte de la tesis doctoral de la Lic. Cecilia Gómez.

IV.5.6.1- Modelos estructurales obtenidos para *SmNirK* y sus variantes

Para obtener la estructura de *SmNirK* los cálculos de QM/MM fueron realizados a partir de un modelo estructural obtenido por homología de una estructura reportada para *AfNirK* (PDB 1SNR). El modelo de *SmNirK* es presentado en el panel A de Figura 35 comparado con la estructura de *AfNirK*,

la cual contiene un T2Cu con un átomo de O apical asignado a una molécula de agua que se presenta en dos posibles posiciones con 30% y 70 % de ocupación [78]. Como se muestra en la figura ambos modelos estructurales son similares con un valor de desviación cuadrática media (r.m.s) de 0.2 Å. En el modelo de *SmNirK*, la molécula de agua coordinada al T2Cu ($d_{\text{Cu-O}} = 1.90$ Å) se presenta en una posición cercana a la de la molécula de agua con menor ocupación de la estructura de *AfNirK*. Esta molécula de H₂O ligando del T2Cu, al igual que lo observado en *AfNirK*, también está unida por puente de hidrógeno al Asp_{CAT}. Además, el enlace puente de hidrógeno N_{δ1}H...O=C formado por el N_{δ1} de His y el átomo O del carbonilo de la Cis presente en el puente estructural Cis-His en *AfNirK* también se obtuvo en el modelo de *SmNirK*.

La comparación de las estructuras de *SmNirK* y H171D es presentado en el panel B de la Figura 35. La distancia T1Cu-T2Cu se redujo de 12.6 Å a 12.2 Å debido a la longitud ligeramente más corta del Asp en comparación con la His. El sitio T1Cu es similar en ambas estructuras, lo cual es coherente con lo observado mediante la espectroscopía de absorción UV-vis y EPR. En el T2Cu de la estructura se observa que el grupo carboxilato de la cadena lateral del Asp171 está coordinado al átomo de cobre de manera monodentada ($d_{\text{Cu-O}}$ de 1.90 Å). La unión monodentada del Asp es la estructura más estable que se observa en los complejos de cobre en estado sólido [76, 77]. H171D presenta, al igual que en la estructura de *SmNirK*, una molécula de H₂O coordinada al T2Cu a 1.90 Å. Esta molécula se estabiliza a través de un fuerte enlace de hidrógeno con el Asp_{CAT} y un enlace algo más débil con otra molécula de H₂O, que a su vez también está unida por puente de hidrógeno a la His_{CAT}. Todas estas interacciones son consideradas relevantes para la catálisis (sección I.3.3). La presencia de estas interacciones y el hecho de que los aminoácidos no mutados mantuvieron sus posiciones con respecto a la estructura de *SmNirK*, indica que el cambio de la His por Asp no afectó al resto de la proteína considerada esencial para la catálisis como el *sensing loop* y la red de puentes de hidrógeno establecido entre las moléculas de agua. La misma conclusión se obtuvo para la variante C172D presentada a continuación. Sin embargo, el análisis de los espectros de EPR de H171D mostró dos componentes espectrales en T2Cu, lo que revela cierta inhomogeneidad en la estructura de este sitio. Esta inhomogeneidad podría atribuirse a diferentes posiciones del H₂O ligando del T2Cu, como se observa en la estructura de *AfNir* [78]. También podría deberse a un modo de coordinación diferente del Asp171, como se observa en datos estructurales de rayos X de proteínas que contienen Mo en las que la cadena lateral del Asp puede adoptar modos de coordinación mono o bidentados [79]. Otra característica estructural notable es la ausencia del enlace de hidrógeno N_{δ1}H...O=C en el puente estructural T1Cu-T2Cu propuesta como esencial en la TE intraproteína en las NirK verdes (sección I.3.2). Por lo tanto, el puente estructural T1Cu-T2Cu en esta variante es diferente comparado con el de *SmNirK*, lo que podría ser una posible causa de la falta de actividad catalítica de H171D.

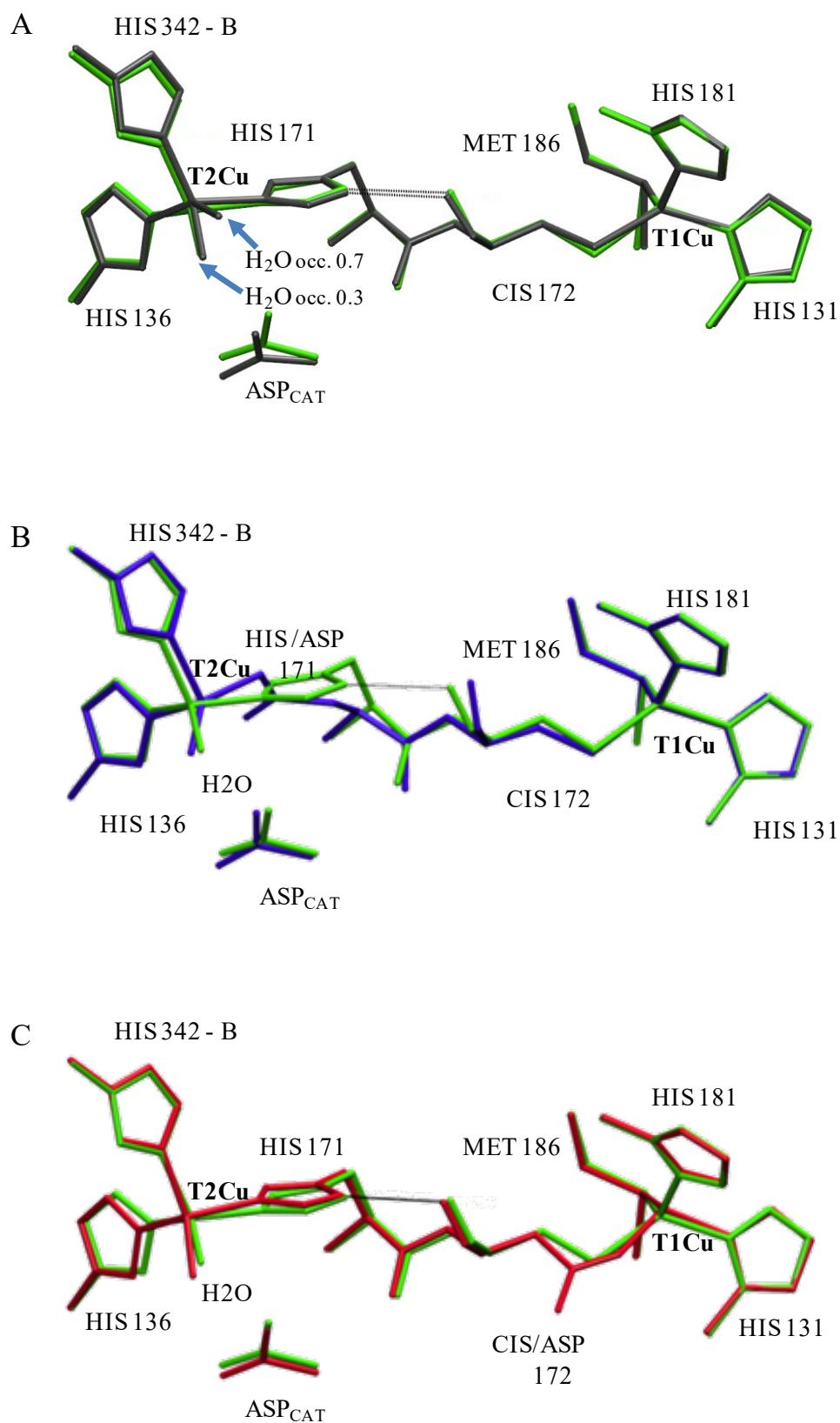


Figura 35. A- Superposición de la estructura optimizada de *SmNirK* (verde) con la estructura de rayos X de *AnirK* (gris, PDB 5F7B). B- Superposición de la H171D (azul) con la estructura de *SmNirK*. C- ídem para C172D (rojo). La estructura $N_{\delta 1}H...O = C$ se presenta como líneas finas.

Para analizar si la falta de actividad catalítica de H171D es un problema de unión de nitrito en el T2Cu o de una TE intramolecular ineficiente, se realizaron estudios de QM/MM en *SmNirK* y H171D con el nitrito unido al T2Cu. Los cálculos en ambas proteínas mostraron que el nitrito se coordina a T2Cu de forma bidentada a través de los átomos de O, como se observa en las estructuras cristalinas de NirK reportadas [40, 80] y en varios complejos de cobre [81, 82]. El sustrato se une de manera tal de que el ángulo formado por los planos ONO y OCuO es de 10° y 5° para *SmNirK* y H171D, respectivamente. Estos valores se encuentran levemente por debajo de los obtenidos en otras estructuras de NirK [78, 80]. La posición del anión nitrito se estabiliza principalmente por su interacción con Asp_{CAT} e Ile293 (Ile_{CAT}). Dado que el mecanismo de reacción de NirK implica la eliminación del H₂O ligada para su posterior unión de nitrito (sección I.3.3), se evaluó el costo energético de eliminar este ligando tanto en *SmNirK* como en H171D. Este cálculo mostró que la energía relativa para eliminar el H₂O del T2Cu en ambas proteínas es similar, lo que implica que la falta de actividad de H171D no se puede atribuir a un motivo vinculado con la unión del sustrato al sitio activo. Estos resultados sugieren que una posible causa a la falta de actividad catalítica en H171D podría deberse a una vía ineficiente de transferencia de electrones T1Cu-T2Cu, específicamente se podría atribuir a la ausencia del N_{δ1}H...O=C en el puente estructural T1Cu-T2Cu.

Los cálculos de QM/MM para C172D se realizaron suponiendo que solo el sitio activo contiene el metal. Sin embargo, dado que otra de las posibilidades planteadas es que el sitio modificado por la mutación podría contener el metal, los cálculos también fueron realizados asumiendo que los dos sitios contienen Cu. En el panel C de la Figura 35 se comparan esta última estructura con la de *SmNirK*. La superposición de las dos estructuras de C172D con *SmNirK* mostró un T2Cu sin modificaciones estructurales significativas, solo con pequeñas diferencias en las distancias Cu- imidazol. Además, el enlace de hidrógeno N_{δ1}H...O=C propuesto como esencial en la TE se conserva en ambos casos. Para el modelo estructural de C172D que contiene 2 Cu/monómero, el grupo carboxilato de la cadena lateral del Asp 172 se une de manera monodentada al Cu con distancia d_{Cu-O} de 1,97Å. En esta estructura la presencia de dos centros de cobre se correspondería con las dos componentes espectrales del T2Cu detectados en los espectros de EPR, lo que implica que la componente espectral T2Cu_I^{C172D} catalíticamente activa podría corresponder al sitio activo mientras que la T2Cu_{II}^{C172D} correspondería al sitio modificado. Esta posibilidad implicaría la coexistencia de cuatro subpoblaciones de proteínas: una donde los dos centros de coordinación disponibles contienen cobre, otra sin cobre y otras dos en las que el cobre solo está presente en T2Cu o solo en el sitio modificado. Sin embargo, como en la determinación del contenido de cobre en esta proteína se obtuvieron valores alrededor de 1 átomo de cobre por monómero y que no hay transiciones d-d en UV-vis observables asociadas con un ion Cu²⁺ en el centro modificado (Figura 29) no puede excluirse que solo el sitio activo esté totalmente ocupado. En este caso las dos señales EPR deben corresponder a cierta falta de homogeneidad en este centro.

El hecho que en los modelos estructurales de ambas variantes no se observan modificaciones significativas en los residuos que coordinan los Cu en los centros y en los ubicados en sus cercanías considerados relevantes para la catálisis, es un hecho importante que permite adjudicar los resultados experimentales obtenidos solo a la mutación de los aminoácidos. En otras palabras, resultados experimentales como la falta de actividad catalítica pueden ser atribuidos solo al efecto de la mutación y no, por ejemplo a modificaciones estructurales de residuos como el Asp_{CAT} o His_{CAT} originadas como consecuencia de las mutaciones. De esta manera, los resultados estructurales nos permitieron complementar los experimentales. Es así como se puede discutir la inhomogeneidad de la señal de EPR del T2Cu en H171D. Los estudios computacionales sugieren la posibilidad de poblaciones de proteínas en las cuales el Asp171 presentaría diferentes conformaciones de coordinación con el Cu o bien la molécula de H₂O unida al T2Cu podría unirse en diferentes posiciones. Para esta variante los resultados computacionales permiten también discutir algunas de las razones a las que se puede deber la falta de actividad catalítica. Tres posibles causas por la que se produciría la inactivación de la proteína derivan de los resultados experimentales. Una de ellas es la falta de interacción T2Cu-NO₂⁻ sugerida a partir de la ausencia de cambios en el espectro de EPR durante la reacción de la proteína con el sustrato (sección IV.5.4.4). Los estudios computacionales permiten descartar esta posibilidad al demostrar que tal interacción no presentaría ningún impedimento energético, esto permite plantear las otras dos posibilidades. La segunda posibilidad es la inactivación del sitio activo, producto de la mutación, que se observa en el ensayo cinético con MV (sección IV.5.5) y de las reacciones de oxidación con sustrato monitoreadas por EPR (sección IV.5.4.4). En este caso, la incapacidad del sitio para reducir el sustrato unido se atribuyó al potencial de reducción más negativo que presenta la componente T2Cu^{H171D}. La tercera posibilidad planteada para explicar la falta de actividad es el impedimento de la TE T1Cu→T2Cu sugerida a partir de los resultados negativos en la cinética utilizando a *SmPaz* como dador electrónico (sección IV.5.5). En el modelo estructural se observa que tanto la Cis como el Asp coordinan el Cu en los respectivos sitios, por lo que el bloqueo de la TE debería ser producto de modificaciones estructurales impuestas por la mutación en el camino Cis-Asp. La notable ausencia del puente de hidrógeno N_{δ1}H...O=C, considerada indispensable en la TE intraproteína de las NirK verdes, en el modelo estructural obtenido para esta variante sugiere que podría ser una posible causa al impedimento de la TE.

El modelo estructural obtenido para C172D también permite complementar los resultados experimentales. En este caso para explicar la inhomogeneidad de la señal de EPR del T2Cu se ha planteado dos posibilidades, una es que el Cu solo se incorpore al T2Cu y en este caso la doble señal de EPR se deba a modificaciones estructurales. Sin embargo también es posible pensar que el Cu sea incorporado al sitio modificado y las dos componentes espectrales correspondan a cada uno de los sitios. Los dos modelos estructurales obtenidos, uno con Cu coordinado solo en el T2Cu y la otra estructura con Cu en los dos sitios, demostraron que ambas posibilidades son igualmente estables.

Estos resultados refuerzan la posibilidad de tener una población de moléculas de proteínas con Cu en los dos sitios o en uno de los sitios. Teniendo en cuenta estas posibilidades la falta de actividad frente a *SmPaz* podría deberse a la ausencia del T1Cu o bien a la presencia de un sitio cuyas modificaciones impuestas por la mutación lo inhabilitan como centro de TE. Esta variante resultó activa con MV (sección IV.5.5), lo que determina que la proteína presenta un T2Cu catalíticamente funcional y que a su vez el sitio activo puede actuar como tal sin la intervención del T1Cu.

IV.5.6.2- Modelo estructural obtenido para *BjNirK*

El modelo estructural para *BjNirK* se obtuvo empleando la misma metodología utilizada para obtener la estructura de *SmNirK*. La estructura se obtuvo a partir de su homología con *AxNirK* (PDB: 1BQ5) y con valor de rms de 0.3 Å. En la Figura 36 se muestra la estructura de los dos sitios de Cu para *BjNirK* superpuesta con la estructura de *SmNirK*. Ambas enzimas comparten una estructura similar en lo que respecta al entono de coordinación de los centros y residuos pertenecientes a la segunda esfera de coordinación considerados relevantes para la catálisis. Notar que el puente Cis-His en ambas proteínas contienen el puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$.

