

OBTENCIÓN DE FORMAS TRUNCA DE UNA NITRITO REDUCTASA DE COBRE DE TRES DOMINIOS PROVENIENTE DE *THERMUS SCOTODUCTUS SA-01*

Schmidt, Florencia

Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL

Director: Ferroni, Felix Martín

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: proteínas de cobre, ingeniería de proteínas, desnitrificación.

INTRODUCCIÓN

Las nitrito reductasas que contienen cobre (CuNiRs) son un grupo de enzimas presentes en un amplio rango de bacterias y hongos desnitrificadores. Estos microorganismos, en ausencia de oxígeno (O₂), acoplan la síntesis de ATP con la reducción del nitrato (NO₃⁻) o el nitrito (NO₂⁻) a dinitrógeno (N₂), a través de los intermediarios óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) (Canfield, y col., 2010). En esta cadena de reacciones de óxido reducción, las CuNiR catalizan la reducción de un electrón de nitrito (NO₂⁻) para formar óxido nítrico (NO): NO₂⁻ + 2H⁺ + e⁻ ↔ NO + H₂O. Este paso reviste de interés por ser la reacción limitante de la velocidad de la vía metabólica (Zumft, 1997).

Durante casi 30 años, las CuNiRs se han estudiado extensamente mediante métodos computacionales, estructurales y biofísicos, llegando a la descripción detallada de lo que se conocen como CuNiRs de dos dominios (Nojiri, 2017). Independientemente del organismo, estas CuNiRs son enzimas homotriméricas. En cada uno de sus monómeros pueden identificarse dos dominios cupredoxina, uno que aloja dos centros de cobre referidos como T1Cu y T2Cu (Nojiri, 2017) y el otro que participa en la formación del arreglo macromolecular. Los electrones son provistos por el mediador fisiológico: azurinas, pseudoazurinas o citocromos tipo c, dependiendo del microorganismo (Zumft, 1997). El centro T1Cu recibe los electrones y los cede al centro T2Cu una vez que el nitrito se ha acomodado en el sitio activo. Al igual que en muchas proteínas redox, la interacción entre CuNiRs de 2 dominios y sus proteínas asociadas es transitoria (Horrel, y col., 2017).

Recientemente, se han descubierto nuevas CuNiRs que contienen uno o dos dominios proteicos adicionales a los descritos típicamente (Antonyuk, y col., 2013; Ellis, y col., 2007; Nojiri, y col., 2007; Tsuda, y col., 2013; Sasaki, y col., 2021). En particular, en nuestro laboratorio hemos caracterizado una CuNiR de tres dominios proveniente del extremófilo *Thermus scotoductus SA-01*, TsNirK (Opperman, y col., 2019). TsNirK presentó un dominio adicional hacia el extremo C-terminal con motivo cupredoxina, el cual contiene un centro T1Cu y varios cambios a nivel del sitio activo (residuo Ser_{CAT} en lugar del típico Asp_{CAT}). Esto abrió nuevas incógnitas acerca del rol del dominio extra y del ciclo catalítico en la nueva configuración del sitio activo en TsNirK.

Título del proyecto: Metaloenzimas de los ciclos del carbono y nitrógeno: Correlaciones entre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de centros metálicos redox

Instrumento: PICT (2017-2186)

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Dr. Carlos D. Brondino

OBJETIVOS

Mediante ingeniería reversa de proteínas, se deconstruirá *TsNirK* en su núcleo (proteína de dos dominos, TKΔ169C) imitando las clásicas CuNIRs y el dominio C-terminal adicional (TKΔ308N) imitando a un mediador fisiológico. Esto permitirá estudiar por separado los centros de cobre y las interacciones con diferentes mediadores de reacciones redox. Dicha finalidad, delimita los siguientes objetivos particulares:

- Generar las construcciones plasmídicas para la producción de las dos formas truncas de *TsNirK*: TKΔ169C y TKΔ308N.
- Caracterizar preliminarmente los productos de la expresión heteróloga de dichas construcciones plasmídicas en *Escherichia coli*.

METODOLOGÍA

Obtención de las construcciones plasmídicas

Las construcciones plasmídicas se sintetizaron en el laboratorio mediante amplificaciones por PCR a partir de la secuencia original de *TsNirK* contenida en el plásmido [p22:TK]_{opt} (*GeneScript*). En el diseño de cebadores se incluyeron secuencias para el reconocimiento de enzimas de restricción que facilitarán el trabajo. Los amplicones obtenidos se insertaron en el vector pJET 1.2/blunt (*Fermentas*). Las construcciones generadas se utilizaron para transformar células *E. coli* TOP 10 F' competentes. Las colonias sobrevivientes se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico y confirmar la identidad de las construcciones producidas mediante secuenciación. Los plásmidos que fueron confirmados en su secuencia se utilizaron para subclonar el gen de las proteínas truncas en el vector de expresión pET29a(+) (*Novagen*). El procedimiento de subclonado se realizó siguiendo la metodología *Single-Tube Restriction Based Ultrafiltration (STRU)* (Bellini, 2013). Los clones que resultaron positivos se seleccionaron para someterlos a extracción de ADN plasmídico y el posterior análisis por PCR y secuenciación. Los clones se conservaron a -80 °C para su posterior utilización en eventos de expresión. Se obtuvieron los constructos finales para la expresión en *E. coli*: [p29:TKΔ169C] (p29/169) y [p29:TKΔ308N] (p29/308).

