

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

Propiedades magnéticas y transferencia electrónica en la nitrito reductasa de cobre de *Ensifer meliloti* y su relación con la catálisis enzimática

Andrea Belén Duré

Director de Tesis: Dr. Carlos D. Brondino

Co-director de Tesis: Dr. Pablo J. González

Departamento de Física. FBCB-UNL

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Brondino, por haberme brindado la posibilidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas bajo su dirección y permitirme pertenecer al Departamento de Física de FBCB, al Dr. Pablo Gonzalez por su co-dirección. Gracias a ambos por su dedicación, compromiso, apoyo y generosidad en esta etapa de mi formación científica.

A la Dr. Gabriela Rivas por brindarme, con paciencia y generosidad, su aporte y orientación en mi formación.

Al Dr. Sergio Dalosto por su colaboración en la obtención de los cálculos computacionales.

A mis compañeras, compañeros, y al Dr. Ferroni que me brindaron su ayuda y camaradería durante este ciclo.

A mi familia y amigos, de quienes he recibido el afecto y cariño tan necesario para transitar esta etapa.

A los docentes del departamento de Física que me capacitaron y orientaron en las tareas de docencia durante este período.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme el lugar de trabajo y el equipamiento requerido. A CONICET y AGENCIA por las becas recibidas que me permitieron realizar mi Doctorado.

Aportes científicos y tecnológicos

Parte del trabajo realizado en el desarrollo de esta tesis ha sido publicado en:

- Molecular and kinetic properties of copper nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011 upon substituting the interfacial histidine ligand coordinated to the type 2 copper active site for glycine. Andrea B. Duré, Julio C. Cristaldi, Lorieth A. Guevara Cuasapud, Sergio D. Dalosto, María Gabriela Rivas, Felix M. Ferroni, Pablo J. González, Guillermo G. Montich, Carlos D. Brondino. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 241 (2023) 112155.
- Heterologous production and functional characterization of *Bradyrhizobium japonicum* copper-containing nitrite reductase and its physiological redox partner cytochrome C₅₅₀. Julio C. Cristaldi, Felix M. Ferroni, Andrea B. Duré, Cintia S. Ramírez, Sergio D. Dalosto, Alberto C. Rizzi, Pablo J. González, Maria Gabriela Rivas, Carlos D. Brondino. *Metallomics*, 12 (2020) 2084-97.

Índice de contenidos

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1- El ciclo biológico del nitrógeno	13
I.2- Características moleculares y estructurales de las NirK	15
I.3- Características espectroscópicas de las NirK	18
I.4- Características estructurales de <i>SmNirK</i>	22
I.5- Mecanismo catalítico de las NirK	23
I.6- Relevancia del residuo His342	25
I.7- Relevancia del residuo Glu315	26
II. OBJETIVOS	32
II.1-Objetivo general.....	33
II.1.1- Objetivos específicos	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
III.1- Metodologías utilizadas para la obtención de las variantes de <i>SmNirK</i>	35
III.1.1- Mutagénesis sitio dirigida	35
III.1.2- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	37
III.1.3- Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el clonado y expresión de las proteínas.....	37
III.1.4- Obtención de células competentes y transformación.....	37
III.1.5- Medios de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i> utilizados en el clonado y expresión de las proteínas.....	38
III.1.6- Extracción de ADN plasmídico.....	39
III.1.7- Secuenciación de ADN.....	39
III.2- Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	39
III.2.1- Crecimiento de células <i>E. coli</i> y expresión de proteínas.....	39
III.2.2- Obtención del extracto soluble.....	40
III.2.3- Purificación de proteínas.....	41
III.2.3.1- Purificación de <i>SmNirK</i> y sus variantes	41
III.2.3.2- Purificación de <i>SmPaz</i>	42
III.2.4- Concentración y diálisis de proteínas por ultrafiltración	42
III.3- Metodologías utilizadas para la determinación de propiedades moleculares.....	42
III.3.1- Determinación de la concentración de proteínas.....	42
III.3.2- Determinación de la masa molecular aparente.....	42
III.3.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	43
III.3.4- Determinación del contenido de cobre.....	43

III.4- Métodos espectroscópicos	43
III.4.1- Espectroscopía de absorción UV-vis	43
III.4.2- Espectroscopía de EPR	43
III.4.2.1- Simulación de espectros de EPR.....	43
III.4.3- Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por UV-vis y EPR.....	44
III.5- Métodos cinéticos ensayos de actividad enzimática	44
III.5.1- Método continuo	44
III.5.2- Método discontinuo	45
III.6- Ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia.....	45
III.7- Métodos computacionales.....	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
IV.1- Resultados H342G.....	49
IV.1.1 Propiedades moleculares	49
IV.1.2 Actividad catalítica.....	50
IV.1.3 Caracterización espectroscópica.....	51
IV.1.3.1 Espectroscopía de absorción UV-vis	51
IV.1.3.2 Espectroscopía de EPR.....	53
IV.1.4 Reducción con ascorbato y oxidación con nitrito monitoreada por EPR.....	56
IV.1.5 Reducción con ditionito y reoxidación con sustrato, monitoreada por Uv-vis y EPR.....	58
IV.1.6 Ensayos de estabilidad térmica.....	59
IV.1.7 Modelado estructural QM/MM de H342G: implicancia para la catálisis.....	60
IV.2 Resultados E315A	64
IV.2.1 Propiedades moleculares	64
IV.2.2 Caracterización espectroscópica	65
IV.2.2.1 Espectroscopía de absorción UV-vis	65
IV.2.2.2 Espectroscopía de EPR	66
IV.2.3 Catálisis enzimática y transferencia electrónica	67
IV.2.4 Reducción con ascorbato monitoreada por EPR y UV-Vis.....	70
IV.2.5 Modelado estructural QM/MM de E315A	74
IV.2.6 Modificación de los potenciales de reducción T1 y T2 por la mutación: una hipótesis preliminar.....	76
V. CONCLUSIONES	78
VI. BIBLIOGRAFÍA	84