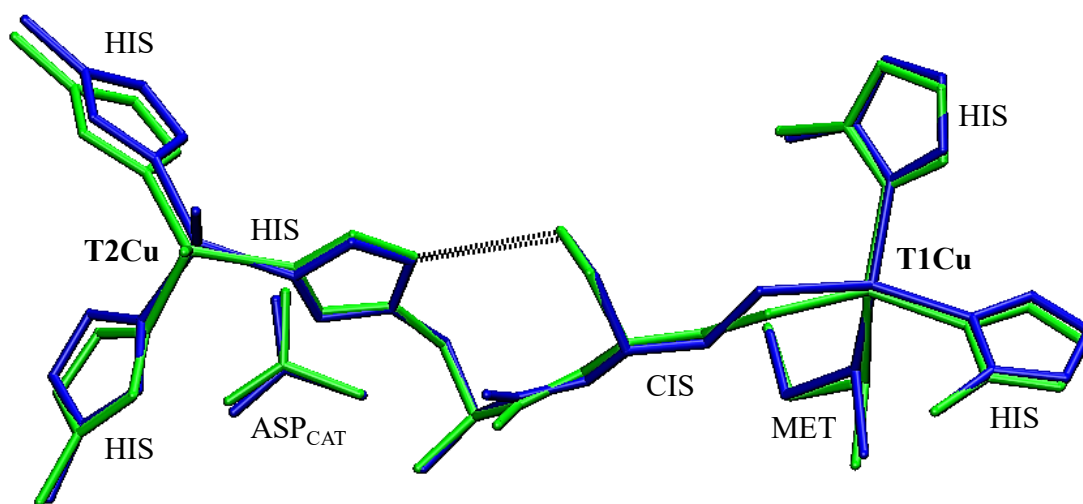


Figura 36. Superposición de estructuras obtenidas para *SmNirK* (verde) y *BjNirK* (azul). El puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$ se presenta en líneas de puntos.

IV.6- Estudios de la dependencia de la actividad catalítica con el pH

Como ya se ha discutido (sección I.3.3), la actividad catalítica de las NirK es dependiente del pH. Hasta el momento esta dependencia fue adjudicada a los residuos Asp_{CAT} e His_{CAT} por su función clave de transferir los protones requeridos para la reducción del nitrito (Figura 11). Dado los resultados obtenidos para las variantes de *SmNirK*, se ha observado que modificaciones en la vía estructural Cis-His podrían tener relevancia en la TE intraproteína y por consiguiente en la actividad catalítica. De aquí que uno de los interrogantes planteados en los objetivos fue evaluar la relevancia de este puente estructural en la dependencia de la actividad catalítica con el pH del medio de reacción (objetivo específico V). Como se ha expuesto previamente (sección I.3.2.), en este puente estructural coexistirían dos vías alternativas por las que pueden ocurrir la TE dependiendo de la configuración electrónica del T1Cu. En los modelos estructurales obtenidos para las dos NirK (Figuras 35 y 36) se observa que ambas vías están presentes independientemente del color. De estas vías, el puente de hidrógeno N_{δ1}H...O=C es la única estructura que podría ser modificada al variar el pH del medio de reacción. Siguiendo este razonamiento, la relevancia de la estructura N_{δ1}H...O=C en el proceso de TE en *SmNirK* y *BjNirK* se evaluó mediante estudios cinéticos monitoreados por espectroscopía de absorción UV-vis y EPR a pH 6 y 10.

IV.6.1- Caracterización espectroscópica de *SmNirK* y *BjNirK* a pH 10

En la Figura 37 se muestran los espectros de EPR de *SmNirK* y *BjNirK* a pH 10 (espectros negros), condición en la cual ambas enzimas se tornan inactivas. Con el fin de caracterizar cambios en parámetros espectroscópicos debidos a modificaciones en la estructura electrónica de los centros de las NirK, se realizó la simulación de los espectros a este pH. En la figura se presentan los espectros con las respectivas simulaciones en colores, cuyos parámetros más importantes fueron incluidos en la Tabla 9. Las simulaciones se realizaron considerando tres componentes espectrales, una componente correspondiente al T1Cu y dos para el T2Cu (T2Cu_I y T2Cu_{II}). En la figura, los espectros verdes y azules corresponden a los espectros obtenidos a partir de la simulación de la señal T1Cu. Dado que los parámetros de simulación para este sitio son similares a los obtenidos en la simulación de los espectros a pH 6, se concluye que este sitio no sufre modificaciones en su estructura electrónica con el cambio del pH. La misma observación se obtienen a partir de los espectros de absorción UV-vis por lo que, y como ya ha sido mencionado, este sitio no presenta en su entorno elementos que pueden ser afectados por el equilibrio ácido-base y modifiquen su estructura electrónica.

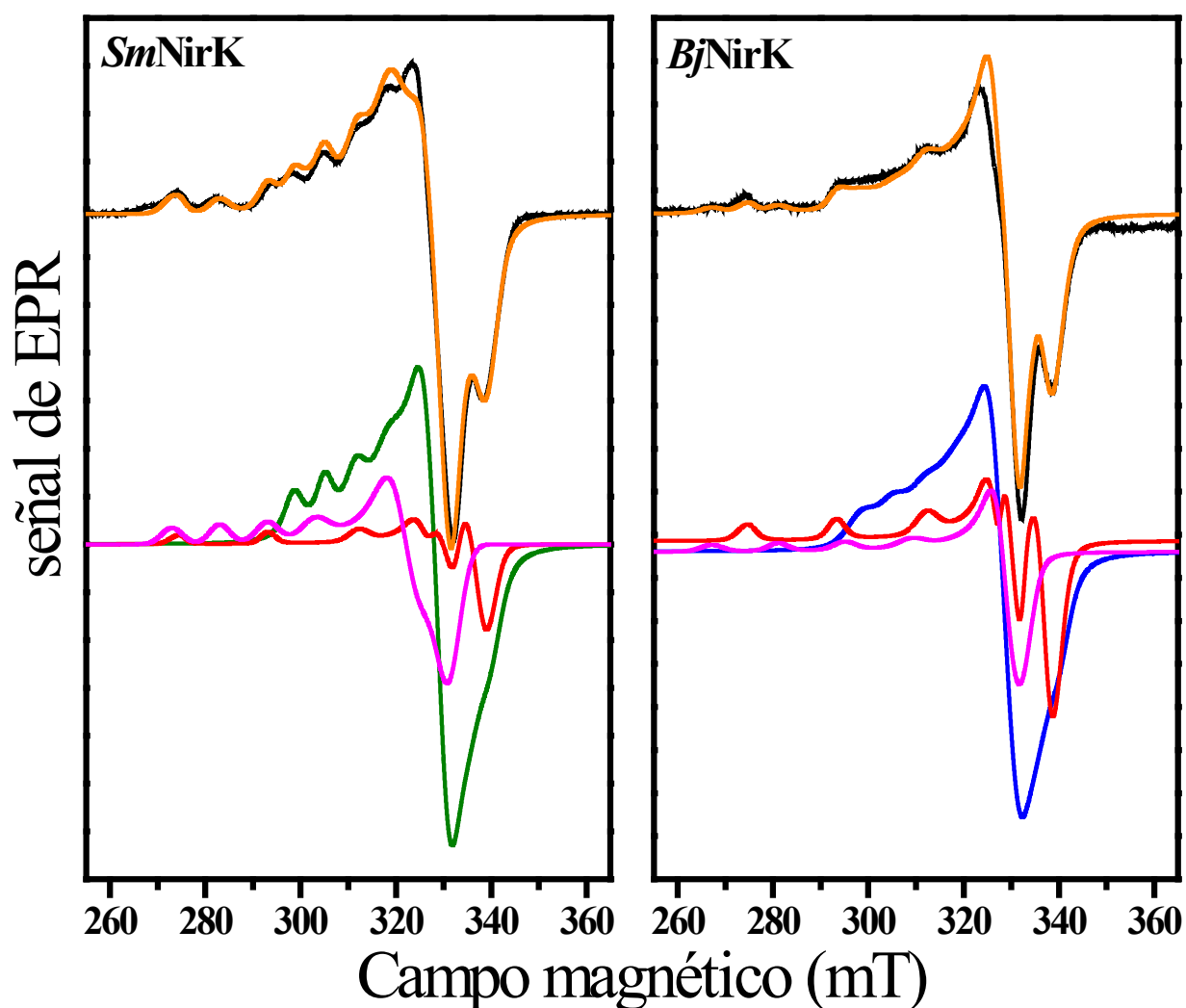


Figura 37. Espectros de EPR a pH 10 de *SmNirK* y *BjNirK* con sus respectivas simulaciones. Negro: experimental, naranja: simulación T1Cu+T2Cu, verde y azul: T1Cu. rojo: T2Cu_I y rosa: T2Cu_{II}. Condiciones experimentales: pH 10, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

Tabla 9. Parámetros de simulación relevantes obtenidos para las componentes espectrales que constituyen los espectros de EPR de *SmNirK* y *BjNirK*. Los colores se corresponden con la Figura 37.

Componentes espectrales	g _{1,2,3} ; A (mT)	
	<i>SmNirK</i>	<i>BjNirK</i>
T1Cu	2.190, 2.052, 2.023; 7	2.190, 2.052, 2.023; 7
T2Cu _I	2.231, 2.056, 2.038; 20.7	2.231, 2.055, 2.040; 20.6
T2Cu _{II}	2.345, 2.105, 2.045; 11.5	2.345, 2.055, 2.055; 16

Para ambas proteínas, las simulaciones de las componentes del T2Cu se presentan en la figura en rojo para el T2Cu_I y rosa para el T2Cu_{II}. En el espectro de *Sm*NirK la señal correspondiente a T2Cu_I se presenta con una intensidad menor respecto a la señal de T2Cu_{II}. Un comportamiento diferente se observa para *Bj*NirK en donde las señales de las dos componentes se presentan con intensidades similares. En las dos proteínas las señales T2Cu_I presentan parámetros de simulación comparables a la señal obtenida en el espectro, tomado en las mismas condiciones, de una solución de sulfato de cobre. Esto podría indicar que esta componente espectral se originaría a partir de los iones Cu liberados de la estructura de la proteína. Sin embargo, debido a que el sitio activo de las NirK se encuentra inmerso en una intrincada red de puentes de hidrógenos (sección I.2.1), las modificaciones observadas en los espectros también podrían deberse a la perturbación de estas interacciones como consecuencia del cambio del pH. La señal T2Cu_{II} en los espectros de las dos NirK, en cambio, presenta parámetros comparables a las señales de los T2Cu obtenidos a pH 6 (sección IV.1.2.2).

Los cambios en las señales correspondientes al T2Cu a pH 10 resultaron reversibles, esto es, al bajar el pH a 6 se obtuvieron espectros con las mismas señales ya caracterizadas en este pH. Lo mismo ocurre con la actividad catalítica de la enzima utilizando MV como dador electrónico, las enzimas se vuelven activas al bajar el pH a 6. Estos resultados permiten concluir que el elevado pH no produce modificaciones estructurales que pongan en juego la integridad estructural del sitio.

IV.6.2- Dependencia de la transferencia electrónica intraproteína con el pH

Las Figuras 38 y 39 muestran los espectros de EPR (panel superior) y de absorción UV-vis (panel inferior) a pH 6 y 10 de la *Sm*NirK y *Bj*NirK, respectivamente, en su forma *as-purified* (espectros *a*), reducidas con ditionito de sodio (espectros *b*) y reaccionadas posteriormente con un exceso molar de nitrito con respecto al agente reductor (espectros *c*). Es importante notar que el ditionito de sodio puede actuar como dador electrónico artificial [22], y por lo tanto los estados en que se detectan los iones Cu (espectros *c*) son la resultante de una enzima que efectuó varios ciclos catalíticos. Estos estudios dan dos tipos de información. Por un lado, se puede saber el estado de oxidación de los iones Cu, los que son evaluados por EPR para el T1Cu y el T2Cu y por UV-vis para el T1Cu. Por otro lado permiten determinar si la enzima es catalíticamente competente, ya que la falta de oxidación del T2Cu implicaría una enzima inactiva. Los espectros a pH 6 de las figuras corresponden a los espectros ya presentados en la caracterización espectroscópica de las enzimas (sección IV.1.2). En estas condiciones, la presencia de las señales correspondientes a los dos sitios en los espectros *c* debido a los iones Cu en el estado Cu²⁺ confirman que ocurrió la reducción del nitrito por el T2Cu y la TE T1Cu→T2Cu. Resultados diferentes se observan al realizar el mismo ensayo a pH 10. A este pH los espectros *c* de EPR solo muestran una recuperación parcial de la señal T2Cu mientras que en los espectros de absorción UV-vis no se observan bandas de absorción correspondientes al T1Cu en el estado Cu²⁺. El resultado de EPR claramente indica que el T2Cu puede reaccionar con nitrito a pH 10, en línea con la estructura de rayos X de *Rs*NirK obtenida a pH>

8 [59]. Además, la ausencia de características de EPR y UV-vis asociadas con un T1Cu oxidado, sumado a que este sitio no es afectado por el pH, confirma que la TE intraproteína no ocurre a pHs altos. El hecho que el nitrito reacciona con el T2Cu a pH 10 confirma que la reducción del nitrito es posible a este pH, aunque evidentemente a una tasa indetectable por los métodos cinéticos empleados, lo cual está indicando que la falta de actividad es debida a una TE intraproteína defectuosa. La capacidad del T2Cu para reducir el sustrato sin la intervención del T1Cu, también se observó en el ensayo cinético de C172D realizado con MV (secciónIV.5.5).

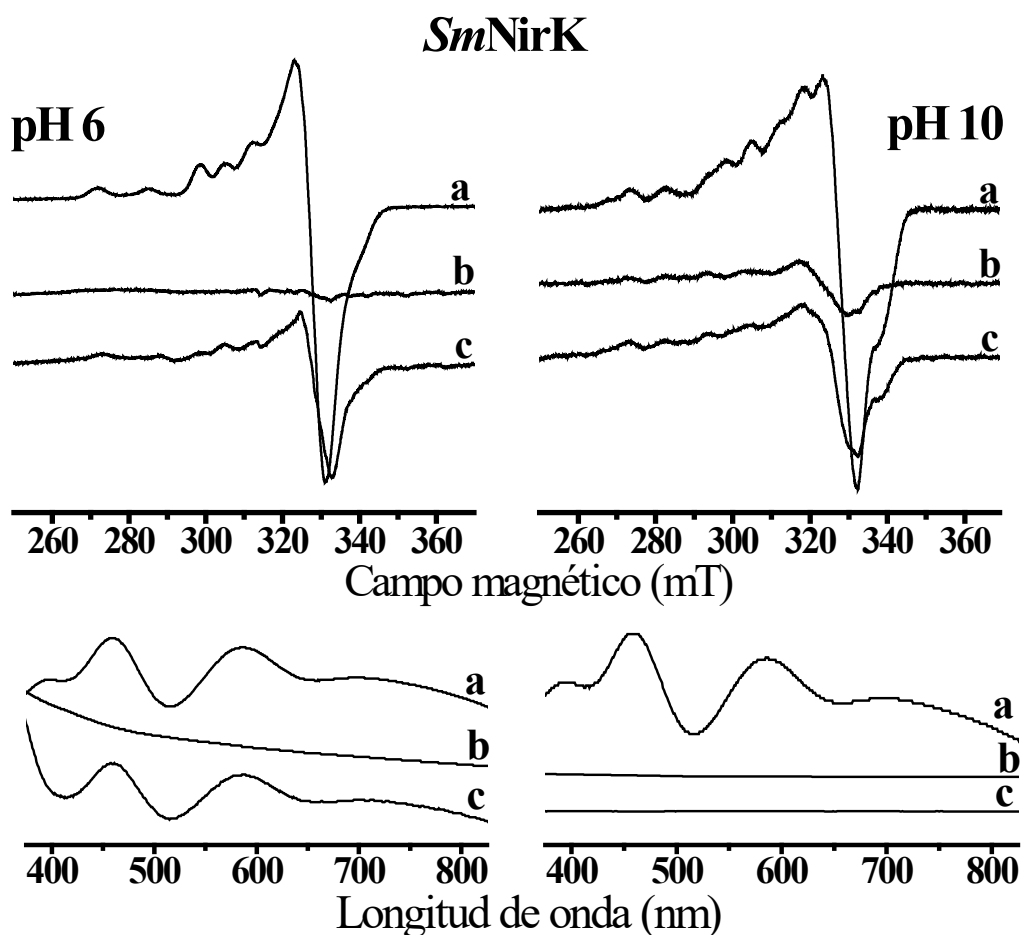


Figura 38. Ensayo de oxidación de *SmNirK* previamente reducida con ditionito de sodio a pH 6 (izquierda) y pH 10 (derecha) monitoreada espectroscopía de EPR (arriba) y de absorción UV-vis (abajo). a- *SmNirK as-purified*, b- *SmNirK* reducida con ditionito de sodio y c- idem b + exceso de nitrito (relación nitrito:ditionito de sodio de 5:1).

