

EXPRESIÓN HETERÓLOGA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UNA NITRITO REDUCTASA DE COBRE DERIVADA DE LA BACTERIA TERMOTOLERANTE *THERMUS SCOTODUCTUS SA-01*

Schmidt Florencia Belén^A

^ADepartamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL; CONICET

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: desnitrificación, extremófilos, nitrito reductasas

INTRODUCCIÓN

El nitrato sirve como sustrato en el proceso de desnitrificación del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Richardson y Watmough, 1999). Este proceso involucra las reacciones catalizadas por las enzimas: a) nitrato reductasa, b) nitrito reductasa, c) NO reductasa y d) N₂O reductasa.



El nitrato se reduce vía nitrito, a óxido nítrico, luego a monóxido de nitrógeno y finalmente a nitrógeno molecular. Esta vía metabólica también conocida como respiración de nitratos, conserva la energía la cual se almacena como ATP (Kraft y col., 2011). La enzima que cataliza el segundo paso en la cascada de reducción es la nitrito reductasa (Nir) (Zumft, 1997). Se han reportado dos tipos de Nirs que intervienen en el proceso de desnitrificación: i) Nir de cobre (NirK) y ii) un complejo citocromo *cd₁* denominado NirS (Zumft, 1997; Kraft y col., 2011). La presencia de ambas Nirs en el mismo microorganismo no era común hasta que se reportó el genoma de *Thermus scotoductus* SA-01 (Gounder y col., 2011), una bacteria termotolerante aislada de una fisura de agua a 3,2 km de la superficie en territorio sudafricano. En nuestro laboratorio nos propusimos estudiar Nirs que provengan de extremófilos y que puedan utilizarse para el desarrollo de biosensores robustos para nitrito en muestras de diverso origen. Aquí presentamos la expresión heteróloga de NirK de *T. scotoductus* SA-01 (*TsNirK*) en *Escherichia coli*, la purificación y caracterización preliminar de la proteína recombinante.

METODOLOGÍA

Expresión de *TsNirK* recombinante.

El gen sintético optimizado (TSC_C17620) inserto en pET22b(+), [p22TK], se compró a Genscript y se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) para la producción de *TsNirK* recombinante. Stocks de células *E. coli* BL21 (DE3) [p22TK] conservados a -80°C se reactivaron en condiciones aerobias a 37°C en cultivo en medio LB-ampicilina a 200 rpm durante al menos 8 horas. Este se utilizó como inóculo para los cultivos de

producción en medio de autoinducción (Studier, 2014) con modificaciones. A modo de resumen, se inocularon Erlen-Meyers de 2 L con 400 mL de medio de autoinducción-ampicilina sin el agregado de lactosa con 5 mL del cultivo en medio LB. El crecimiento se mantuvo a 37°C por espacio de 24 horas a 200 rpm. Terminado este lapso de tiempo se adicionó CuSO₄ a una concentración final de 200 µM y se mantuvo en agitación a 100 rpm. Finalmente se procedió a la inducción de la expresión de *TsNirK* por el agregado de 250 µM IPTG a ~20°C a 50 rpm durante 3 h. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 6000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en 20 mM Tris-HCl pH: 8.0 (0,1 g/mL) y las células se sometieron a disrupción en sonicador. La fracción citoplasmática se obtuvo por centrifugación a 15000 rpm durante 45 min a 4°C. *TsNirK* se purificó hasta grado electroforético mediante protocolos cromatográficos ya estandarizados (Ferroni y col. 2011; Ferroni y col., 2012). Se realizaron 3 pasos cromatográficos: i) *DEAE-Sepharose* (GE Healthcare), ii) *Source 15Q* (GE Healthcare) y iii) *Superdex S200* (GE Healthcare). La presencia de la proteína recombinante a estudiar en las fracciones obtenidas se siguió mediante *SDS-PAGE* y espectroscopía UV-Vis.