Símbolos y abreviaturas

ϵ : coeficiente de absorptividad molar

λ : longitud de onda

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

A: constante de acoplamiento hiperfino

Asp_{CAT}: Aspártico catalítico

CcP: Citocromo c peroxidasa

Citc: Citocromos *c*

E^0 : potencial formal de reducción

E^0_{T1} : potencial formal de reducción del T1Cu

E^0_{T2} : potencial formal de reducción del T2Cu

E315A: variante obtenida al modificar el residuo E315 por alanina (A) en *SmNirK*

EDT: Ensayo de desplazamiento térmico

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

ER: estado de reposo, donde el nitrito no se encuentra unido al T2Cu

g: Factor g

H342G: variante obtenida al modificar el residuo H342 por glicina (G) en *SmNirK*

His_{CAT}: Histidina catalítica

Ile_{CAT}: Isoleusina catalítica

K_m : constante de Michaelis-Menten

MV: Metil Viológeno

Nir: Nitrito reductasa

NirK: Nitrito reductasa de cobre

SmNirK: NirK aislada de *Sinorhizobium meliloti* 2011

SmPaz: Pseudoazurina aislada de *Sinorhizobium meliloti* 2011

AfNirK: NirK aislada de *Alcaligenes faecalis*

BjNirK: NirK aislada de *Bradyrhizobium japonicum*

RsNirK: NirK aislada de *Rhodobacter sphaeroides*

KPB: tampón de fosfato de potasio

T1Cu: centro de cobre Tipo 1

T2Cu: centro de cobre Tipo 2

TE: Transferencia electrónica

TC: Transferencia de carga

T_m: temperatura *melting*

UV-vis: ultravioleta-visible

W_{AP}: molécula de agua apical

W_{BR}: molécula de agua puente que conecta los residuos H_{ISCAT} y A_{SPCAT}

O_w: moléculas de agua añadidas

QM/MM: mecánica cuántica/mecánica molecular

TP: transferencia de protones

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SHE: Electrodo Estándar de Hidrógeno

SRX: cristalografía con radiación de sincrotrón convencional

SRF: cristalografía de femtosegundos en serie

Resumen

Las nitrito reductasas que contienen cobre (NirK) son enzimas que catalizan la reducción de nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) en la vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno. *SmNirK* es una NirK, obtenida del microorganismo *Sinorhizobium meliloti* 2011, rizobio utilizado como bioinoculante en semillas de alfalfa. La mayoría de las NirK caracterizadas presentan una estructura homotrimérica con dos sitios de cobre por subunidad denominados T1Cu y T2Cu. El T1Cu le confiere el color característico a la enzima y es un centro de transferencia electrónica (TE). En este centro el ion Cu^{2+} se encuentra coordinado a dos histidinas, una cisteína y una metionina. El T2Cu es el sitio activo donde ocurre la reducción del sustrato, este centro se encuentra en el interior de la proteína y el acceso del NO_2^- a este sitio es a través del canal de sustrato (CS). El Cu^{2+} del sitio T2 está coordinado a tres histidinas y a una molécula de agua. Dos de las histidinas pertenecen a una subunidad mientras que la otra (H342) pertenece a la subunidad adyacente. La H342 sería relevante en la estabilidad estructural y funcional de la proteína. En la segunda esfera de coordinación del T2Cu de la mayoría de las NirKs están presentes los residuos con relevancia catalítica Asp_{CAT} , His_{CAT} e Ile_{CAT} . Otro residuo también relevante, que se encuentra conectado a la His_{CAT} por moléculas de agua, es un glutámico (E315), el cual podría influenciar el potencial de reducción del sitio T2Cu debido a su carga negativa. El mecanismo catalítico en las NirK implica la TE desde el T1Cu al T2Cu a través del puente estructural Cys-His que conecta los dos sitios de cobre. El NO_2^- unido al sitio activo es reducido y se produce la liberación de NO. El potencial de reducción del sitio T1Cu es mayor o similar al potencial del sitio T2Cu ($E^0_{\text{T1Cu}} > E^0_{\text{T2Cu}}$), lo que significaría una TE T1Cu→T2Cu termodinámicamente desfavorable, lo que sugeriría que la presencia de nitrito modularía el potencial de reducción del T2Cu favoreciendo la TE.

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar los roles estructurales y funcionales de los residuos H342 y E315. Las variantes de *SmNirK* se obtuvieron mediante mutagénesis sitio dirigida, reemplazando el H342 por el residuo no coordinante glicina (H342G) y el E315 por un residuo no polar alanina (E315A). Ambas proteínas fueron producidas de manera recombinante, purificadas mediante métodos cromatográficos, caracterizadas y estudiadas mediante ensayos cinéticos, espectroscopias UV-vis y EPR, y cálculos computacionales (QM/MM) para su comparación con la enzima en su forma *wild-type*.

Las mutaciones realizadas no afectaron la incorporación de cobre y la estructura cuaternaria de la proteína. UV-Vis y EPR, junto con los cálculos QM/MM permitieron confirmar que la modificación de los residuos estudiados no afecta la geometría de coordinación del T1Cu de la

enzima. EPR mostró que la geometría de coordinación del T2Cu se encuentra significativamente afectada en H342G. No se observaron cambios significativos en el T2Cu de E315A. Los estudios cinéticos muestran que la afinidad por el sustrato se ve afectada en ambas variantes. La actividad específica de H342G disminuye significativamente, mientras que el reemplazo del E315 en E315A no afecta dicha actividad. Experimentos de reducción/reoxidación monitoreados por EPR y UV-Vis mostraron que ambas variantes presentaban la reducción completa de los centros de cobre T1 y T2 frente al ditionito, y la reoxidación del T2Cu acoplada a la reoxidación del T1Cu cuando se agregó nitrito. Estos experimentos complementados con cálculos QM/MM permitieron confirmar que las mutaciones no alteran la vía de TE Cys-His.