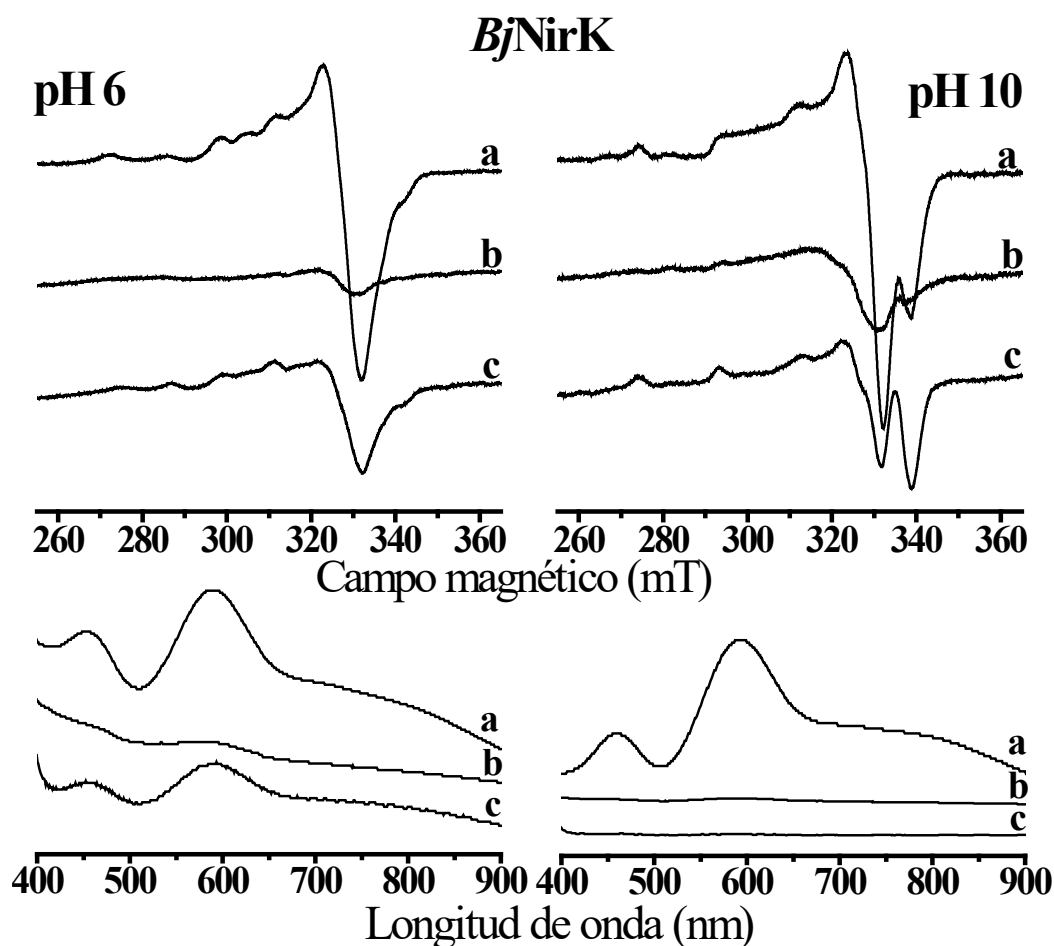


Figura 39. Ensayo de oxidación de *BjNirK* previamente reducida con ditionito de sodio a pH 6 (izquierda) y pH 10 (derecha) monitoreada por espectroscopía EPR (arriba) y de absorción UV-vis (abajo). a- *BjNirK* as-purified, b- *BjNirK* reducida con ditionito de sodio y c- idem b + exceso de nitrito (relación nitrito:ditionito de sodio de 5:1).

Hasta el momento en la bibliografía disponible toda discusión de la dependencia de la actividad catalítica con el pH del medio de reacción se focaliza en el Asp_{CAT} y la His_{CAT}. Se propone que el cambio del pH modificaría su estado de protonación, interfiriendo así en la transferencia de protones al sitio activo requeridos para la reducción del sustrato (sección I.3.3). En las Figura 38 y 39 se observa que el sitio T2Cu a elevados pH puede reaccionar con nitrito independientemente del pH de la mezcla de reacción. Evidentemente en estas condiciones de trabajo estos residuos catalíticos y sus interacciones identificadas como indispensables para la catálisis (sección I.2.1) no son requeridos para que ocurra la reducción ni para unir al nitrito en una conformación catalíticamente favorable.

Nuestros resultados permiten concluir que la falta de actividad a pH > 8 es debida a modificaciones estructurales dependientes del pH del puente Cis-His y, en base a los modelos estructurales obtenidos para ambas NirK (Figura 35 A y 36), la única estructura molecular con estas características en esta vía es el puente de hidrógeno N₈₁H...O=C. Nuestra hipótesis es que a elevados pHs este puente es bloqueado por la transferencia del protón a un grupo aceptor como por ejemplo un grupo carbonilo ubicado en las cercanías del puente Cis-His o una molécula de solvente. Resultados similares han sido propuestos en estudios teóricos de proteínas que contienen Zn y sistemas modelos

que muestran que el pKa del imidazol de la histidina coordinada al metal puede ser reducido facilitando la transferencia del protón a grupos vecinos [83]. En conclusión nuestros estudios sugieren fuertemente que el T2Cu es capaz de catalizar la reducción del nitrito aún sin la intervención de la His_{CAT} y del Asp_{CAT}. Más importante aún es el hecho que tanto la *SmNirK*, enzima verde, como la *BjNirK*, enzima azul, comparten el mismo camino de TE T1Cu-T2Cu.

V- *Conclusiones*

Este trabajo se desarrolló a partir del estudio de dos NirK, una verde (*SmNirK*) y otra azul (*BjNirK*), y sus respectivos dadores electrónicos fisiológicos. Todas las proteínas utilizadas fueron producidas de manera recombinante con genes aislados de dos bacterias desnitrificantes, *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*Sm*) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (*Bj*). La caracterización molecular, espectroscópica y cinética de estas dos enzimas y sus respectivos dadores electrónicos, junto con estudios similares sobre variantes de una de ella realizadas por mutagénesis sitio dirigida nos permitieron obtener información original y relevante respecto a los procesos de TE que forman parte del mecanismo catalítico de las NirK, así como también información a nivel molecular sobre la dependencia de la actividad de la enzima con el pH del medio. Los logros obtenidos no contribuyen solo al conocimiento sobre estas enzimas, sino que también aportan al desarrollo y optimización de técnicas experimentales, ya que se trabajó además en el desarrollo de distintas metodologías que fortalecieron las capacidades del grupo en el estudio y caracterización de metaloproteínas redox en general. A continuación se detallan las conclusiones más importantes sobre el conocimiento adquirido en estas enzimas, junto con los logros experimentales más relevantes que permitieron alcanzar los objetivos planteados.

Objetivo I. Caracterizar a SmNirK y BjNirK y sus respectivos dadores electrónicos fisiológicos, SmPaz y BjCitic₅₅₀. Las dos NirK presentan características moleculares y espectroscópicas similares a las NirK ya caracterizadas y aisladas de otros microorganismos. *SmNirK* es una enzima que ya había sido caracterizada anteriormente en el grupo de trabajo; no es el caso para *BjNirK* cuya caracterización no tiene precedentes. Uno de los problemas que se tenía con la producción de *SmNirK* era que la incorporación de cobre en su estructura no era constante, lo que determinaba que debido a razones del protocolo implementado se obtenían valores menores a los 2 Cu/monómero en algunos casos. En estos casos se debían implementar largos procesos de diálisis para incrementar el contenido de cobre en la proteína, lo que llevaba en algunos casos a perder proteína por precipitación. Para resolver este inconveniente se trabajó en mejorar el protocolo de producción y purificación de esta enzima con el objetivo de normalizar la incorporación de Cu en las proteínas y evitar los pasos de diálisis posteriores.

En paralelo al estudio de *SmNirK* y *BjNirK*, se caracterizaron los dadores electrónicos fisiológicos de ambas enzimas (*SmPaz* y *BjCitic₅₅₀*). Estas proteínas presentan características moleculares y espectroscópicas similares a los dadores ya reportados para otras NirK de microorganismos diferentes. Una de las ventajas desde el punto de vista experimental que presentaron los dadores electrónicos es que estas proteínas son adsorbidas sobre la superficie de electrodos de oro o grafito pirolítico (HOPG) de corte basal. Esto último hizo que se pueda implementar por primera vez en el laboratorio la técnica de voltametría cíclica (sección **IV.2.5**) lo que posibilitó la caracterización electroquímica de los dadores electrónicos. También se trabajó en la adsorción de las NirK a estos electrodos con el objetivo de realizar estudios de electroquímica directa de estas

proteínas. Si bien este objetivo no pudo ser concretado, con los dadores electrónicos adsorbidos pudimos caracterizar la cinética de reacción de las dos NirK mediante métodos electroquímicos (objetivo II). En la búsqueda de alternativas para lograr el contacto directo electrodo-NirK, se iniciaron trabajos para modificar, mediante mutagénesis sitio dirigida, residuos superficiales de la enzima que permitan su adsorción en la superficie del electrodo de oro. Este procedimiento está siendo continuado por un nuevo becario incorporado recientemente al grupo de trabajo.

Objetivo II. Caracterizar la cinética de reducción del NO_2^- llevada a cabo por SmNirK y BjNirK. Otro logro importante obtenido gracias a la adsorción de los dadores electrónicos sobre la superficie del electrodo fue realizar ensayos cinéticos con las respectivas NirK mediante un método simple, rápido y para el cual son requeridas muy pequeñas cantidades de proteínas (sección IV.3.1). Estos ensayos permitieron corroborar que efectivamente las proteínas aisladas como dadores electrónicos son capaces de transferir electrones a las NirK.

La cinética de reducción del nitrito en ambas NirK también se evaluó mediante métodos cinéticos de estado estacionario monitoreados por espectroscopía de absorción UV-vis utilizando los respectivos dadores electrónicos fisiológicos y dadores artificiales como el MV (sección IV.3.2). Los valores de K_M obtenidos al utilizar los dadores electrónicos fisiológicos se encuentran en el orden a los calculados para otros pares NirK-dadores electrónicos. Estos resultados, junto con el hecho de que los genes que codifican para las NirK y los dadores son expresados bajo condiciones desnitrificantes [74, 75], sugieren fuertemente que ambas proteínas funcionan como dadores electrónicos fisiológicos de las respectivas NirK dentro de la célula bacteriana. Los estudios cinéticos monitoreados mediante espectroscopía de absorción UV-vis así como también los ensayos electroquímicos, forman parte de la caracterización de nuevas variantes de SmNirK que han sido obtenidas recientemente. A su vez, las técnicas electroquímicas implementadas para el estudio de las NirK están siendo actualmente utilizadas para el estudio de otras proteínas que forman parte de las líneas de investigación que se desarrollan dentro del grupo.

Objetivo III. Evaluar el efecto de la interacción SmNirK/SmPaz sobre los potenciales de reducción de los sitios de Cu de SmNirK en condiciones catalíticas. La determinación de los potenciales de reducción de los centros de Cu de todas las NirK caracterizadas hasta el momento determinaron que $E^{0'}_{T1Cu} \geq E^{0'}_{T2Cu}$, lo que implica que la TE intraproteína en la enzima sea termodinámicamente desfavorable. Sobre la base de estos resultados se propuso que la unión del sustrato al sitio activo modularía los valores de los potenciales de reducción de manera tal de invertir el orden de los mismos, esto es $E^{0'}_{T2Cu} > E^{0'}_{T1Cu}$, lo que haría termodinámicamente favorable la transferencia $T1Cu \rightarrow T2Cu$. Una de las evidencias experimentales indirecta de esta modulación llevada a cabo mediante espectroscopía de EPR es la publicada en Pinho y col. [54], lo cual no pudo ser corroborado en nuestro caso (sección IV.4). Nuestros resultados en SmNirK sugieren que una modulación similar puede ocurrir, pero como resultado de la interacción SmPaz/SmNirK en presencia

de sustrato. Nuestra hipótesis actual es que perturbaciones estructurales desencadenadas por la interacción enzima/dador /sustrato serían responsables de modular los potenciales de reducción de los centros en ambas proteínas favoreciendo la TE $T1Cu-SmPaz \rightarrow (T1Cu \rightarrow T2Cu)-SmNirK$. Ensayos similares deberían realizarse con el par *BjNirK*-*BjCitc*₅₅₀ para estudiar el proceso de TE entre un citocromo y una NirK azul, ya que el problema continúa aún abierto.

Objetivo IV. Estudiar la relevancia de las interacciones covalentes, no covalentes y coordinación con Cu presentes en el puente Cis- His en la TE intraproteína. Mediante mutagénesis sitio dirigida se logró sustituir la Cis e His del puente que comunica los dos centros en la estructura de *SmNirK* salvaje (*wild type*) por residuos capaces de coordinar los átomos de Cu, y de esta manera modificar el puente manteniendo la comunicación T1Cu-T2Cu. Estas mutaciones no alteraron la estructura cuaternaria de la enzima de acuerdo con los resultados de cromatografía de exclusión molecular en combinación con SDS-PAGE, y los modelos estructurales obtenidos a partir de los estudios *in silico*. Mediante estudios computacionales (sección IV.5.6) también confirmamos que las variantes obtenidas no sufrirían alteraciones a nivel de los residuos pertenecientes a la segunda esfera de coordinación del T2Cu, lo que implicaría que en las variantes obtenidas no debería haber impedimentos en la interacción enzima/dador y enzima/sustrato.

Si bien el Asp es un residuo con potencial capacidad de coordinar el Cu, resultó que de las dos variantes realizadas solo H171D presenta dos átomos de Cu por monómero y características espectroscópicas correspondientes a los dos sitios (sección IV.5.4). La caracterización espectroscópica de esta variante permitió concluir que el T1Cu no fue significativamente alterado por la mutación, mientras que el T2Cu presenta una señal de EPR con modificaciones respecto a la señal correspondiente en el espectro de *SmNirK*. En el modelo estructural obtenido se observó que ambos centros están conectados por el puente Cis-Asp, sin embargo en esta estructura no está presente el puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$ considerado una de las posibles vías de TE en las NirK verdes. A partir de los resultados experimentales y computacionales, se pensó en tres posibilidades para intentar explicar la falta de actividad de H171D obtenida en los ensayos cinéticos. Una podría deberse a la falta de interacción $T2Cu-NO_2^-$, la cual surge dado que no se obtuvieron evidencias experimentales que sugieran tal interacción (sección IV.5.4.4). Esta posibilidad fue descartada a partir de cálculos computacionales que mostraron que el cambio de His por Asp no representa un impedimento para la unión del nitrito al T2Cu. Otra posibilidad podría ser que el T2Cu sea catalíticamente no funcional debido a modificaciones estructurales, la cual surge de los resultados negativos obtenidos en el ensayo cinético utilizando MV como dador electrónico (sección IV.5.5). Teniendo en cuenta que la reducción del sustrato con MV puede ocurrir sin la intervención del T1Cu, tal como se observó en el ensayo con C172D, la falta de actividad del H171D puede deberse a un T2Cu catalíticamente inactivo producto de la mutación. Tal inactivación podría deberse al cambio en el potencial de reducción de la componente del T2Cu con características espectroscópicas comparables al sitio activo de *SmNirK*, y

que podría funcionar como componente catalíticamente activa. Dado que los resultados sugieren que el potencial de esta componente resultó ser más negativo que el T2Cu de la *SmNirK*, este hecho también contribuiría a dificultar la TE entre los sitios. La última posibilidad, que surge de los resultados obtenidos al utilizar a *SmPaz* como dador (sección IV.5.5) y del modelo estructural obtenido, implica que la falta de actividad se deba a la ausencia del puente $N_{\delta 1}H...O=C$ en la estructura Cis-Asp que impediría la TE entre los dos sitios.