Expresión y purificación

Se utilizaron células de *E. coli* BL21 (DE3) para expresar la porción C-terminal de *TsNirK*. Brevemente, el plásmido p29/308, el cual contiene el gen TKΔ308N, se utilizó para transformar células BL21 (DE3). Estas células transformadas se cultivaron en 200 mL de medio de Auto Inducción (AM) a 30 °C. Una vez que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,6, la temperatura de incubación del cultivo se redujo a 20 °C y el cultivo se suplementó con CuSO₄ 0,6 mM e IPTG 0,4 mM. Los cultivos se incubaron durante la noche y posteriormente, las células se recolectaron por centrifugación. La pasta celular se almacenó a -20 °C antes de realizar los pasos de purificación.

Para la expresión del núcleo de *TsNirK* se utilizaron células de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) Gold. Estas cepas se transformaron con la construcción p29/169. Luego, se siguió un protocolo de cultivo de células e inducción de la expresión similar al detallado para TKΔ308N. La disrupción celular y purificación de las proteínas recombinantes se realizó utilizando protocolos estandarizados en nuestro laboratorio (Ferroni y col., 2014; Opperman y col., 2019). La producción alcanzada se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida *SDS-PAGE*. La presencia de la proteína de interés se determinó por comparación de tamaño molecular (kDa) contra un patrón de tamaños moleculares.

Caracterización molecular

Se analizó la fracción de proteína purificada hasta grado electroforético mediante espectroscopía UV-VIS para determinar la absortividad molar. También se determinó el tamaño molecular del arreglo macromolecular nativo mediante cromatografía de tamiz molecular (SEC) y el tamaño de las unidades monoméricas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE y 4-8 M Urea.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Del trabajo en biología molecular realizado para la generación de los constructos de las formas truncas TK Δ 169C y TK Δ 308N, se obtuvieron construcciones vector/inserto exitosas para la expresión en *E. coli*, referidas como p29/169 y p29/308.

Se concluye que la forma nativa de TK Δ 308N presenta una estructura cuaternaria correspondiente a un arreglo homodimérico de 27,9 kDa, compuesto por monómeros de 15,8 kDa. El espectro de absorción en el rango del UV-Vis presenta un pico de absorción a los 608 nm, con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{608} = 1,81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ por monómero. Debido a la divergencia entre el espectro obtenido para TsNirK (Opperman y col., 2019) y el de esta forma trunca, serán necesarios más ensayos como espectroscopia RAMAN y EPR para indagar sobre las propiedades del dominio en su forma libre y fusionada a la estructura troncal NirK.

TK Δ 169C presentó mayores dificultades técnicas para obtenerse de manera soluble. Sin embargo, se observó la generación de cuerpos de inclusión con banda detectable de unos 29 kDa en geles desnaturalizantes. Estos cuerpos de inclusión demostraron ser activos por lo que son una buena fuente para obtener la proteína soluble mediante procesos de renaturalización de cuerpos de inclusión. En estos momentos se está optimizando la producción de proteína soluble, la recuperación de proteína a partir de los cuerpos de inclusión y la ejecución de una estrategia alternativa mediante fusión a MBP seguida de digestión con la proteasa TEV.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Antonyuk, S. V., Han, C., Eady, R. R., & Hasnain, S.S. 2013. Structures of protein–protein complexes involved in electron transfer. *Nature*, 496, 123-126.

Bellini, D., Fordham-Skelton, A. P., & Papiz, M. Z. 2011. STRU-cloning: a fast, inexpensive and efficient cloning procedure applicable to both small scale and structural genomics size cloning. *Molecular biotechnology*, 48, 30-37.

Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330, 192-196.

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. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 1119-1127.

Ferroni, F. M., Marangon, J., Neuman, N. I., Cristaldi, J. C., Brambilla, S. M., Guerrero, S. A., ... & Brondino, C. D. 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. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19, 913-921.

Horrell, S., Kekilli, D., Strange, R. W. & Hough, M. A. 2017. Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases. *Metallomics*, 9, 1470-1482.

Nojiri, M., Xie, Y., Inoue, T., Yamamoto, T., Matsumura, H., Kataoka, K., Deligeer, Yamaguchi, K., Kai, Y. & Suzuki, S. 2007. Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 4315-4320.

Nojiri, M. 2017. Structure and function of copper nitrite reductase. In *Metalloenzymes in Denitrification*, 91-113. The Royal Society of Chemistry. UK.

Opperman, D. J., Murgida, D. H., Dalosto, S. D., Brondino, C. D., & Ferroni, F. M. 2019. A three-domain copper-nitrite reductase with a unique sensing loop. *IUCrJ*, 6, 248-258.

Sasaki, D., Watanabe, T. F., Eady, R. R., Garratt, R. C., Antonyuk, S. V. & Hasnain, S. S. 2021. Reverse protein engineering of a novel 4-domain copper nitrite reductase reveals functional regulation by protein-protein interaction. *The FEBS journal*, 288, 262-280.

Tsuda, A., Ishikawa, R., Koteishi, H., Tange, K., Fukuda, Y., Kobayashi, K., ... & Nojiri, M. 2013. Structural and mechanistic insights into the electron flow through protein for cytochrome c-tethering copper nitrite reductase. *The Journal of Biochemistry*, 154, 51-60.