Para H342G, los cálculos QM/MM revelaron que el hueco generado por la ausencia de la cadena lateral del residuo H342 (C β -imidazol) induce cambios estructurales que dan lugar a un T2Cu con mayor número de coordinación, agrandamiento del CS y que el hueco generado se llene con moléculas de agua. Estos cambios estructurales pueden considerarse la causa de la baja eficiencia catalítica en la variante H342G. En conclusión, H342 representa un componente estructural esencial para obtener un sitio T2Cu con la estructura y geometría adecuadas para la catálisis. Para E315A, reducciones controladas de la proteína monitoreadas por EPR, mostraron que el reemplazo del E315 modificó los potenciales de reducción de los dos centros de cobre de tal forma que $E^{0'}_{T1E315A} < E^{0'}_{T2E315A}$, en contraste con lo observado en *SmNirK* ($E^{0'}_{T1SmNirK} > E^{0'}_{T2SmNirK}$). Esto implica que la mutación da lugar a una diferencia de potenciales T1Cu-T2Cu que favorece la TE T1Cu \rightarrow T2Cu. Dado que las observaciones experimentales y los cálculos teóricos no revelan una razón estructural a nivel de los centros metálicos que implique el cambio observado, nuestra hipótesis actual es que estos cambios son debido a la modificación del campo eléctrico producido por la pérdida de la carga negativa del E315. En conclusión, es evidente que el residuo E315 tiene un efecto significativo sobre el gradiente de potencial eléctrico T1Cu-T2Cu, pero este factor no es determinante para la eficiencia catalítica de la enzima.

Abstract

Copper-containing nitrite reductases (NirK) are enzymes that catalyze the reduction of nitrite (NO_2^-) to nitric oxide (NO) in the denitrifying pathway of the nitrogen cycle. *SmNirK* is a NirK, obtained from the microorganism *Sinorhizobium meliloti* 2011, a rhizobia used as a bioinoculant in alfalfa seeds. Most of the characterized NirK have a homotrimeric structure with two copper sites per subunit called T1Cu and T2Cu. T1Cu gives the enzyme its characteristic color and is an electron transfer center (ET). In this center the Cu^{2+} ion is coordinated to two histidines, a cysteine and a methionine. The T2Cu is the active site where the reduction of the substrate occurs, this center is located inside the protein and the access of NO_2^- to this site is through the substrate channel (SC). The Cu^{2+} of the T2 site is coordinated to three histidines and one water molecule. Two of the histidines belong to one subunit while the other (H342) belongs to the adjacent subunit. H342 would be relevant in the structural and functional stability of the protein. In the second coordination sphere of the T2Cu of most NirKs the residues with catalytic relevance Asp_{CAT} , His_{CAT} and Ile_{CAT} are present. Another relevant residue, which is connected to His_{CAT} by water molecules, is a glutamic acid (E315), which could influence the reduction potential of the T2Cu site due to its negative charge. The catalytic mechanism in NirK involves ET from T1Cu to T2Cu via the Cys-His structural bridge connecting the two copper sites. The NO_2^- bound to the active site is reduced and the release of NO occurs. The reduction potential of the T1Cu site is greater than or similar to the potential of the T2Cu site ($E^{0'}_{\text{T1Cu}} > E^{0'}_{\text{T2Cu}}$), which would mean a thermodynamically unfavorable ET $\text{T1Cu} \rightarrow \text{T2Cu}$, which would suggest that the presence of nitrite would modulate the reduction potential of T2Cu favoring ET.

The objective of this thesis work was to study the structural and functional roles of residues H342 and E315. *SmNirK* variants were obtained by site-directed mutagenesis, replacing H342 with the non-coordinating glycine residue (H342G) and E315 with a non-polar alanine residue (E315A). Both proteins were recombinantly produced, purified by chromatographic methods, characterized and studied by kinetic assays, UV-vis and EPR spectroscopies, and computational calculations (QM/MM) for comparison with the wild-type enzyme.

The mutations did not affect both copper incorporation and the quaternary structure of the protein. UV-Vis and EPR, together with the QM/MM calculations, allowed us to confirm that the modification of the studied residues does not affect the T1Cu coordination geometry of the enzyme. EPR showed that the coordination geometry of T2Cu is significantly affected in H342G. No significant changes were observed in the T2Cu of E315A. Kinetic studies showed that the affinity for the substrate is affected in both variants. The specific activity of H342G decreases significantly, while

the replacement of E315 in E315A does not affect activity. EPR and UV-Vis monitored reduction/reoxidation experiments showed that both variants exhibited complete reduction of T1 and T2 copper centers against dithionite, and T2Cu reoxidation coupled with T1Cu reoxidation when nitrite was added. These experiments complemented with QM/MM calculations allowed us to confirm that the mutations do not alter the Cys-His ET pathway.

H342G QM/MM calculations revealed that the gap generated by the absence of the side chain of the H342 (C β -imidazole) residue induces structural changes that lead to a T2Cu with higher coordination number, enlargement of the SC and that the gap generated is filled with water molecules. These structural changes can be considered the cause of the low catalytic efficiency in the H342G variant. In conclusion, H342 represents an essential structural component to obtain a T2Cu site with the proper structure and geometry for catalysis. E315A controlled reductions monitored by EPR showed that the replacement of E315 modified the reduction potentials of the two copper centers in such a way that $E^{0'}_{T1E315A} < E^{0'}_{T2E315A}$ in contrast to what was observed in *SmNirK* ($E^{0'}_{T1SmNirK} > E^{0'}_{T2SmNirK}$). This implies that the mutation gives rise to a difference in T1Cu and T2Cu reduction potentials that favors ET T1Cu \rightarrow T2Cu. Since the experimental observations and the theoretical calculations do not reveal a structural reason at the level of the metallic centers that implies the observed change, our current hypothesis is that these changes are due to the modification of the electric field produced by the loss of the negative charge of the E315. In conclusion, it is evident that the E315 residue has a significant effect on the T1Cu-T2Cu electrical potential gradient, but this factor is not decisive for the catalytic efficiency of the enzyme.