Para C172D los resultados son un poco más controversiales dado que no se pudo obtener una proteína con 2 Cu/monómero, lo que lleva a dos posibles explicaciones para las dos señales de EPR asociadas a un T2Cu en esta variante. Los modelos estructurales obtenidos con un Cu solo en el T2Cu o con un Cu en ambos sitios resultaron igualmente estables, por lo que no habría impedimentos para que el sitio modificado coordine el metal, pero tampoco debe excluirse que las dos señales de Cu correspondan a una inhomogeneidad estructural del sitio T2Cu, como se vio en H171D. En otras palabras, esta variante podría estar constituida de una mezcla de poblaciones de proteínas entre las que podrían incluirse proteínas con Cu en los dos sitios potenciales de ligación o proteínas con un único sitio con Cu. Otro factor a tener en cuenta es que el puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$ está presente, por lo que la falta de actividad frente a *SmPaz* (sección IV.5.5) podría deberse a la ausencia de un T1Cu, debido a la gran distancia para efectuar TE desde el T1 de la *SmPaz* al T2Cu de la *SmNirK*, o a la presencia de un sitio metálico modificado incapaz de llevar a cabo la TE. Remarcablemente, esta variante resultó activa al utilizar MV como dador electrónico, lo que determinó que el T2Cu de esta proteína es catalíticamente funcional y a su vez que este sitio puede actuar como tal sin la intervención del T1Cu. Esto último constituye un resultado importante, ya que no se había demostrado actividad catalítica para una NirK en ausencia de un T1Cu. Finalmente, un logro adicional que implicó la concreción de este objetivo fue la implementación de técnicas de mutagénesis sitio dirigida, lo cual no tenía antecedentes en el grupo.

Objetivo V. Evaluar el rol del puente Cis-His en la dependencia de la actividad catalítica con el pH. Para la concreción de este objetivo se estudió la capacidad de reducción del nitrito de las dos NirK a $pH > 8$ en comparación con la correspondiente al pH de mayor actividad de la enzima (pH 5-6) (sección IV.6). Estos estudios se realizaron monitoreando mediante espectroscopías de absorción UV-vis y de EPR el estado de oxidación de los sitios de Cu al final de varios ciclos catalíticos de la enzima. La caracterización espectroscópica de las enzimas a pH 10 mostró además que el T2Cu presenta una estructura dependiente del pH, algo que no ocurre con el T1Cu.

La pérdida de actividad de las NirK a $pH > 8$ hasta el momento ha sido adjudicada a la incapacidad de los residuos Asp_{CAT} e His_{CAT} para proveer los protones necesarios para la reducción del nitrito, lo cual está en contraposición con nuestros resultados que demuestran que ambas NirK presentan un T2Cu catalíticamente funcional a pH 10 (Figura 38 y 39). Nuestros resultados indican además que a este pH la TE entre los dos sitios está interrumpida, porque a $pH > 8$ se produce un

desacople entre los dos sitios de Cu. Esto se demuestra dado que en la reacción con sustrato de las NirK previamente reducida solo se recupera señal de EPR correspondiente al T2Cu sin recuperarse la señal del T1Cu; contrario a lo obtenido en el mismo ensayo realizado a pH 6, condición en la que sí se produce la TE entre los dos sitios y se recuperan las señales de los dos sitios. Dado que la única característica estructural que potencialmente es dependiente del pH en la estructura Cis-His es el puente $N_{\delta 1}H...O=C$, nuestra hipótesis más firme es que la disrupción del camino de TE debería estar asociada a la pérdida del protón de este puente. Si bien los pKa del grupo NH del anillo imidazol es del orden de 6, se ha discutido a partir de cálculos computacionales que el mismo puede disminuir notablemente en caso de que el anillo imidazol este coordinado a un metal del grupo de los metales de transición y que el medio tenga grupos aceptores de este H^+ , como es el caso de la NirK que muestra varias especies químicas con capacidad de hacerlo en las inmediaciones del puente Cis-His. Otra hallazgo importante fue que las dos NirK, la verde y la azul, presentan el mismo comportamiento a pH 10, lo cual sugiere la relevancia del $N_{\delta 1}H...O=C$ en la TE intraproteína de ambas enzimas (sección **IV.6.2**). Esto constituye una evidencia experimental importante que contradice la hipótesis planteada a partir de estudios computacionales, en la que se concluyó que las NirK verdes y azules utilizan distintas vías para llevar a cabo la TE entre sus dos sitios.

Perspectivas futuras. Sumados a todos los interrogantes descriptos arriba que quedaron abiertos en este trabajo de tesis, se plantearon nuevas hipótesis de trabajo respecto de la interacción enzima/dador electrónico fisiológicos. Durante mi trabajo en el laboratorio realicé además pruebas de TE relacionadas con las interacciones cruzadas NirK-dador electrónico que no son incluidos en este manuscrito. Los ensayos cinéticos monitoreados por electroquímica y espectroscopía han sido contundentes al mostrar la habilidad de cada dador electrónico para transferir electrones a las NirK independientemente de su origen y color, lo cual revela una alta “promiscuidad” de los dadores electrónicos a la hora de efectuar la TE. Esta observación abre un abanico de interrogantes sobre los factores que influyen tanto en las interacciones dinámicas y transitorias involucradas en la formación del complejo dadores electrónicos/NirK como en la TE interproteínas. Todo esto, como se mencionó en la introducción, constituye otro de los puntos centrales en la investigación de los procesos de TE en enzimas, y permitieron abrir una nueva línea de trabajo dentro del grupo en la cual estoy involucrado actualmente.

VI- *Anexos*

ANEXO I.

VI.1.1- Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Se utilizaron tres cepas de *E. coli* para el clonado y la expresión de proteínas recombinantes cuyos genotipos se detallan en la Tabla VI.1.1.

Tabla VI.1.1. Características y uso de las cepas de *E coli* utilizadas.

Cepa <i>E coli</i>	Genotipo	Uso
Top10 F' (Invitrogen)	[lacIqTn10(TetR)] mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDAM15 DlacX74 recA1 deoR araD139 D(ara-leu)7679 galUgalKrrpsL (StrR) endA1 nupG.	Replicar ADN plasmídico y reserva celular del mismo
BL21(DE3)(Agilenttechnologies)	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcmompThsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal λ(DE3).	Expresión de proteínas recombinantes
BL21Gold(DE3) (Agilent technologies)	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompThsdS(rB ⁻ mB ⁻) dem ⁺ Tetr galλ(DE3) endA ^H te.	

Los plásmidos utilizados para el clonado y la expresión de proteínas se detallan a continuación:

- pJET 1.2 Blunt (Thermofisher): utilizado para realizar el clonado de los productos obtenidos de la PCR generados por Taq (Pfu) ADN polimerasa. Confiere resistencia a ampicilina.
- pET-22b(+) (Novagen): utilizado para sobre-expresar proteínas recombinantes en forma soluble y activa. Confiere resistencia a ampicilina.
- pEC86: Utilizado como vector *helper* en la expresión de citocromos en *E coli* cuyo crecimiento se realiza en condiciones aeróbicas. Este vector contiene los genes *ccmABCDEFGH* de *E. coli* corriente abajo del *promotor tet* los cuales son esenciales en la maduración de citocromos [84].

VI.1.2- Medios de cultivo, inductores y antibióticos usados para el crecimiento de *E. coli*

En la Tabla VI.1.2 se detalla la composición de los dos medios de cultivos utilizados para el crecimiento de bacterias. El medio ZYM-5052 es un medio de cultivo de alta densidad y autoinducción [85]. Ambos medios de cultivos fueron utilizados para el crecimiento de células y expresión de proteínas recombinantes en grandes volúmenes. El medio LB también fue utilizado para cultivos pequeños requeridos para la obtención de células competentes y extracción de ADN plasmídico. El aislamiento de colonias en medio sólido se realizó en medio LB modificado suplementado con agar-agar en placas de petri incubando a 37 °C durante toda la noche.

Tabla VI.1.2. Composición de los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de microorganismos.

	Reactivos	Concentración (g/L)
<i>LB modificado</i>	Peptona	10
	Extracto de levadura	5
	NaCl	10
	Agar- agar (para medio sólido)	15
<i>ZYM-5052</i>	Peptona	10
	Extracto de levadura	5
	MgSO ₄	120.4
	Glicerol	250
	Glucosa	25
	Lactosa (Inductor)	100
	Na ₂ HPO ₄	177.5
	KH ₂ PO ₄	170
	NH ₄ Cl	134
	Na ₂ SO ₄	35.5

Los medios de cultivos fueron suplementados con antibióticos, solución de CuSO₄ y FeCl₃ cuando fue requerido. Los antibióticos utilizados fueron ampicilina y cloranfenicol a una concentración final de 100 µg/mL y 34 µg/mL, respectivamente. La inducción de la expresión de proteínas fue realizada con Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 48 mg/L (0.2 mM).

VI.1.3- Obtención de células competentes y transformación

Para hacer competente las células, se realizó un preinóculo de *E. coli* en medio LB el cual se cultivó durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm. El cultivo saturado así obtenido fue diluido 1/50 en 10 mL de medio LB modificado estéril y se lo mantuvo en las mismas condiciones de crecimiento hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.4-0.6. Posteriormente las células fueron incubadas en hielo durante 10 min, centrifugadas a 5000 rpm por 5 min a 4 °C y resuspendidas en 15 mL de tampón CMG estéril (50 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂). Luego las células se recolectaron mediante centrifugación en las mismas condiciones y se resuspendieron nuevamente en 3.5 mL de tampón CMG. Las células se mantuvieron durante 5 min en hielo y se agregaron 170 µL de DMSO estéril frío. Las células resuspendidas fueron fraccionadas en alícuotas de 250 µL en tubos de plástico estériles, congeladas con N₂ líquido y almacenadas en freezer a -80 °C.

La transformación de estas células competentes se logró mediante la incubación de las mismas con aproximadamente 4 ng de ADN plasmídico en hielo durante 30 min. Luego se efectuó un *shock* térmico 40 s a 42 °C seguido de incubación durante 3 min en hielo. Las células fueron reactivadas mediante la adición de 750 µL de medio LB fresco e incubación a 37 °C durante 1 h en

agitación a 200 rpm. Por último las células fueron sembradas en medio sólido LB-agar suplementado con el antibióticos correspondientes e incubadas a 37 °C durante toda la noche.

VI.1.4- Extracción de ADN plasmídico.

Para extraer el ADN plasmídico de las bacterias *E. coli* Top10 transformadas con las diferentes construcciones (Tabla IV.1, sección materiales y métodos) se utilizó un kit comercial (Nzytech) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido fue conservado a -20 °C hasta su uso.

VI.1.5- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las muestras de ADN obtenidas a partir de PCR, luego del tratamiento con enzimas de restricción o a partir de extracciones fueron separadas electroforéticamente en geles de agarosa 2% (p/v) utilizando marcadores de ADN (Thermo Fisher Scientific) y solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl a pH 8; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA). La visualización de las bandas de ADN se realizó utilizando GelGreen (BIOTIUM) como fluoróforo bajo luz azul (400-500 nm) utilizando un transluminador.

VI.1.6- Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN se utilizó para confirmar las secuencias de los genes clonados luego de su amplificación a partir de ADN genómico y para confirmar la presencia de las mutaciones realizadas. Una alícuota de ADN plasmídico (~200 µg/mL) se envió al INTA Castelar para su secuenciación mediante electroforesis capilar utilizando nucleótidos específicos.

VI.1.7- Metodologías utilizadas para el análisis de proteínas.

VI.1.7.1- Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el método de Lowry [86] utilizando albúmina sérica bovina como proteína patrón (0- 0.5 mg/mL). La determinación se realizó siempre con un error menor al 10 %.

Una vez caracterizadas las proteínas, la concentración también fue estimada mediante espectroscopía de absorción UV-vis utilizando los ϵ correspondientes.

VI.1.7.2- Determinación de la masa molecular aparente.

La masa molecular de las proteínas fue determinada por cromatografía de filtración en gel. Se utilizó una columna pre-empacada Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) conectada a un Aktabasic (GE Healthcare) y marcadores de masa molecular (Genbiotech). La columna se equilibró con tampón 150 mM NaCl - 50 mM PBS a pH 7. Los marcadores moleculares utilizados para la calibración fueron: ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbumina (75 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) y ribonucleasa A (13.7 kDa). La elución isocrática fue realizada a un flujo de 0.4 mL/min con detección a 280 nm. La masa molecular de las subunidades fue determinada mediante SDS-PAGE.

VI.1.7.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).

SDS-PAGE se utilizó para determinar el grado de pureza de fracciones obtenidas durante el proceso de purificación así como también durante la determinación de la masa molecular de la subunidad de la estructura de la proteína. Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 12-15% según la proteína analizada, en condiciones desnaturalizantes y utilizando marcadores de masa molecular de rango medio (Genbiotech).

VI.1.7.4- Determinación del contenido de cobre

El contenido de cobre fue determinado por espectroscopía de absorción atómica utilizando horno de grafito y curva de calibrado realizada con estándares acuosos certificados. Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Analyst 800, mediante el servicio del SECEGRIN, INTEC, CONICET.

VI.1.7.5- Acondicionamiento de proteínas por ultrafiltración.

La ultrafiltración se utilizó para acondicionar y concentrar las muestras de proteínas. Para muestras de grandes volúmenes se trabajó con equipos de ultrafiltración *Amicon* (Millipore), y para muestras de pequeños volúmenes se utilizaron equipos de ultrafiltración *Amicon* (Millipore) para centrífuga. En cada caso se utilizaron dispositivos con membranas de *cut off* adecuado (10 o 30 KDa) según la proteína a concentrar.

VI.2- ANEXO II

VI.2.1- Espectroscopía EPR.

La espectroscopía de EPR permite el estudio de compuestos paramagnéticos, es decir compuestos que poseen electrones desapareados. En las metaloproteínas, los centros paramagnéticos pueden ser parte integral de la misma o producirse transitoriamente como intermediarios de reacción. El primer caso corresponde a las proteínas de Cu como las NirK que contienen, en su estado de oxidado, dos centros con el Cu en su forma Cu^{2+} . Este es un sistema d^9 con un electrón desapareado en el nivel ocupado de más alta energía, el cual es del tipo $d_{x^2-y^2}$ en la mayor parte de los casos.

Las transiciones energéticas de interés en la espectroscopía de EPR provienen de la interacción de los electrones desapareados presentes en las muestras con un campo magnético externo (B) en presencia de microondas de una frecuencia (ν) fija. El espín electrónico (S) de un electrón tiene asociado un momento magnético (μ), propiedad que lo convierte en una especie activa para los experimentos de EPR. Un sistema simple de un electrón con $S = \frac{1}{2}$ presenta dos posibles estados $m_s = -\frac{1}{2}$ y $m_s = +\frac{1}{2}$, ambos con la misma energía en ausencia de B . La existencia de un μ asociado al espín electrónico es la razón por la cual en presencia de un B los estados energéticos se diferencian, fenómeno denominado efecto Zeeman (Figura VI.2.1). La interacción del μ con B se denomina interacción Zeeman, y establece un estado energético de mayor energía cuando el μ se alinea antiparalelo al B ($m_s = +\frac{1}{2}$) y un estado de menor energía cuando el μ se orienta paralelo al B ($m_s = -\frac{1}{2}$). La separación en energía (ΔE) entre estos dos estados está dada por $\Delta E = g \mu_B B$ donde g se denomina factor g , μ_B es el magnetón de Bohr y B es el campo magnético aplicado. En un experimento típico de EPR se irradia la muestra con microondas a frecuencia conocida mientras se varía el campo magnético externo. Dado que la diferencia de energía entre los dos estados del espín varía linealmente con la intensidad de B , la absorción de la radiación ocurre cuando la energía de radiación ($h\nu$) coincide con ΔE . En este caso se cumple la condición de resonancia $\Delta E = g \mu_B B = h \nu$ siendo h la constante de Planck.