Caracterización molecular

La metaloproteína purificada se caracterizó bioquímica y fisicoquímicamente a través de determinaciones del tamaño molecular (tamiz molecular), caracterizaciones espectroscópicas UV-Vis y determinación del tipo de cofactor metálico (análisis de metales).

Evaluación de la actividad enzimática

En cubetas selladas y en atmósfera de argón se realizaron los estudios de interacción de mediadores artificiales (metilviológeno y bencilviológeno) con *TsNirK*. Se siguió la reoxidación de los mediadores reducidos por acción de *TsNirK* en presencia de nitrito en un ambiente anóxico, mediante espectroscopía UV-Vis.

Se evaluó la estabilidad térmica de *TsNirK* mediante ensayos de inactivación enzimática a una temperatura de 60°C. Se tomaron fracciones de la enzima a distintos tiempos de tratamiento térmico y se conservaron en hielo hasta el ensayo de actividad enzimática. Se evaluó la actividad enzimática remanente mediante ensayo discontinuo como en otros trabajos anteriores para otras NirKs (Ferroni y col., 2012).

Estudios de identificación de dominios cupredoxina.

Las NirKs verdes o azules clásicas presentan dos sitios de cobre que se encuentran coordinados a aminoácidos característicos (Ellis y col., 2007). Mediante búsquedas en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se pueden identificar los dominios de unión a los centros de cobre. Se realizarán estudios de identificación de dominios cupredoxina en la secuencia de aminoácidos de *TsNirK*. Se identificarán los motivos de unión a cobre CX_mHX_nM (Ellis y col., 2007).

RESULTADOS

Se expresó exitosamente el gen *nirK* optimizado de *T. scotoductus* SA-01 en *E. coli* BL21(DE3). La proteína recombinante se purificó mediante 3 pasos cromatográficos. En la figura 1 se muestra el espectro UV-vis de *TsNirK* *as prepared* y se pueden identificar

las bandas características de este tipo de proteínas de Cu. La banda principal corresponde a 597 nm ($\epsilon = 3,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y le sigue en importancia una banda a 447 nm ($\epsilon = 1,28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La caracterización por tamiz molecular a pH: 8,0 mostró que la proteína nativa eluye en un arreglo de 125 kDa (Figura 2), lo que se corresponde con una estructura trimérica. La proteína *as prepared* obtenida presentó un contenido metálico de ~ 3 mol Cu/mol monómero de proteína y un tamaño molecular de ~ 50 kDa mediante SDS PAGE (Figura 2, *inset*).

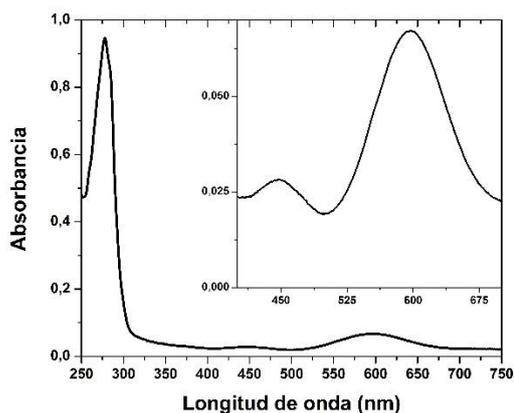


Figura 1. Espectro UV-Vis de *TsNirK as prepared*. **Inset:** ampliación de la parte activa del espectro la región del visible. Se pueden observar bandas de absorción a 447 nm y 597 nm. Muestra en buffer 20 mM MES-TRIS pH: 6,0.