I. Introducción

I.1 El ciclo biológico del nitrógeno

En el ciclo del nitrógeno tienen lugar la transformación del nitrógeno atmosférico y el nitrógeno reactivo a compuestos intermediarios mediante los denominados procesos *asimilativos* y *no asimilativos* (Figura 1). En los procesos asimilativos el nitrógeno es transformado e incorporado a la biomasa, mientras que en los procesos no asimilativos el nitrógeno participa de reacciones que están acopladas a la producción de energía.

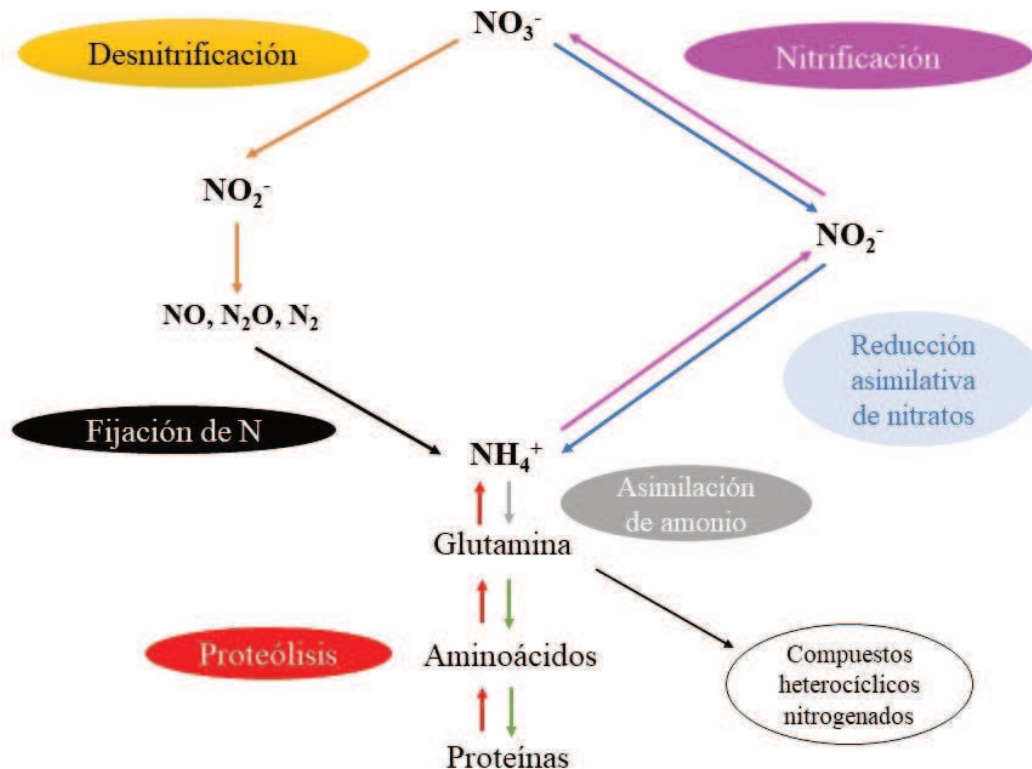


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. Figura modificada de Köln y col. (1).

Como se observa en la figura 1, el amonio (NH₄⁺) que es producido en los procesos asimilativos de *fijación del nitrógeno* (negro) y *reducción asimilativa de nitratos* (celeste) es derivado a la síntesis de proteínas (1, 2). Organismos procariotas de vida libre y otros que viven en relación simbiótica con las plantas llevan a cabo la fijación del nitrógeno, mientras que organismos procariotas y eucariotas llevan a cabo la reducción asimilativa de los nitratos. El NH₄⁺ deriva en glutamina (gris), precursor de otros aminoácidos y de compuestos nitrogenados heterocíclicos (1, 2). Así mismo, el NH₄⁺ es reciclado a N₂ por microorganismos en dos procesos no asimilativos como lo son la *nitrificación* (magenta) el NH₄⁺ se oxida a NO₃⁻ proceso en

el cual el NO_2^- es un intermediario. En la *desnitrificación* (naranja) el NO_3^- se transforma a N_2 a través de distintas reacciones sucesivas de reducción, donde el NO_2^- es también un intermediario. Otro proceso que forma parte del ciclo, es la *proteólisis* (rojo), donde los microorganismos degradan las proteínas a compuestos nitrogenados, para abastecer sus requerimientos de nitrógeno y energía (1).

El 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. Las reacciones redox implicadas en este balance son catalizadas por complejos enzimáticos que utilizan cofactores metálicos, como Cu, Fe y Mo (3). La desnitrificación, como se mencionó anteriormente, es el proceso mediante el cual se devuelve parte del nitrógeno fijado a la atmósfera para su reutilización. En este proceso donde las condiciones de oxígeno son limitantes, los microorganismos utilizan NO_3^- , NO_2^- y ciertos óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones para producir ATP en lugar de oxígeno (4). La Figura 2 presenta las cuatro enzimas que intervienen en esta vía desnitrificante. La enzima nitrato reductasa (Nar) utiliza Mo como cofactor y cataliza 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 el tercer paso interviene el complejo enzimático óxido nítrico reductasa (Nor) que contiene grupos hemo c, b y un cofactor de Fe no hémico. Por último, la enzima óxido nitroso reductasa (Nos) que utiliza Cu como cofactor, cataliza la formación de N_2 (4, 5).