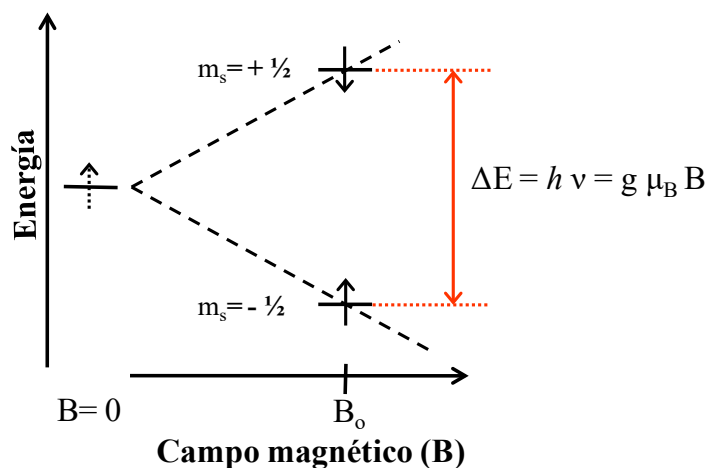


Figura VI.2.1. Niveles de energía para un electrón de espín $S = \frac{1}{2}$ en ausencia ($B = 0$) y en presencia de campo magnético.

El espectrómetro debido a su arquitectura electrónica utiliza la detección sensible a fase y registra la derivada de la línea de absorción (Figura VI.2.2). Este método de detección permite incrementar la sensibilidad del espectrómetro. La Figura VI.2.2 muestra una línea de resonancia típica de EPR en donde se marcan parámetros a evaluar del espectro. Estos parámetros son el B_0 que corresponde al B en donde se obtiene el pico de absorción y el ancho pico a pico (ΔB_{pp}) que está asociado con el tiempo de relajación del espín y el ancho intrínseco de la resonancia. Estos parámetros no son esenciales en nuestro estudio y por lo tanto no serán analizados. Otro parámetro de importancia es el factor g , que se calcula con B_0 a partir de la condición de resonancia (Figura VI.2.2). El factor g tiene un valor de 2,002319 para el electrón libre, desviaciones de este valor aportan información acerca del entorno del electrón en estudio lo que permite distinguir e identificar tipos de muestras [87, 88]. Por ejemplo radicales centrados en el carbono tienen un g cercano al valor de g de los electrones libres, mientras que los radicales nitroxilos presentan un $g = 2.006$. Los iones de metales de transición paramagnéticos tienen muy diferentes valores de g , por ejemplo un ion vanadio tiene un $g = 1.96$ mientras que en Cu^{2+} puede tener un $g \sim 2.3$, dependiendo la geometría del complejo [88].

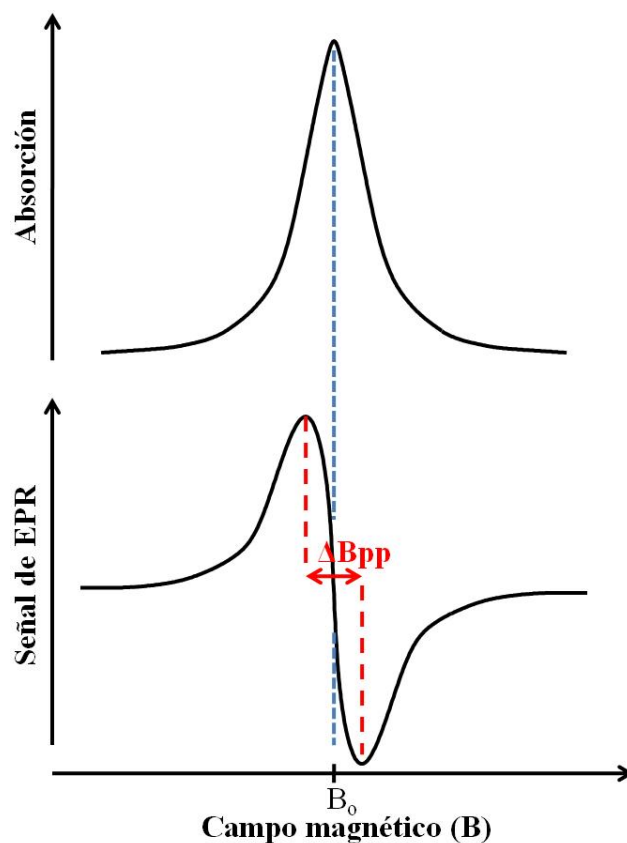


Figura VI.2.2. Arriba. Línea de absorción para un electrón de $S = 1/2$. Abajo. Espectro de EPR, se registra la primera derivada de la línea de absorción.

VI.2.2- Interacción hiperfina

Cuando el centro paramagnético contiene uno o más núcleos en su cercanía con un espín nuclear distinto de cero ($I \neq 0$) ocurre la interacción entre el momento magnético del espín electrónico y el momento magnético del núcleo. Esta interacción da origen a posteriores desdoblamientos de las energías Zeeman y, consecuentemente, a nuevas transiciones. Estas transiciones son responsables de las llamadas estructuras hiperfinas del espectro de EPR. El espín nuclear que origina la estructura hiperfina puede ser del propio núcleo del centro paramagnético (por ejemplo $I=3/2$ para un Cu^{2+}) o pertenecer a un ligando del centro paramagnético, estas interacciones reciben el nombre de hiperfina y superhiperfina, respectivamente. El desdoblamiento en cada estado energético m_s provocado por la interacción con el núcleo ($I \neq 0$) depende de su espín nuclear, produciéndose $2I+1$ subniveles energéticos. De manera análoga a lo que ocurre con un $S = 1/2$, un núcleo con espín nuclear $I = 1/2$ puede adoptar los estados $m_I = -1/2$ y $m_I = +1/2$, cada uno de los cuales presenta un momento magnético asociado (Figura VI.2.3). La presencia de microondas induce las transiciones entre los diferentes estados energéticos, y la señal de EPR se divide en dos señales ubicadas a una distancia a_H de la original (Figura VI.2.4). La constante de acoplamiento hiperfino (A) es igual al espacio entre las dos líneas, es decir $2a_H$. La magnitud de A , depende del tipo de núcleo así como de la densidad de espín electrónico en ese núcleo. Si un segundo núcleo con $I = 1/2$ interactúa con el espín electrónico, cada una

de las señales de la Figura VI.2.4 se divide en un par resultando un espectro con cuatro señales. La regla general es que el número de líneas hiperfinas es igual a $2nI+1$, donde n es el número de núcleos equivalentes. Si el número de núcleos se incrementa, el número de señales aumenta rápidamente. Sin embargo puede ocurrir que las señales se superpongan observándose un número menor de señales al que corresponde [88].

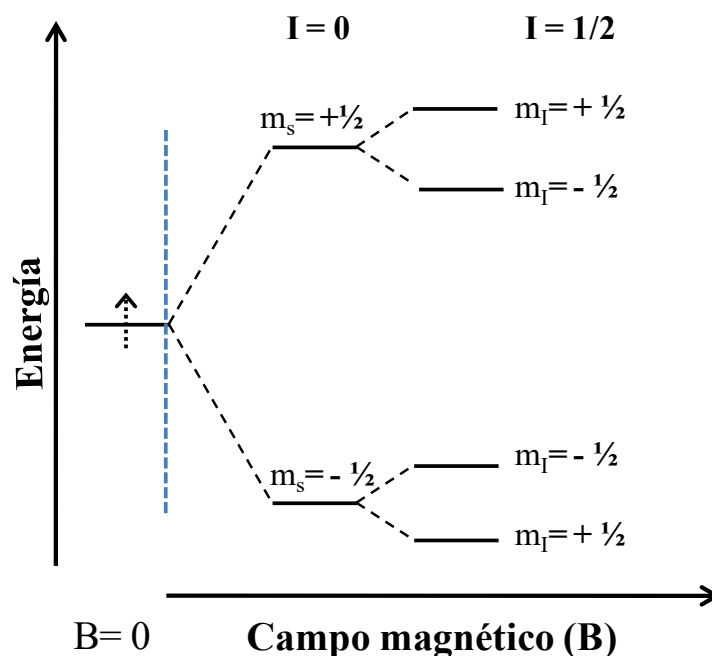


Figura VI.2.3. Niveles de energía para un electrón de espín $S = 1/2$ en ausencia y en presencia de B. Los niveles de energía m_s se desdoblan cuando el espín del electrón desapareado interactúa con el espín nuclear $I = 1/2$ de un núcleo en presencia de campo magnético dando lugar a transiciones que corresponden a las estructuras hiperfinas en los espectros.

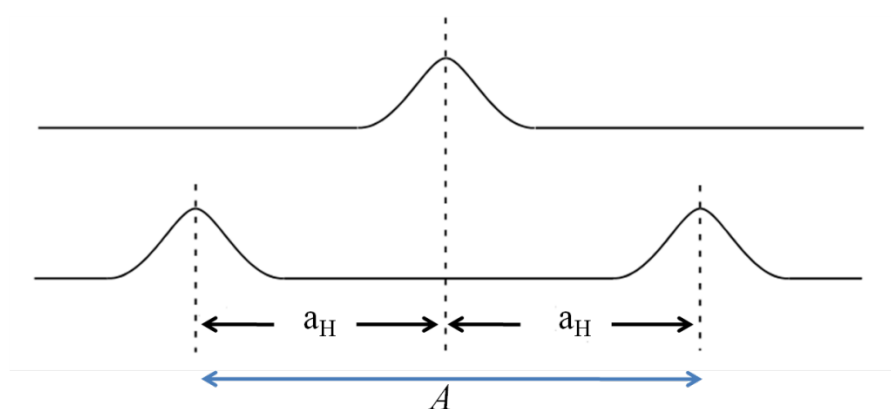


Figura VI.2.4. Desdoblamiento de una señal EPR debido a la interacción del espín electrónico con un núcleo de $I=1/2$.

VI.2.3- Anisotropía del factor g y de la constante de acoplamiento hiperfino A.

Cuando los valores de g y A dependen de la orientación con la cual el B atraviesa la muestra se dice que los parámetros son anisotrópicos. En las soluciones congeladas de muestras biológicas

puede observarse la anisotropía, en estas muestras las moléculas paramagnéticas presentan todas las orientaciones posibles respecto al campo magnético exterior. En este caso los espectros de EPR representan la suma (convolución) de todas las resonancias posibles que puede presentar una molécula paramagnética [87, 89].

En sistemas anisotrópicos los parámetros g y A se describen mediante matrices de \mathbf{g} y \mathbf{A} (3×3) las que se caracterizan por 3 valores principales o autovalores (*eigenvalues*), g_x , g_y y g_z y A_x , A_y y A_z , respectivamente, donde x , y , y z son direcciones características de la molécula que contiene el electrón desapareado que se denominan autovectores (*eigenvectors*) [87]. La Figura VI.2.5 muestra tres diferentes clases de anisotropía en g . En el espectro *a* se cumple que $g_x = g_y = g_z$, esta clase se denomina *isotrópica*. Los valores de g son independientes de la dirección de B y el espectro resultante consiste en una única línea de resonancia. La segunda clase se denomina *axial* (espectro *b* y *c*) y hay un único eje que difiere de los otros dos, en este caso se cumple $g_x = g_y \neq g_z$. El valor de g de este único eje corresponde al g observado cuando el campo aplicado es paralelo al eje de simetría y se denomina al g_z como $g_{//}$. Los g_x y g_y se designan como g_{\perp} , que es el valor de g obtenido cuando el campo aplicado es perpendicular al eje de simetría. En este caso el espectro corresponde a la convolución de los espectros con factores g de cualquier valor entre estos dos extremos. Dado que las orientaciones moleculares correspondiente a g_{\perp} tiene mayor probabilidad con respecto a las de $g_{//}$, el espectro es más intenso en la región de g_{\perp} . La última clase, llamada *rómbica*, ocurre cuando $g_x \neq g_y \neq g_z$ (espectro *d*).

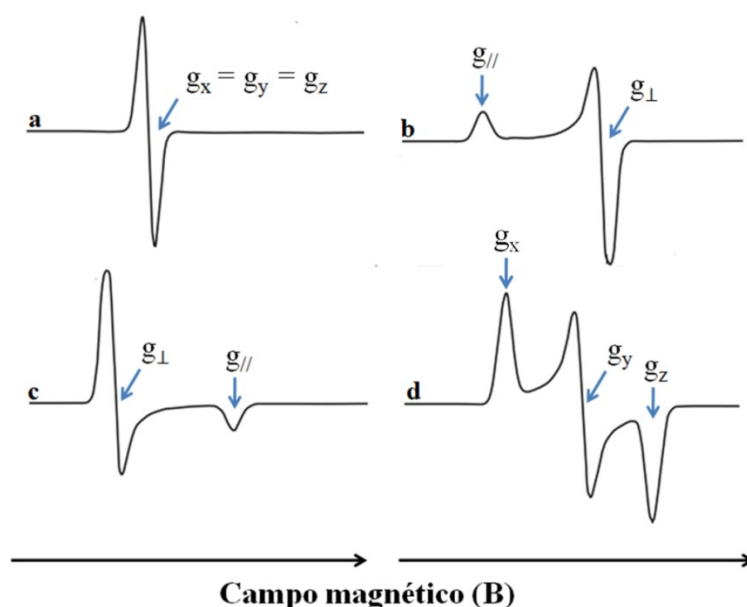


Figura VI.2.5. Anisotropía en los espectros de EPR. a- espectro isotrópico, b y c- espectros con simetría axial con $g_{//} > g_{\perp}$ y $g_{//} < g_{\perp}$, respectivamente y d- espectro con simetría rómbica.

Las consideraciones explicadas para la anisotropía de g , se aplican para los valores A [89]. En la Figura VI.2.6 se muestra el desdoblamiento de la señal de EPR (espectro *a*) a causa de la presencia

de estructuras hiperfinas isotrópicas (espectro *b*) y anisotrópica (espectro *c*) generadas mediante la interacción con un núcleo $I=1/2$.

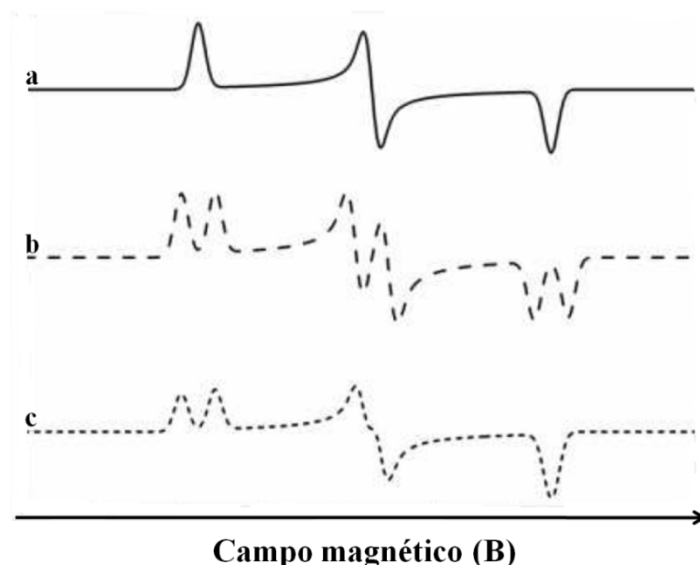


Figura VI.2.6. Anisotropía del parámetro de interacción hiperfina A generadas a partir de la interacción con núcleo de $I=1/2$. a- Espectro sin interacción hiperfina, b- con interacción hiperfina isotrópica y c- con interacción hiperfina anisotrópica.

VI.2.4- Espectrómetro y mediciones.

Los espectrómetros de EPR operan a frecuencia de microondas fija y barren el B modificando su intensidad hasta obtener la condición de resonancia. Cuando se cumple esa condición, se produce la absorción neta de energía por parte de la muestra (Figura VI.2.1).

Un espectrómetro de EPR de onda continua (CW-EPR) (Foto VI.2.1) está compuesto por un electroimán que genera un campo magnético homogéneo sobre la muestra y permite variar su intensidad en un rango determinado, generalmente de 0 a 0.6 T, en los espectros de banda X. La muestra se coloca dentro de una cavidad de resonancia situada entre las piezas polares del electroimán. Esta cavidad se encuentra conectada con el generador de microondas y al detector a través de una guía de ondas. Las dimensiones de la cavidad y la guía están optimizadas para transmitir y almacenar radiación de microondas de una longitud característica, que para Banda X es $\nu \sim 9.5$ GHz y para Banda Q es $\nu \sim 34$ GHz. Como generador de microondas actualmente se utiliza un dispositivo de estado sólido llamado diodo Gunn [87].