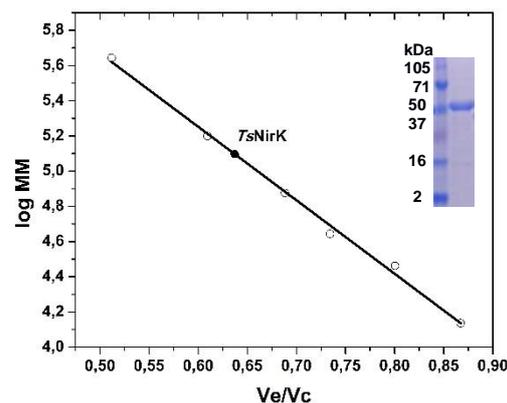


Figura 2. Tamiz molecular *Superdex S200*. El tamaño del macroarreglo de *TsNirK* corresponde a ~ 125 kDa. Muestras corridas a 0,5 mL/min, 20 mM Tris-HCl pH: 8,0, 200 mM NaCl, V_c : 21,72 mL. **Inset:** SDS PAGE 15% acrilamida.

TsNirK fue capaz de reoxidar en condiciones anaeróbicas los mediadores metilviológeno y bencilviológeno en presencia de nitrito comparado con un control sin la adición del mismo. La enzima es estable por largos períodos a 60°C .

Las búsquedas en BLAST permitieron identificar los dominios típicos de unión en cupredoxinas y NirKs clásicas. Se identificaron un dominio de unión al sitio de cobre catalítico (CuT_2) y otro al cobre de transferencia electrónica (CuT_1N) hacia el extremo N-terminal. Se detectó un posible dominio de unión a cobre en el extremo C-terminal (CuT_1C , aminoácidos 315 al 451) que se asemeja al observado en la cupredoxina amicianina (39% identidad). Hasta la fecha solo se han identificado 2 NirKs con 3 dominios (Horrell y col., 2017) pero ninguna de ellas presenta el arreglo y distribución de dominios observado en *TsNirK*.

En un análisis en búsqueda de motivos de unión a cobre por homología de secuencia se pudieron identificar los siguientes: i) CuT_1N : His75, His125, Cys115 y Gln130, ii) CuT_2 : His80, His114 e His267 (de una subunidad adyacente), y iii) CuT_1C : His390, Cys428, His431 y Met434. El CuT_1N se encuentra unido mediante el puente Cys115-His114 al CuT_2 . El CuT_1C podría funcionar como el *partner* de transferencia electrónica al CuT_1N y se requerirían estudios cristalográficos para confirmarlo.

CONCLUSIONES

TsNirK es una nitrito reductasa de cobre novedosa capaz desempeñarse a altas temperaturas por largos períodos de tiempo. Los estudios de contenido de metales y los

ensayos de tamiz molecular permiten inferir un macroarreglo de 3 subunidades con 3 átomos de cobre por monómero de proteína. Con 451 aminoácidos es mucho más grande que sus pares NirKs verdes y zules clásicas, con lo cual podría clasificarse dentro de una nueva categoría de NirKs con 3 dominios.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Ellis M.J., Grossmann J.G., Eady R.R., Hasnain S.S., 2007. Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 12, 1119-1127.

Ferroni F.M, Rivas M.G., Rizzi A.C., Lucca M.E., Perotti N.I., Brondino C.D., 2011. Nitrate reduction associated with respiration in *Sinorhizobium meliloti* 2011 is performed by a membrane-bound molybdoenzyme. *Biometals*, 24, 891-902.

Ferroni F.M, Guerrero S.A., Rizzi A.C., Brondino C.D., 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.

Gounder K., Brzuszkiewicz E., Liesegang H., Wollherr A., Daniel R., Gottschalk G., Reva O., Kumwenda B., Srivastava M., Bricio C, Berenguer J., van Heerden E., Litthauer D., 2011. Sequence of the hyperplastic genome of the naturally competent *Thermus scotoductus* SA-01. *BMC Genomics*, 12, 577.

Horrell S., Kekilli D., Strange R.W., Hough M.A., 2017. Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases. *Metallomics* (in press).

Kraft B., Strous M., Tegetmeyer H.E., 2011. Microbial nitrate respiration-Genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.*, 155, 104-117.

Richardson D.J., Watmough N.J., 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 207-219.

Studier F.W., 2014. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol. Biol.*, 1091, 17-32.

Zumft, W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 533-616.