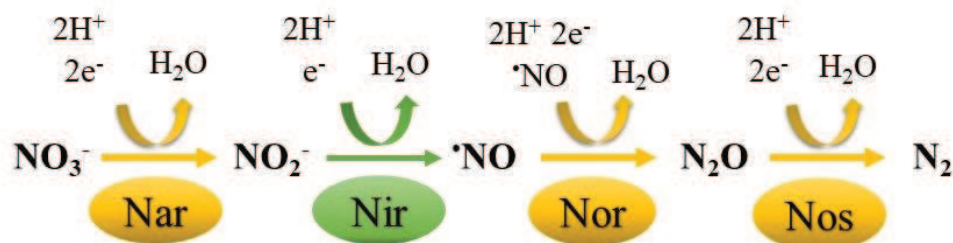


Figura 2. Pasos enzimáticos secuenciales que conforman la vía desnitrificante. Enzimas: Nar: nitrato reductasa. Nir: nitrito reductasa. Nor: óxido nítrico reductasa. Nos: óxido nitroso reductasa.

Los compuestos nitrogenados involucrados en la desnitrificación juegan un papel clave en el equilibrio ecológico. El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados sintéticos en la agricultura provoca la acumulación de estos compuestos desencadenando el desequilibrio ecológico (2, 4). 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 (6). Sin embargo, su uso en la agricultura se ha señalado como la causa de problemas ambientales dado que exagera la vía desnitrificante en la naturaleza (7).

Como se mencionó previamente, las bacterias intervinientes en la vía desnitrificante utilizan dos clases de Nir que difieren en su estructura y cofactor. Una clase de Nir contienen un citocromo *cd1* (NirS) como cofactor mientras que la otra clase se compone de las Nir que poseen cobre (NirK) (4, 8). La Nir estudiada en el presente trabajo de tesis corresponde a una NirK (*SmNirK*) obtenida de *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*), microorganismo que forma parte de los biofertilizantes comercializados en nuestro país. En este capítulo introductorio se describen características estructurales, espectroscópicas y catalíticas, de esta *SmNirK* y de otras NirK de diferentes microorganismos, necesarias para la interpretación de los resultados obtenidos y la elaboración de las conclusiones de este trabajo.

I.2 Características moleculares y estructurales de las NirK

Las NirK más estudiadas son proteínas periplasmáticas que presentan dos dominios bien identificados, dominio I, el cual contiene cofactores metálicos de Cu, y el dominio II, que cumple un rol fundamentalmente estructural (9). Estas presentan un elevado grado de homología en sus estructuras primarias. Estas enzimas pueden clasificarse en verdes o azules de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. 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 (10). En la Tabla 1 se resumen algunas características principales de las NirK de dos dominios mencionadas en este trabajo de tesis.

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

Microorganismo	<i>Sinprhizobium meliloti</i> 2011	<i>Alcaligenes faecalis</i> S-6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.3
NirK	<i>SmNirK</i>	<i>AfNirK</i>	<i>BjNirK</i>	<i>RsNirK</i>
Color	verde	verde	azul	verde-azul
λ (nm) de máxima absorbancia en UV-vis	456, 586	460, 590, 700	458, 592	390, 457, 589, 700, 810
Parámetros EPR g//, A// (mT) T1Cu: T2Cu:	2.190, 5.8 2.304, 14	1.888, 7.5 2.467, 13.1	2.192, 7.1 2.315, 14.5	2.19, 6.7 2.34, 12.5
Potencial formal de reducción E^0 vs SHE, Electrodo Estándar de Hidrógeno (mV) T1Cu: T2Cu:	+224 +108		+300	+247 +200
pH de actividad máxima	~5	5.9		6
Referencias	(11)	(12-15)	(16)	(17, 18)

En su mayoría estas proteínas son homotrómeros, donde la subunidad presenta una masa molecular que promedia los ~40 kDa y contiene 2 átomos de cobre. Estos átomos de cobre constituyen los centros denominados T1Cu y T2Cu. Cada uno de estos centros presenta funciones y características espectroscópicas 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 reducción de nitrito a óxido nítrico ($E^0 = +370 \text{ mV vs SHE}$). Los centros T1Cu reciben también el nombre de centros azules, independientemente del color de la NirK. Los centros T2Cu reciben el nombre de centros normales de Cu, debido a que presentan propiedades similares a los complejos octaédricos con distorsión tetragonal o piramidal cuadrado estudiados en química de coordinación. Para realizar la catálisis, estas enzimas requieren de un dador electrónico, pequeñas proteínas de cobre o citocromos *c* que han sido identificadas como dadores electrónicos fisiológicos de las NirK (4, 8). Independientemente del dador electrónico y del color de las NirK, es aceptado que todas operan según un mismo mecanismo catalítico.

En la Figura 3 se muestra la estructura del complejo que forman la NirK aislada de *Alcaligenes faecalis* (AfNirK) con su dador electrónico fisiológico (AfPaz). El sitio de TE del dador fisiológico también es un T1Cu. En la estructura cuaternaria de AfNirK las tres subunidades se disponen formando un canal central, conformación que se repite en todas las NirK caracterizadas. En la figura se muestra también un esquema del 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. Y este último, transfiere el electrón al sitio activo T2Cu mediante un proceso de TE intraproteína T1Cu→T2Cu (flecha celeste) para la subsecuente reducción del sustrato unido a este sitio. Este mecanismo de catálisis es explicado de forma detallada más adelante.