El detector es un diodo Schottky cristalino y se utiliza un circulador para conducir la radiación incidente desde el generador hasta la cavidad, y la reflejada desde la cavidad al detector. A este esquema se suman una serie de características, como la modulación del campo magnético estático superponiéndole un campo variable más débil, con el fin de detectar la señal modulada y mejorar la relación señal/ruido, filtros electrónicos, sistemas de atenuación de la radiación incidente, sistema de control automático de frecuencia y sistemas de adquisición y control computarizado de muchos de los

parámetros operativos. Adicionalmente se pueden incluir accesorios como goniómetros para rotar la muestra, crióstatos de He o N₂ líquido. Los sistemas criostáticos cuentan con un Dewar, un recipiente de cuarzo de doble pared, que se inserta dentro de la cavidad y dentro del cual se introduce el tubo de EPR normalmente. Poseen sistemas de medición y control de la temperatura, utilizando resistencias para evaporar He o N₂ y calentarlo a la temperatura deseada. Los sistemas de N₂ se pueden utilizar en el rango de 100 K a 350 o 400 K, y los de He en el rango de 4 K a 300 K.



Foto VI.2.1. Espectrómetro de EPR marca Bruker del Departamento de Física de la FBCB, UNL.

VI.3- ANEXO III

VI.3.1- Fundamentos de la electroquímica

Terminología.

Electrodo: En una celda electroquímica es un material conductor o semiconductor en cuya superficie ocurre la transferencia de electrones, puede actuar como ánodo o cátodo.

Electrodo Estándar de Hidrógeno (SHE): Electrodo de referencia estándar, su potencial se define como 0 V. Todos los potenciales estándares son referidos a SHE.

Electrolito soporte: sustrato iónico (típicamente una sal, como por ejemplo KCl) que está presente en la solución electrolítica para asegurar la conductividad y reducir así la resistencia del sistema.

Ensayos coulombimétricos: Se mide la evolución de la corriente en el tiempo manteniendo constante la diferencia de potencial aplicada, o viceversa, manteniendo constante la corriente se mide la variación de la diferencia de potencial de la celda electroquímica.

Ensayos dinámicos: Implican medidas realizadas a partir de ensayos coulombimétricos o voltamperométricos, operan con la circulación de corriente.

Ensayos estáticos: Implican medidas potenciométricas y operan sin circulación de corriente, es decir cuando el sistema alcanzó el equilibrio electroquímico.

Ensayos potenciométricos: Se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos cuando el sistema alcanzó el equilibrio electroquímico.

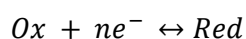
Ensayos voltamperométricos: permite la medición de la corriente al modificar el potencial (a una determinada velocidad de barrido) de la celda electroquímica.

Par redox: Especie química que presenta al menos dos estados de oxidación, puede actuar como oxidante o reductor (dependiendo del estado de oxidación). Ejemplo: $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$

Potencial de reducción estándar (E^0): Se define como el potencial de reducción de una semi-reacción en un electrodo con respecto al SHE. Cada par redox tiene un potencial de reducción estándar.

Reacción redox: reacción química que involucra la transferencia de electrones entre dos pares redox. Cada par redox está involucrado en una semi-reacción de una celda electroquímica.

Si consideramos como ejemplo un ensayo potenciométrico en el cual tiene lugar la siguiente reacción del par redox Ox/Red



Donde Ox es la especie oxidada, Red la reducida y n es el número de electrones (e^-) que se ponen en juego en la reacción. La ecuación de Nernst permite calcular el E [V], el potencial de reducción de una semi-reacción que ocurre en condiciones de equilibrio electroquímico (Ecuación VI.3.1).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (\text{Ecuación VI. 3.1})$$

Siendo E^0 [V] el potencial estándar de la semi-reacción, R [8.3145 Jmol⁻¹K⁻¹] la constante de los gases, T [K] la temperatura absoluta y F [96485.3 C mol⁻¹] la constante de Faraday. En la ecuación los términos a_{Ox} y a_{Red} son las actividades electroquímicas de las especies Ox y Red, respectivamente. La ecuación de Nernst puede escribirse en términos de las concentraciones de cada una de las especies electroactivas (Ecuación VI.3.3) si consideramos que la reacción redox se lleva a cabo en un medio con fuerza iónica elevada. En este caso los coeficientes de actividad (γ) de Ox y Red podrían ser considerados constantes e incluirlos, junto con E^0 , en el término $E^{0'}$ (Ecuación VI.3.3)

$$E^{0'} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Ox}}{\gamma_{Red}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (\text{Ecuación VI. 3.2})$$

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (\text{Ecuación VI. 3.3})$$

Donde los coeficientes de actividad γ_{Ox} y γ_{Red} , y las concentraciones C_{Ox} y C_{Red} corresponden a las especies Ox y Red respectivamente y $E^{0'}$ [V] al *potencial formal de reducción*.

Cuando los métodos electroquímicos dinámicos son utilizados para estudiar procesos redox, la ley de Faraday es de utilidad. La misma establece que la cantidad de corriente que se genera en una celda electroquímica es proporcional al cambio químico que ocurre en la celda. Si estudiamos la semi-reacción considerada anteriormente con un método dinámico, según la ley de Faraday la cantidad de corriente es proporcional al consumo de Ox y a la formación de Red (Ecuación VI.3.4).

$$\frac{i}{nF} = -\frac{dOx}{dt} = \frac{dRed}{dt} \quad (\text{Ecuación VI. 3.4})$$

Donde i [A] es la corriente que circula por el sistema. En los ensayos electroquímicos las corrientes generadas a causa del proceso redox que responden a la Ecuación VI.3.4 se denominan corrientes faradaicas.

El proceso cinético de transferencia de electrones en un experimento electroquímico dinámico se describe mediante la ecuación de Butler-Volmer (Ecuación VI.3.5). Esta ecuación relaciona las cuatro variables fundamentales de una reacción redox que ocurre en la superficie del electrodo: I [C m² s⁻¹] es la densidad de corriente faradaica, E [V], y C_{Ox} y C_{Red} [mol m³] son las concentraciones de las dos especies electro-activas posicionadas en la cercanía de la superficie del electrodo.

$$C_{Red} e^{\frac{nF(E-E^{0'})}{RT}} - C_{Ox} = \frac{I}{nFk^0} e^{\frac{anF(E-E^{0'})}{RT}} \quad (\text{Ecuación VI. 3. 5})$$

donde k^0 [mol s⁻¹] es la constante formal de velocidad del proceso tanto oxidativo como reductivo. La Ecuación VI.3.5 deriva de considerar las velocidades de los procesos de oxidación y reducción, las cuales son dependientes del potencial de trabajo y proporcionales a C_{Ox} y C_{Red} , respectivamente. Las constantes de proporcionalidad se denominan constantes de velocidad (k_{ox} , k_{red}), en la misma se

incluye la dependencia con el E del electrodo en donde ocurre la reacción. Cuando $E = E^0$ se cumple que $k_{ox} = k_{red} = k^0$. Otro término incluido en la Ecuación VI.3.5 es el factor de simetría (α), es un parámetro adimensional con valores entre 0 y 1, a menudo se estima en 0.5.

Para procesos que ocurren muy rápido, k^0 es muy grande y el término derecho de la Ecuación VI.3.5 se aproxima a cero quedando reducida a la ecuación de Nernst. Los procesos redox que funcionan bajo estas condiciones, se denominan procesos reversibles. Por lo tanto si la cinética del proceso que ocurre en la superficie del electrodo es lo suficientemente rápida, la ecuación de Nernst puede ser aplicada aún cuando la corriente no es cero, esto es, el sistema se encuentra cercano a las condiciones de equilibrio electroquímico.

La cinética de reacción que tiene lugar en los ensayos electroquímicos está afectada por el transporte de las especies electro-activas en la solución electrolítica. Estos mecanismos no son considerados en la ecuación de Butler-Volmer [90].

VI.3.2- Mecanismos de transferencia de masa.

El movimiento del analito hacia la superficie del electrodo de trabajo en un ensayo electroquímico es controlado por tres mecanismos de transporte de masa:

- *Migración*. Es el movimiento de partículas cargadas en respuesta a un campo eléctrico. La velocidad de migración dependerá de la carga y tamaño del ion y de la magnitud del campo aplicado. Este mecanismo es minimizado al trabajar con elevadas concentraciones de electrolitos soportes.

- *Convección*. Se da por el movimiento físico de la solución electrolítica. En la práctica la convección puede ocurrir por agitación mecánica o burbujeo de gas en la solución electrolítica. La magnitud de este mecanismo se minimiza al trabajar sin agitación mecánica y preservando la inmovilización de la solución electrolítica.

- *Difusión*. Es el movimiento espontáneo producto de un gradiente de actividad, y por lo tanto de concentración, del analito en la solución electrolítica. La difusión es direccionada por la entropía del sistema, por lo que el movimiento de solutos será desde áreas de elevadas actividades a zonas de bajas actividades. De esta manera el sistema disminuye la magnitud del gradiente de concentración de los solutos. Este mecanismo de transporte se aplica a iones y solutos no iónicos y siempre está presente en los ensayos electroquímicos [90, 91].

Si asumimos que el ensayo electroquímico dinámico por el cual se estudia la semi-reacción del par redox Ox/Red se lleva a cabo sin agitación mecánica y en presencia de un exceso de electrolito soporte, los efectos de migración y convección serán minimizados. Bajo estas condiciones la transferencia de materia estará gobernada únicamente por la difusión. Las leyes de Fick son la base para discutir los procesos de difusión que tienen lugar en los diferentes dispositivos electroquímicos. La primera ley de Fick (Ecuación VI.3.6) describe el flujo de la especie electro-activa Ox como una función del cambio de su concentración C_{Ox} [mol cm^{-3}] con la distancia x [cm] desde la superficie del electrodo en un tiempo t [s]:

$$J_{Ox} = -D_{Ox} \frac{\partial C_{Ox}}{\partial x} \quad (\text{Ecuación VI. 3.6})$$

donde J_{Ox} [mol cm⁻² s⁻¹] es el flujo de la especie Ox y D_{Ox} [cm² s⁻¹] es el coeficiente de difusión. Dado que C_{Ox} también depende del tiempo, la segunda ley de Fick establece esta dependencia (Ecuación VI.3.7) [90].

$$\frac{\partial C_{Ox}}{\partial t} = D_{Ox} \frac{\partial^2 C_{Ox}}{\partial x^2} \quad (\text{Ecuación VI. 3.7})$$

VI.3.3- Celda electroquímica

El equipamiento utilizado en nuestros estudios para realizar ensayos electroquímicos consiste en una celda electroquímica con tres electrodos inmersos en una solución electrolítica suplementada con el electrolito soporte. Los tres electrodos se definen como:

- *Electrodo de referencia.* Su potencial es constante, estable, conocido, reproducible y es usado como referencia para determinar el potencial del electrodo de trabajo. Los electrodos de referencia más comúnmente usados en ensayos en solución acuosa son los electrodos de calomel (Hg/HgCl₂) y electrodo de Ag/AgCl_(s).
- *Electrodo de trabajo.* Su potencial es controlado y puede ser variado durante el ensayo. En su superficie limpia y bien definida se lleva a cabo la reacción redox objeto de estudio. Comúnmente este electrodo está compuesto de un material como grafito altamente orientado (HOPG), oro policristalino o platino, los cuales deben ser inertes en el rango de potenciales de trabajo.
- *Contraelectrodo o electrodo auxiliar.* Constituido por una superficie inerte, generalmente platino, su propósito es completar el circuito eléctrico con el electrodo de trabajo [92, 93].

VI.3.4- Adsorción de proteínas a la superficie del electrodo.

Los estudios electroquímicos son herramientas de gran utilidad para obtener información termodinámica y cinética de las enzimas redox. La adsorción de la enzima de interés sobre la superficie del electrodo ofrece ventajas respecto a los ensayos en los cuales la enzima se encuentra disuelta en la solución electrolítica, dado que se minimizan o eliminan los efectos de difusión en las determinaciones [68]. Distintas son las metodologías que se han desarrollado para adsorber las enzimas sobre la superficie de un electrodo [94]. El mecanismo de adsorción adecuado será aquel que permita que la enzima conserve su capacidad catalítica al ser adsorbida y que facilite una orientación de la proteína de manera tal que los centros redox queden a una distancia óptima para la TE desde/hacia la superficie del electrodo. Este último aspecto es por lo que suele ser difícil lograr la adsorción de enzimas de masa molecular elevada. Otro aspecto determinante en la elección del método de adsorción es la interacción enzima- electrodo, la cual debe ser estable en las condiciones de trabajo [94, 95].

Una de las metodologías de adsorción más simples consiste en tratar químicamente la superficie del electrodo y de esta manera conferirle propiedades (carga global adecuada o grupos

funcionales específicos) que promuevan la adsorción de las proteínas. Distintos compuestos pueden ser utilizados como promotores de la adsorción. Los ensayos cinéticos electroquímicos que forman parte de este trabajo se realizaron a partir de la interacción de las NirK con los dadores electrónicos fisiológicos adsorbidos en la superficie del electrodo previamente tratadas con 4,4'-ditiopiridina. En la Figura VI.3.1 se presenta un esquema del funcionamiento del sistema utilizado para realizar los ensayos cinéticos mostrando a una Paz como la proteína adsorbida. Un mecanismo de funcionamiento similar se espera para el sistema en donde el dador electrónico adsorbido es *BjCitc*₅₅₀.

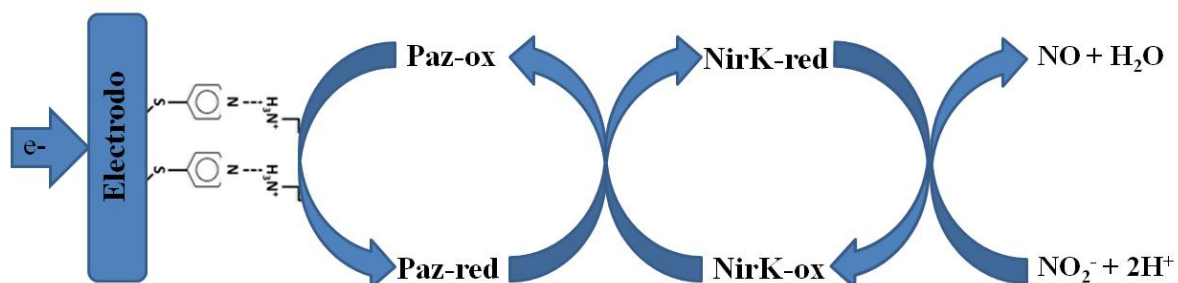


Figura VI.3.1. Esquema de funcionamiento del sistema utilizado para los ensayos cinéticos electroquímicos. La terminación -ox y -red hacen referencia a la forma oxidadas y reducidas de las proteínas, respectivamente.

VI.3.5- Técnicas electroquímicas.

A continuación se presenta una breve descripción de las técnicas electroquímicas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis.

VI.3.5.1- Voltametría cíclica.

La voltametría cíclica consiste en barrer de manera lineal y a una dada velocidad de barrido (v) el potencial de un electrodo de trabajo. La variación se realiza de manera cíclica entre dos valores extremos y se registra la corriente resultante a cada valor de potencial, obteniendo un voltamograma [92]. La Figura VI.3.2 muestra el voltamograma obtenido al variar el potencial de un electrodo con *SmPaz* adsorbida en su superficie.