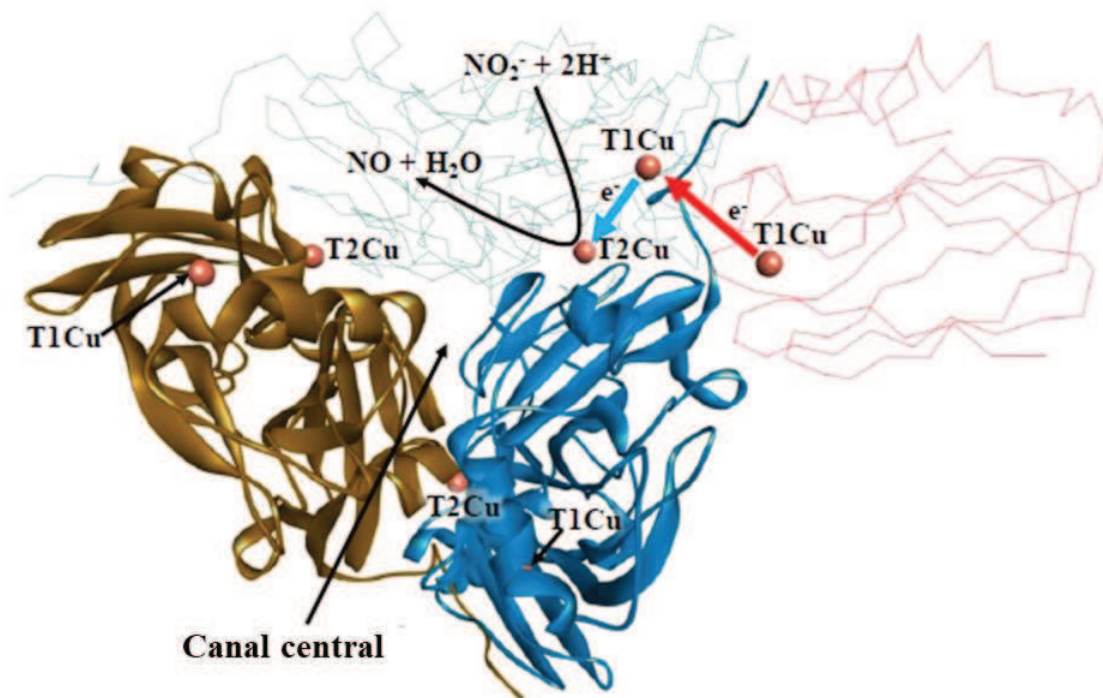


Figura 3. Estructura del complejo *AfNirK*- *AfPaz* (PDB 2P80). Los átomos de Cu que conforman los sitios T1Cu y T2Cu se representan con esferas. La estructura de *AfPaz* se presenta como líneas de color rojo. Las tres subunidades de *AfNirK* se presentan en colores diferentes y solo la estructura de una subunidad es presentada como líneas. Se muestra de manera esquemática los procesos de TE entre los sitios de Cu que tiene lugar en el mecanismo catalítico de la enzima. Figura extraída de tesis doctoral Cristaldi (19).

En la Figura 4 se muestra el entorno de coordinación de los centros de Cu de *AfNirK*, que es característico de las NirK. En el centro de TE T1Cu, el Cu está coordinado a dos residuos de His, una Met y una Cys. Este sitio presenta una geometría tetraédrica distorsionada tanto en las NirK azules como en las verdes. 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 (20).

En el sitio activo T2Cu, el Cu está coordinado a tres His y el cuarto ligando es una molécula de solvente (H_2O u OH^-). El T2Cu se encuentra posicionado a unos 12-13 Å del exterior de la proteína y el acceso del sustrato a este sitio consiste en un canal constituido por aminoácidos predominantemente hidrofóbicos (21). Ambos sitios están separados ~ 12 Å y se comunican mediante dos vías estructurales. La vía de comunicación más corta y por la que ocurre la TE intraproteína entre los dos centros es el puente estructural Cys-His constituido por la Cys coordinante del T1Cu y una de las His coordinante del T2Cu (Figura 4). Una segunda vía denominada *sensing loop* está constituida por seis residuos y permitiría que el T1Cu detecte la unión del sustrato en el T2Cu, dando lugar a que

se inicie el proceso de TE $T1Cu \rightarrow T2Cu$ (21). Además de los residuos que coordinan los átomos de Cu y los que forman el *sensing loop*, hay otros aminoácidos conservados en las estructuras de las diferentes NirK a los que se les han asignado roles catalíticos. Más adelante se detallan características estructurales correspondientes a la primera y segunda esfera de coordinación de los centros de Cu de la *SmNirK*.

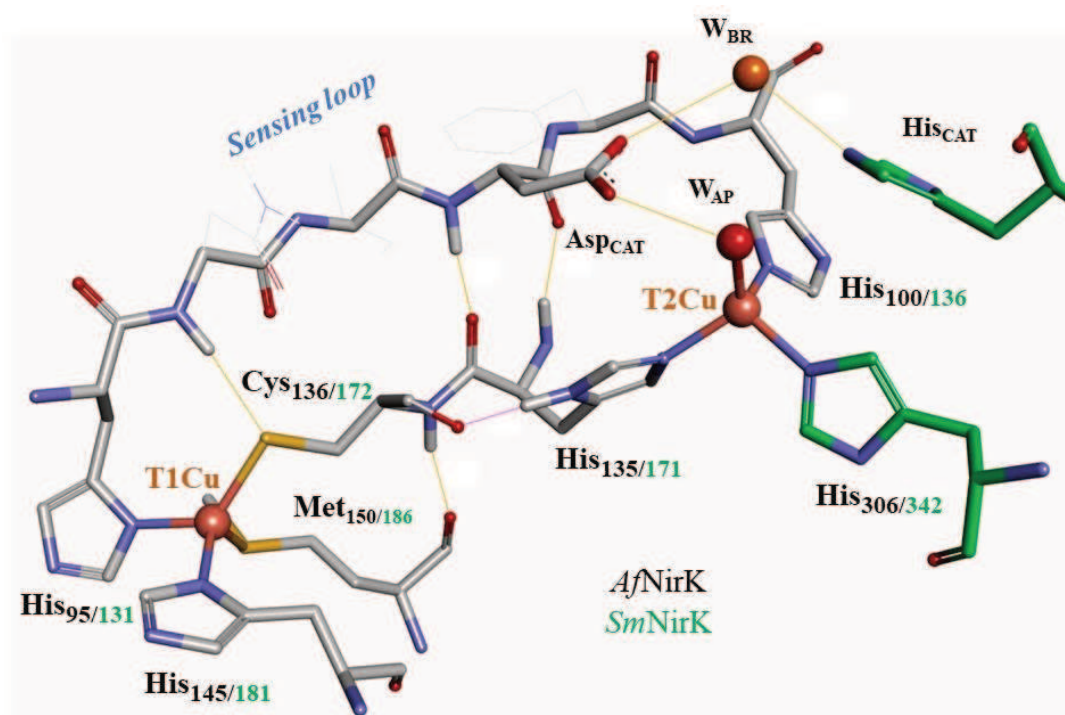


Figura 4. Estructura de los centros T1Cu y T2Cu de *AfNirK* (PDB 5F7B) en donde se muestran las dos vías de comunicación entre los dos sitios de Cu. El puente Cys136-His135 es la vía por la que ocurre la TE intraproteína. El *sensing loop* está conformado por los aminoácidos ubicados entre la His 100 coordinante del T2Cu y la His 95 coordinante del T1Cu. Se presentan el Asp_{CAT} y la His_{CAT} relevantes en la catálisis. Las esferas de color rojo representan las moléculas de H₂O (W_{AP} y W_{BR}). En verde se muestra la numeración equivalente en *SmNirK*.

I.3 Características espectroscópicas de las NirK

Como se mencionó anteriormente, las NirK pueden clasificarse en verdes o azules de acuerdo a las propiedades UV-vis del centro del T1Cu. En algunas proteínas mononucleares de cobre se pueden encontrar centros T1Cu azules puros, los espectros UV-vis de estos sitios se caracterizan por presentar una banda de absorción intensa a 600 nm ($\epsilon = 3\text{-}6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (22, 23). El sitio T2Cu, a diferencia del T1Cu, no contribuye de manera apreciable en el espectro UV-vis de las NirK, lo cual se verificó experimentalmente al producir muestras de NirK que solo contienen el T1Cu (24). Los

espectros de absorción de estos sitios T2Cu, de manera similar a los complejos de Cu con ligandos pequeños, presentan absorciones débiles que se originan a partir de transiciones entre orbitales “d” que derivan de transiciones prohibidas en complejos de alta simetría (25).

La Figura 5 muestra espectros UV-vis de la NirK verde de *S. meliloti* (*SmNirK*) y de la NirK azul de *Bradyrhizobium japonicum* (*BjNirK*) 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}). El espectro de *BjNirK* (Figura 5, espectro azul) presenta una banda de absorción intensa a 592 nm y otra banda de absorción a 458 nm con una intensidad menor. El espectro de *SmNirK* (Figura 5, espectro verde) presenta también máximos de absorción a estas longitudes de onda, pero con diferente relación de intensidades; la banda a 460 nm presenta una intensidad ~1.5 veces mayor que la banda a 590 nm (16). También pueden obtenerse espectros intermedios entre estos dos extremos. Dichos espectros son característicos de las NirK verdes-azules, una clasificación adicional que se empezó a utilizar recientemente (9). Un ejemplo de este tipo de enzima es la *RsNirK* que presenta un espectro con las dos bandas de igual intensidad (Tabla 1).

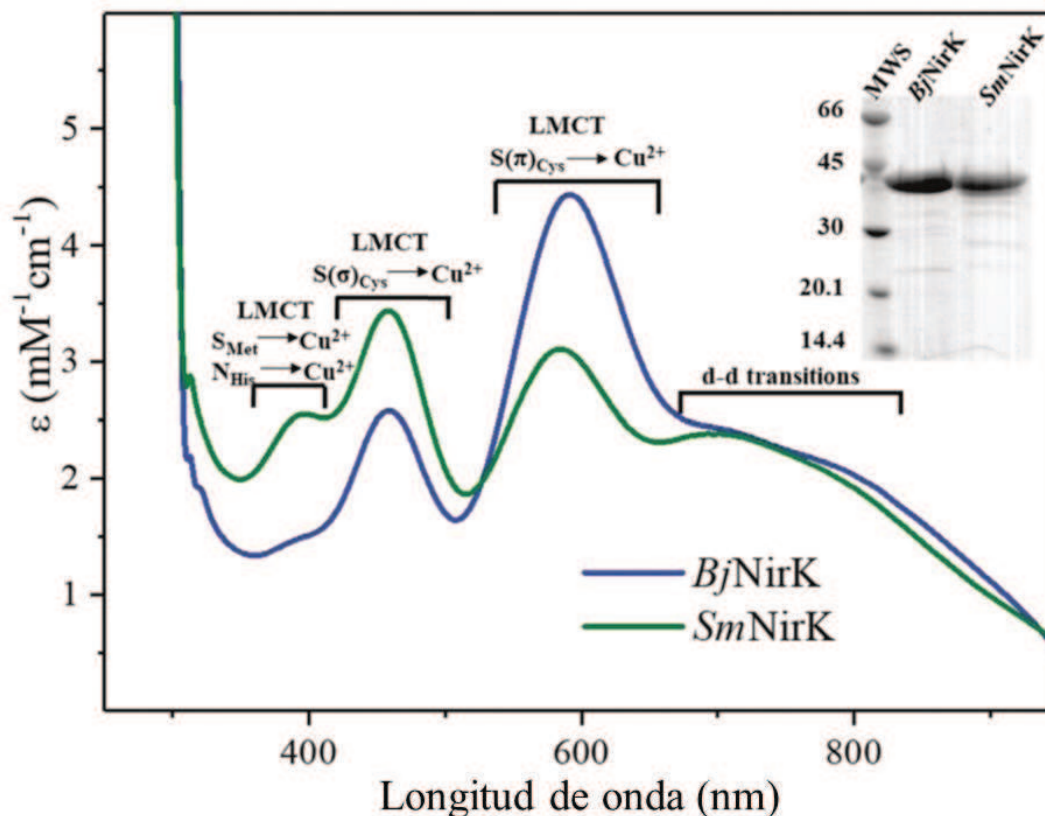


Figura 5. Espectros UV-vis de *SmNirK* y *BjNirK*. *SmNirK*: línea verde. *BjNirK*: línea azul. Se indican las transiciones asignadas de cada banda de absorción. Figura modificada de Cristaldi J y col. (16).