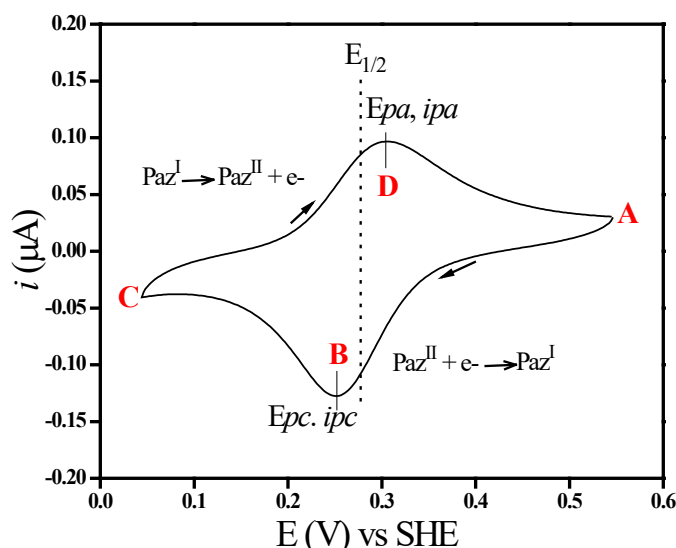


Figura VI.3.2. Voltamograma obtenido a partir de la adsorción de *SmPaz* en la superficie del electrodo de trabajo.

En la figura se observa el voltamograma típico obtenido a partir de un proceso de redox reversible, el mismo consiste en un pico catódico (*pc*) obtenido a partir del proceso de reducción y un pico anódico (*pa*) que se obtiene dada la oxidación del analito previamente reducido, considerando la dirección de barrido de potencial indicadas con las flechas en la figura.

A partir de un voltamograma obtenido de un proceso reversible es posible obtener la siguiente información:

- El potencial formal de reducción ($E^{0'}$) de la reacción redox en estudio tiene un valor aproximado al valor medio de los potenciales de los picos anódicos (E_{pa}) y catódicos (E_{pc}). Es importante mencionar que los valores de potenciales determinados para proteínas redox siempre hacen referencia a potenciales formal de reducción $E^{0'}$ debido a las condiciones de trabajo.
- La separación entre los picos de potencial (E_{pa} y E_{pc}) está relacionada con el número de electrones (n) involucrados en la reacción electroquímica según la Ecuación VI.3.8.

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n} \text{ V} \quad (\text{Ecuación VI. 3.8})$$

- Los valores de la corriente (i) de los picos, i_{pa} y i_{pc} , deberían ser idénticos en un proceso reversible.
- Las ip incrementa con la raíz cuadrada de v según la ecuación de Randles- Ševčík (Ecuación VI.3.9).

$$ip = 0.4463nFAC_0 \left(\frac{nFvD_0}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{Ecuación VI. 3.9})$$

Donde ip es la corriente de pico [A], n es el número de electrones intercambiados, A es el área del electrodo [cm^2], D_0 y C_0 es el coeficiente de difusión y la concentración del analito O, y v es la velocidad de barrido del potencial [V s^{-1}]. Esta ecuación relaciona la variación de ip vs $v^{1/2}$ típico de

un sistema controlado por difusión [91]. Para ensayos en donde la proteína se encuentra adsorbida sobre la superficie del electrodo, según condiciones de trabajo, se puede observar una relación i_p vs v lineal correspondiente a un comportamiento de *capa delgada*. Este último comportamiento es el requerido para obtener parámetros cinéticos de las enzimas adsorbidas dado que los procesos de difusión se encuentran minimizados [68]. Experimentalmente se observa que para electrodos con la enzima adsorbida en su superficie el comportamiento de capa delgada se lo obtiene para v bajas, mientras que para v superiores el sistema presenta un comportamiento controlado por difusión.

En la Figura VI.3.2 se presenta un ensayo de voltametría cíclica realizado a partir de *SmPaz* adsorbida en la superficie del electrodo. El voltamograma cumple con cada uno de los ítems expuestos anteriormente, por lo que se deduce que el par redox *SmPaz* oxidada (Paz^{II})- *SmPaz* reducida (Paz^I) presenta un comportamiento reversible en las condiciones de trabajo. El ensayo se realizó en condiciones de comportamiento de capa delgada, a una v lo suficientemente lenta de manera tal que en cada valor de E trabajamos en condiciones cercanas al equilibrio electroquímico. En estas condiciones la ecuación de Nernst aplicada al sistema (Ecuación VI.3.10) nos permite hacer una interpretación de los eventos redox que ocurren en la superficie del electrodo y proporcionan la corriente farádica registrada en el voltamograma.

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Paz^{II}]}{[Paz^I]} \quad (\text{Ecuación VI. 3.10})$$

En el voltamograma de la Figura VI.3.2 consideramos que todas las moléculas de *SmPaz* se encuentran en su estado oxidado (Paz^{II}) al comienzo del ensayo (punto A). Al cambiar el potencial hacia valores inferiores, en la dirección A-C, la población de moléculas Paz^{II} adsorbidas a la superficie del electrodo comienzan a ser reducidas (Paz^I). La relación $[Paz^{II}]/[Paz^I]$ dependerá en cada instante de tiempo del potencial aplicado según la Ecuación VI.3.10. La transferencia de electrones desde el electrodo a Paz^{II} genera una corriente faradaica que es registrada en relación a los valores del potencial, conformando el voltamograma. Dadas las condiciones del ensayo, en B se cumple que $E_{1/2} = E^{0'}$ y según Ecuación VI.3.10 la $[Paz^{II}]$ es igual a $[Paz^I]$. El mismo razonamiento se aplica al punto D. Para valores de potencial inferiores a B la corriente decae cuando todas las moléculas de Paz^{II} han sido reducidas (punto C). Al modificar el potencial aplicado de manera reversa (desde el punto C a A), una corriente positiva correspondiente a la oxidación de Paz^I se registra y se aplica el mismo razonamiento en cada punto. El mismo análisis también es válido para los voltamogramas obtenidos a partir de *BjCitC₅₅₀* presentados como parte de los resultados en este trabajo.

VI.3.5.2- Cronoamperometría

Esta técnica se utilizó para evaluar la TE y realizar los ensayos cinéticos con los dadores electrónicos y las NirK utilizando un dispositivo como el representado en la Figura VI.3.1.

Los ensayos de cronoamperometría consisten en aplicar en un primer paso un potencial inicial, en el que no ocurre ninguna reacción de tipo faradaico. Una vez alcanzado el equilibrio se produce un pulso de potencial hasta un potencial final, en el cual se estudia el proceso redox de

interés. Se registra la variación de la intensidad de corriente faradaica que ocurre manteniendo el potencial final durante un tiempo determinado. El registro de la intensidad de corriente generada en función del tiempo se denomina cronoamperograma [92].

En ensayos enzimáticos la cronoamperometría puede ser utilizada para determinar parámetros cinéticos registrando la corriente (i) producida frente al agregado de diferentes concentraciones de sustrato trabajando a un potencial constante, según Ecuación VI.3.11.

$$i = nFA\tau \frac{k_{cat}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad (\text{Ecuación VI.3.11})$$

Donde F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, τ representa el área cubierta por las moléculas adsorbidas (área electroactiva) [mol m^2], n el número de electrones que interviene en el proceso, k_{cat} la constante catalítica, K_M constante de Michaelis Menten y $[S]$ la concentración de sustrato. En estos ensayos la corriente limitante es proporcional a $A\tau$, que corresponde al número de moléculas de enzima adsorbida en la superficie del electrodo [96].

En la Figura VI.3.3 se muestra un ensayo de cronoamperometría obtenido a partir del par *SmPaz-SmNirK*. En los ensayos cinéticos corresponde el término corriente catalítica (i_{cat}) para aludir a la corriente faradaica obtenida como consecuencia del consumo de sustrato por la enzima redox. Cada salto de i_{cat} en los cronoamperogramas (Figura VI.3.3, izquierda) se produce como consecuencia del agregado de alícuotas de igual volúmenes de una solución concentrada de sustrato (flechas verdes). En el gráfico de la derecha se presentan los datos de variación de i_{cat} frente a $[S]$. En el cronoamperograma negro, correspondiente a los resultados experimentales, se observa decaimiento de la i_{cat} a elevadas concentraciones de sustratos probablemente debido a la inactivación del film electroactivo. Esta inactivación es producto de la desnaturalización de las enzimas que lo conforman. Estos procesos afectan de manera sistemática los parámetros cinéticos obtenidos en el experimento (Figura VI.3.3 derecha, cronoamperograma negro). Se han desarrollado distintas metodologías que permite corregir resultados obtenidos a partir de ensayos de cronoamperometría eliminando los efectos provocados por la inactivación del film electroactivo [70]. De esta manera, se pueden obtener cronoamperogramas que representan una situación ideal, como por ejemplo sin pérdida de film electroactivo (Figura VI.3.3, izquierda, cronoamperograma rojo), y a partir de los cuales obtener parámetros cinéticos que no estén influenciados por este efecto (Figura VI.3.3, derecha, cronoamperograma rojo).

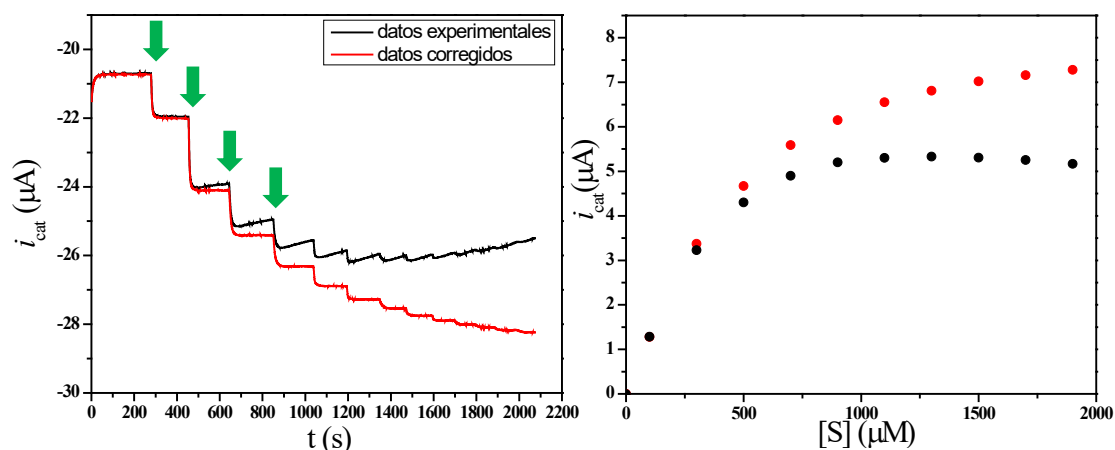


Figura VI.3.3. Izquierda. Ensayos cinéticos realizados mediante cronoamperometría. Cronoamperograma negro obtenido a partir de datos experimentales. Cronoamperograma rojo obtenido a partir de la corrección de los datos experimentales. Derecha. Variación de la corriente catalítica obtenida a partir de los datos experimentales y corregidos frente a $[S]$, los colores se corresponden a la figura izquierda.

Los ensayos cinéticos electroquímicos presentados en este trabajo se efectuaron bajo condiciones de agitación y burbujeo de argón a un flujo constante y utilizando concentraciones elevadas de ClNa como electrolito soporte. Bajo estas condiciones, la migración es minimizada mientras que la convección se convierte en uno de los mecanismos de transferencia de masa dominante en el sistema. En este caso se esperaría obtener un K_M de la enzima similar a los obtenidos en ensayos cinéticos realizados en solución, ensayos donde los mecanismos de transferencia de masa son minimizados. No obstante, los K_M obtenidos en los ensayos electroquímicos resultaron inferiores indicando que la convección no domina completamente la transferencia de masa, y por lo tanto la difusión también influye en la cinética global de reacción. Distintos mecanismos podrían ser responsables de que la difusión del sustrato y producto hacia y desde el sitio activo limiten la cinética de reacción. Un mecanismo podría estar impuesto por la presencia de la membrana de diálisis en la superficie del electrodo, la cual podría interferir en la libre circulación del sustrato hacia la enzima. Otro mecanismo que fomentaría la difusión podría ser originado por la orientación del dador electrónico en la que es adsorbido sobre la superficie del electrodo. Este hecho impondría una orientación determinada en la NirK y, por lo tanto, una orientación y ubicación del sitio activo que podría no ser la óptima para la libre circulación del sustrato y producto.

VII- *Bibliografia.*

- [1] LY Stein, MG Klotz (2016) The nitrogen cycle. *Curr. Biol.* 26: 83-101.
- [2] H Bothe, S Ferguson, W Newton (2007), Biology of the nitrogen cycle, First edit, Elsevier, United kingdom, p 427.
- [3] RM Martinez-Espinoza, JA Cole, DJ Richardson, NJ Watmough (2011) Enzymology and Ecology of the Nitrogen Cycle. *Biochem. Soc. Focus. Meet.* 39: 175-178.
- [4] B Thamdrup (2012) New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43: 407-428.
- [5] JN Galloway (2003), Chapter 8- The Global Nitrogen Cycle, En: Treatise on Geochemistry, (Ed: Heinrich D. Holland, Karl K. Turekian), Elsevier Science, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA, p. 557-538.
- [6] SJ Ferguson (1998) Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 182-193.
- [7] WG Zumft (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.
- [8] P Tavares, AS Pereira, JJG Moura, I Moura (2006) Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J. Inorg. Biochem.* 100: 2087-2100.
- [9] AC Merkle, N Lehnert (2012) Binding and activation of nitrite and nitric oxide by copper nitrite reductase and corresponding model complexes. *Dalt. Trans.* 41: 3355-3368.
- [10] RH Socolow (1999) Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 6001-6008.
- [11] HH Zahran (2009), Chapter 11- Enhancement of Rhizobia–Legumes Symbioses and Nitrogen Fixation for Crops Productivity Improvemen, En: Microbial Strategies for Crop Improvement, (Ed: MS Khan, A Zaidi, J Musarrat), 1.^a ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 358.
- [12] P García-Fraile, E Menéndez, R Rivas (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng.* 2: 183-205.
- [13] BA Averill (1996) Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* 96: 2951-2964.
- [14] AJW Godden, S Turley, DC Teller, ET Adman, MY Liu, J Legall (1991) The 2 . 3 Angstrom X-ray Structure of Nitrite thus are stable to teloplasm propose that the ectoder- Reductase from Achromobacter. *Science* 253: 438-442.
- [15] FE Dodd, J Van Beeumen, RR Eady, SS Hasnain (1998) X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner. *J. Mol. Biol.* 282: 369-382.
- [16] S Suzuki, K Kataoka, K Yamaguchi (2000) Metal Coordination and Mechanism of Multicopper Nitrite Reductase. *Acc Chem Res.* 33: 728-735.
- [17] K Kobayashi, S Tagawa, Deligeer, S Suzuki (1999) The pH-dependent changes of intramolecular electron transfer on copper- containing nitrite reductase. *J.Biochem.(Tokyo).* 126: 408-412.
- [18] S Suzuki, K Kataoka, K Yamaguchi, T Inoue, Y Kai (1999) Structure-function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* 190-192: 245-265.
- [19] K Kataoka, H Furusawa, K Takagi, K Yamaguchi, S Suzuki (2000) Functional analysis of conserved aspartate and histidine residues located around the type 2 copper site of copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem.* 127: 345-50.
- [20] K Kataoka, K Yamaguchi, S Suzuki (2000) Spectroscopic and Electrochemical Properties of Cytochrome c551 from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73: 1839-1840.

- [21] ZH Abraham, DJ Lowe, BE Smith (1993) Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem. J.* 295: 587-593.
- [22] M Prudêncio, R Eady, S Gary (2001) Catalytic and spectroscopic analysis of blue copper-containing nitrite reductase mutants altered in the environment of the type 2 copper centre: implications for substrate interaction. *Biochem. J.* 353: 259-266.
- [23] MA Hough, MJ Ellis, S Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, SS Hasnain (2005) High resolution structural studies of mutants provide insights into catalysis and electron transfer processes in copper nitrite reductase. *J. Mol. Biol.* 350: 300-309.
- [24] ZHL Abraham, BE Smith, BD Howes, DJ Lowe, RR Eady (1997) pH-dependence for binding a single nitrite ion each type-2 copper centre in the copper-containing nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans*. *Biochem. J.* 516: 511-516.
- [25] FE Dodd, SS Hasnain, WN Hunter, ZHL Abraham, M Debenham, H Kanzler, M Eldridge, RR Eady, RP Ambler, BE Smith (1995) Evidence for Two Distinct Azurins in *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB 11015): Potential Electron Donors to Nitrite Reductase. *Biochemistry.* 34: 10180-10186.
- [26] WG Zumft, DJ Gotzmann, PMH Kroneck (1987) Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 168: 301-307.
- [27] G Van Pouderoyen, S Mazumdar, N Hunt, H Hill, G Canters (1994) The introduction of a negative charge into the hydrophobic patch of *Pseudomonas aeruginosa* azurin affects the electron self-exchange rate and the electrochemistry. *Eur. J. Biochem.* 222: 583-588.
- [28] M Kukimoto, M Nishiyama, M Tanokura, ET Adman, S Horinouchi (1996) Studies on protein-protein interaction between copper-containing nitrite reductase and pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6. *J. Biol. Chem.* 271: 13680-13683.
- [29] K Olesen, A Veselov, Y Zhao, Y Wang, B Danner, CP Scholes, JP Shapleigh (1998) Spectroscopic, kinetic, and electrochemical characterization of heterologously expressed wild-type and mutant forms of copper- containing nitrite reductase from. *Biochemistry.* 37: 6086-6094.
- [30] Y Zhao, DA Lukoyanov, Y V. Toropov, K Wu, JP Shapleigh, CP Scholes (2002) Catalytic function and local proton structure at the Type 2 copper of nitrite reductase: The correlation of enzymatic pH dependence, conserved residues, and proton hyperfine structure. *Biochemistry.* 41: 7464-7474.
- [31] S Suzuki, Deligeer, K Yamaguchi, K Kataoka, K Kobayashi, S Tagawa, T Kohzuma, S Shidara, H Iwasaki (1997) Spectroscopic characterization and intramolecular electron transfer processes of native and type 2 Cu-depleted nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 265-274.
- [32] T Kohzuma, C Dennison, W McFarlane, S Nakashima, T Kitagawa, T Inoue, Y Kai, N Nishio, S Shidara, S Suzuki, AG Sykes (1995) Spectroscopic and electrochemical studies on active-site transitions of the type 1 copper protein pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes*. *J. Biol. Chem.* 270: 25733-25738.
- [33] M Kukimoto, M Nishiyama, ME Murphy, S Turley, ET Adman, S Horinouchi, T Beppu (1994) X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochemistry.* 33: 5246-5252.
- [34] HJ Wijma, MJ Boulanger, A Molon, M Fittipaldi, M Huber, MEP Murphy, MP Verbeet, GW Canters (2003) Reconstitution of the type-1 active site of the H145G/A variants of nitrite reductase by ligand insertion. *Biochemistry.* 42: 4075-4083.
- [35] T Kakutani, H Watanabe, K Arima, T Beppu (1981) Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J.*

Biochem. 89: 453-461.

- [36] M Kukimoto, M Nishiyama, T Ohnuki, S Turley, ET Adman, S Horinouchi, T Beppu (1995) Identification of interaction site of pseudoazurin with its redox partner, copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6. *Protein Eng. Des. Sel.* 8: 153-158.
- [37] FM Ferroni, S a. Guerrero, AC Rizzi, CD Brondino (2012) Overexpression, purification, and biochemical and spectroscopic characterization of copper-containing nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011. Study of the interaction of the catalytic copper center with nitrite and NO. *J. Inorg. Biochem.* 114: 8-14.
- [38] FM Ferroni, J Marangon, NI Neuman, JC Cristaldi, SM Brambilla, S a. Guerrero, MG Rivas, AC Rizzi, CD Brondino (2014) Pseudoazurin from *Sinorhizobium meliloti* as an electron donor to copper-containing nitrite reductase: Influence of the redox partner on the reduction potentials of the enzyme copper centers. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19: 913-921.
- [39] MEP Murphy, S Turley, ET Adman (1997) Protein Chemistry and Structure : Structure of Nitrite Bound to Copper-containing Nitrite Reductase from *Alcaligenes faecalis* : MECHANISTIC IMPLICATIONS. *J. Biol. Chem.* 272: 28455-28460.
- [40] S V. Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, SS Hasnain (2005) Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 12041-12046.
- [41] MJ Boulanger, M Kukimoto, M Nishiyama, S Horinouchi, MEP Murphy (2000) Catalytic roles for two water bridged residues (Asp-98 and His-255) in the active site of copper-containing nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 275: 23957-23964.
- [42] MJ Boulanger, MEP Murphy (2003) Directing the mode of nitrite binding to a copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: characterization of an active site isoleucine. *Protein Sci.* 12: 248-256.
- [43] LB LaCroix, SE Shadle, Y Wang, BA Averill, B Hedman, KO Hodgson, EI Solomon (1996) Electronic structure of the perturbed blue copper site in nitrite reductase: Spectroscopic properties, bonding, and implications for the entatic/rack state. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 7755-7768.
- [44] EI Solomon, RK Szilagyi, SD George, L Basumallick (2004) Electronic structures of metal sites in proteins and models: Contributions to function in blue copper proteins. *Chem. Rev.* 104: 419-458.
- [45] EI Solomon (2006) Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: Blue to green to red copper sites. *Inorg. Chem.* 45: 8012-8025.
- [46] Moura I; Moura J. G.; Pauleta S. and Maia (2017), Metalloenzymes in Denitrification. Applications and Environmental Impacts. The Royal Society of Chemistry, Croydon, United Kingdom, p 452.
- [47] L Basumallick, RK Szilagyi, Y Zhao, JP Shapleigh, CP Scholes, EI Solomon (2003) Spectroscopic Studies of the Met182Thr Mutant of Nitrite Reductase: Role of the Axial Ligand in the Geometric and Electronic Structure of Blue and Green Copper Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 14784-14792.
- [48] RG Hadt, SI Gorelsky, EI Solomon (2014) Anisotropic Covalency Contributions to Superexchange Pathways in Type One Copper Active Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 136: 15034-15045.
- [49] S Ghosh, X Xie, A Dey, Y Sun, CP Scholes, EI Solomon (2009) Thermodynamic equilibrium between blue and green copper sites and the role of the protein in controlling function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 4969-4974.
- [50] RH Holm, P Kennepohl, EI Solomon (1996) Structural and functional aspects of metal sites in

- biology. *Chem. Rev.* 96: 2239-2314.
- [51] V Colman, E Costa, Rebeca Chaves, Tórtora Veronica (2015) Roles biológicos del citocromo c: transporte electrónico mitocondrial, muerte celular programada y ganancia de actividad peroxidática. *AnFaMed.* 2(Supl 1):59-70.
 - [52] A Impagliazzo, M Ubbink (2004) Mapping of the Binding Site on Pseudoazurin in the Transient 152 kDa Complex with Nitrite Reductase. *J. Am. Chem. Soc* 126:5658-5659.
 - [53] MJ Ellis, S V. Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, SS Hasnain (2004) Observation of an unprecedented Cu bis-his site: Crystal structure of the H129V mutant of nitrite reductase. *Inorg. Chem.* 43: 7591-7593.
 - [54] D Pinho, S Besson, CD Brondino, B De Castro, I Moura (2004) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135: Evidence for modulation of the rate of intramolecular electron transfer through nitrite binding to the type 2 copper center. *Eur. J. Biochem.* 271: 2361-2369.
 - [55] A Veselov, K Olesen, A Sienkiewicz, JP Shapleigh, CP Scholes (1998) Electronic structural information from Q-band ENDOR on the type 1 and type 2 copper liganding environment in wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry.* 37: 6095-6105.
 - [56] NGH Leferink, C Han, S V. Antonyuk, DJ Heyes, SEJ Rigby, MA Hough, RR Eady, NS Scrutton, SS Hasnain (2011) Proton-coupled electron transfer in the catalytic cycle of *Alcaligenes xylosoxidans* copper-dependent nitrite reductase. *Biochemistry.* 50: 4121-4131.
 - [57] EI Solomon, DE Heppner, EM Johnston, JW Ginsbach, J Cirera, M Qayyum, MT Kieber-emmons, CH Kjaergaard, RG Hadt, L Tian (2014) Copper Active Sites in Biology. *Chem. Rev.* 114: 3659-3853.
 - [58] MJ Boulanger, MEP Murphy (2001) Alternate substrate binding modes to two mutant (D98N and H255N) forms of nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: Structural model of a transient catalytic intermediate. *Biochemistry.* 40: 9132-9141.
 - [59] F Jacobson, A Pistorius, D Farkas, W De Grip, Ö Hansson, L Sjölin, R Neutze (2007) pH dependence of copper geometry, reduction potential, and nitrite affinity in nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 282: 6347-6355.
 - [60] F Jacobson, H Guo, K Olesen, M Ökvist, R Neutze, L Sjölin (2005) Structures of the oxidized and reduced forms of nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 at high pH: Changes in the interactions of the type 2 copper. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 61: 1190-1198.
 - [61] É Lojou, P Bianco (2000) Membrane electrodes can modulate the electrochemical response of redox proteins - direct electrochemistry of cytochrome c. *J. Electroanal. Chem.* 71-80.
 - [62] CS Hanes (1932) Amylase of Germinated Barley . *Biochem. J.* 26: 1406-1421.
 - [63] S Ida (1977) Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin sepharose affinity chromatography. *J. Biochem.* 82: 915-918.
 - [64] K Petratos, DW Banner, T Beppu, KS Wilson, D Tsernoglou (1987) The crystal structure of pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 determined at 2.9 Å resolution. *FEBS Lett.* 218: 209-214.
 - [65] E Vakoufari, KS Wilson, K Petratos (1994) The crystal structures of reduced pseudoazurin from *Alcaligenes faecalis* S-6 at two pH values. *FEBS Lett.* 347: 203-206.
 - [66] T Inoue, N Nishio, S Suzuki, K Kataoka, Y Kai, T Kohzuma (1999) Crystal Structure Determinations of Oxidized and Reduced Pseudoazurins from *Achromobacter cycloclastes*. *J. Biochem.* 274: 17845-17852.

- [67] SR Pauleta, F Guerlesquin, CF Goodhew, B Devreese, J Van Beeumen, AS Pereira, I Moura, GW Pettigrew (2004) Paracoccus pantotrophus pseudoazurin is an electron donor to cytochrome c peroxidase. *Biochemistry*. 43: 11214-11225.
- [68] AM Bond, RG Compton, DA Fiedler, G Inzelt, H Kahlert, Š Komorsky-Lovric, H Lohse, M Lovric, F Marken, A Neudeck, U Retter, F Scholz, Z Stojek (2010), *Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications*, (Ed: F Scholz), second ed., Springer, Greifswald, Germany, p. 359.
- [69] RE Tully, MJ Sadowsky, DL Keister (1991) Characterization of cytochromes c550 and c555 from Bradyrhizobium japonicum: Cloning, mutagenesis, and sequencing of the c555 gene (cycC). *J. Bacteriol.* 173: 7887-7895.
- [70] V Fourmond, T Lautier, C Baffert, F Leroux, PP Liebgott, S Dementin, M Rousset, P Arnoux, D Pignol, PSI Meynial-Salles, CLP Bertrand (2009) Correcting for Electrocatalyst Desorption and Inactivation in Chronoamperometry Experiments. *Anal. chem.* 81: 2962-2968.
- [71] K Kataoka, K Yamaguchi, M Kobayashi, T Mori, N Bokui, S Suzuki (2004) Structure-based engineering of Alcaligenes xylosoxidans copper-containing nitrite reductase enhances intermolecular electron transfer reaction with pseudoazurin. *J. Biol. Chem.* 279: 53374-53378.
- [72] I V Fry, R Cammack, DP Hucklesby, EJ Hewitt (1982) Kinetics of leaf nitrite reductase with Methyl Viologen and ferredoxin under controlled redox conditions. *Biochem. J.* 205: 235-238.
- [73] TM Bockman, JK Kochi (1990) Isolation and Oxidation-Reduction of Methylviologen Cation Radicals. Novel Disproportionation in Charge-Transfer Salts by X-ray Crystallography. *J. Org. Chem.* 55: 4127-4135.
- [74] M Bott, L Thöny-Meyer, H Loferer, S Rossbach, R aymon. E Tully, D Keister, CA Appleby, H Hennecke (1995) Bradyrhizobium japonicum cytochrome c550 is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 177: 2214-2217.
- [75] MJ Torres, MI Rubia, EJ Bedmar, MJ Delgado (2011) Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1886-1889.
- [76] L Antolini, G Marcotrigiano, L Menabue, GC Pellacani (1983) Coordination behavior of L-aspartic acid: thermal, spectroscopic, magnetic, and structural properties of aqua (L-aspartato)(2, 2'-bipyridine) copper (II) trihydrate. *Inorg. Chem.* 22: 141-145.
- [77] RF Baggio, R Calvo, CD Brondino, MT Garland, AM Atria, E Spodine (1995) A novel structure of (L-aspartato)(1,10-phenanthroline)copper(II) hydrate. *Acta Crystallogr. C.* 51: 382-385.
- [78] Y Fukuda, KM Tse, T Nakane, T Nakatsu, M Suzuki, M Sugahara, S Inoue, T Masuda, F Yumoto, N Matsugaki, E Nango, K Tono, Y Joti, T Kameshima, C Song, T Hatsui, M Yabashi, O Nureki, MEP Murphy, T Inoue, S Iwata, E Mizohata (2016) Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113: 2928-2933.
- [79] PJ Gonzalez, MG Rivas, CS Mota, CD Brondino, I Moura, JJG Moura (2013) Periplasmic nitrate reductases and formate dehydrogenases: Biological control of the chemical properties of Mo and W for fine tuning of reactivity, substrate specificity and metabolic role. *Coord. Chem. Rev.* 257: 315-331.
- [80] EI Tocheva, FI Rosell, AG Mauk, MEP Murphy (2004) Side-On Copper-Nitrosyl Coordination by Nitrite Reductase. *Science*. 304: 867-870.
- [81] N Lehnert, U Cornelissen, F Neese, T Ono, Y Noguchi, KI Okamoto, K Fujisawa (2007) Synthesis and spectroscopic characterization of copper(II)-nitrito complexes with hydrotris(pyrazolyl)borate and related coligands. *Inorg. Chem.* 46: 3916-3933.
- [82] CE Ruggiero, SM Carrier, WB Tolman (1994) Reductive Disproportionation of NO Mediated

- by Copper Complexes: Modeling N₂O Generation by Copper Proteins and Heterogeneous Catalysts. *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 33: 895-897.
- [83] YL Lin, C Lim (2004) Factors Governing the Protonation State of Zn-Bound Histidine in Proteins: A DFT/CDM Study. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 2602-2612.
 - [84] E Arslan, H Schulz, R Zufferey, P Künzler, L Thöny-Meyer (1998) Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-Type Cytochrome Subunits of the cbb 3 Oxidase in Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 747: 744-747.
 - [85] FW Studier (2014), Chapter 2-Stable Expression Clones and Auto-Induction for Protein Production in E . coli, En: Structural Genomics General Applications, (Ed: YW Chen) Humana Press, London, UK, p. 17-32.
 - [86] ALF Lowry H Oliver, NJ. Rosebrough, A Randall (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *ASBMB*. 193: 265-275.
 - [87] J Weil, J Bolton (2007), ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE. Elementary Theory and Practical Applications, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, EEUU, p. 688
 - [88] G Eaton, S Eaton, D Barr, R Weber (2010), Quantitative EPR, 1.^a ed., Springer-Verlag Wien, Germany, p.185.
 - [89] BJ Hales (2007), Chapter - Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy, En: Applications of PHYSICAL METHODS TO INORGANIC AND BIOINORGANIC CHEMISTRY, (Ed:R Scott, CM Lukehart), Wiley, England, p. 39-54.
 - [90] K Oldham, J Myland (1994), Fundamentals of electrochemical science, Academic Press, inc., London, p.474.
 - [91] P MonK (2001), Analytical Techniques in the Sciences, (Ed: DJ Ando), John Wiley & Sons, England, p 384.
 - [92] J Wang (2006), ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY, Third Edit, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p.272.
 - [93] N Elgrishi, KJ Rountree, BD McCarthy, ES Rountree, TT Eisenhart, JL Dempsey (2017) A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 95: 197-206.
 - [94] A Sassolas, LJ Blum, BD Leca-bouvier (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30: 489-511.
 - [95] J Hirst (2006) Elucidating the mechanisms of coupled electron transfer and catalytic reactions by protein film voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757: 225-239.
 - [96] C Léger, P Bertrand (2008) Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies. *Chem. Rev.* 108: 2379-2438..