Las bandas observadas a 600 y 450 nm en los espectros de absorción UV-vis son atribuidas a las transiciones de transferencias de carga (TC) que se producen a nivel del enlace S(Cys)-Cu. En los espectros de absorción UV-vis de los T1Cu azules, la banda de absorción de mayor intensidad a 600 nm se atribuye a la transición de TC ligando-metal del tipo $(3p_{\pi})S(Cys) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$. 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 Cys con el orbital $3d_{x^2-y^2}$ del Cu. Por el contrario, en los espectros de absorción UV-vis de los T1Cu verdes la banda de absorción de mayor intensidad a 450 nm se atribuye a la transición de TC ligando-metal del tipo $(3p_{\sigma})S(Cys) \rightarrow (d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$. En este caso, este tipo transición ocurre debido a que la estructura geométrica del T1Cu verde permite que predomine el solapamiento de los orbitales p_{σ} del S_{γ} de la Cys con el orbital $3d_{x^2-y^2}$ del Cu (22, 26, 27). 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 (22, 23).

El T1Cu presenta además de las bandas de absorción asignadas al enlace S(Cys)-Cu, bandas 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_{δ} -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 (22, 23).

A diferencia de lo que ocurre en espectroscopía de absorción UV-vis, en espectroscopía de EPR ambos centros de Cu de las NirK en condiciones aeróbicas presentan señales con aproximadamente igual intensidad caracterizadas por parámetros diferentes. En la Figura 6 se muestra un espectro de las señales superpuestas de los dos centros de Cu para *SmNirK* (espectro *as-prep*, negro). En ambas señales $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$, lo que indica que el estado fundamental (estado que contiene el electrón desapareado) es el $d_{x^2-y^2}$ en ambos sitios de Cu (23). En gris se muestra el espectro obtenido luego de la reducción con ascorbato de sodio (Figura 6, *asc-reduced*). T1Cu presenta valores inferiores en g_{\parallel} y A_{\parallel} en comparación a los observados para T2Cu. El menor valor de A_{\parallel} se atribuye a la covalencia del enlace S(Cys)-Cu, lo que provoca que el electrón desapareado esté fuertemente deslocalizado sobre el ligando cisteína, disminuyendo su interacción con el spin nuclear del cobre (28). 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. En la Tabla 1 se resumen las características espectroscópicas de las NirK analizadas durante el desarrollo de este trabajo.

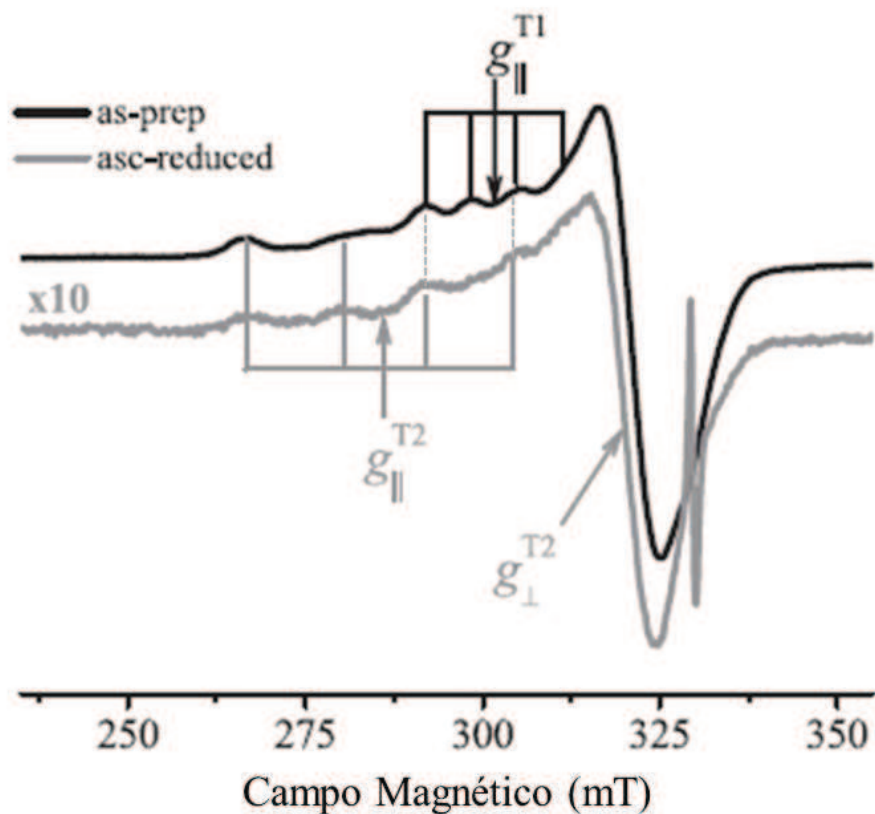


Figura 6. Espectros EPR de *SmNirK*. En la forma *as-prep* de la enzima (condiciones aeróbicas) se observan las señales superpuestas del T1Cu y T2Cu. Luego de la incubación con exceso de ascorbato de sodio (*asc-reduced*) en atmósfera de argón, se observa la señal de T2Cu. Los parámetros EPR obtenidos por simulación fueron $g_{1,2,3} = 2.190, 2.062, 2.033$, $A_{\parallel} = 5.8$ mT ($59 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) para T1 y $g_{\parallel,\perp} = 2.304, 2.053$, $A_{\parallel} = 14$ mT ($150 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) para T2. Figura modificada de González y col. (29).

I.4 Características estructurales de *SmNirK*

Durante el desarrollo de esta tesis, parte del equipo de investigación y colaboradores trabajaron en la obtención de la estructura cristalográfica de la *SmNirK* (30). En la Figura 7 se muestran la estructura de la proteína en su conformación trimérica, la subunidad y el entorno de coordinación de cada sitio de Cu (PDB 7P2F).

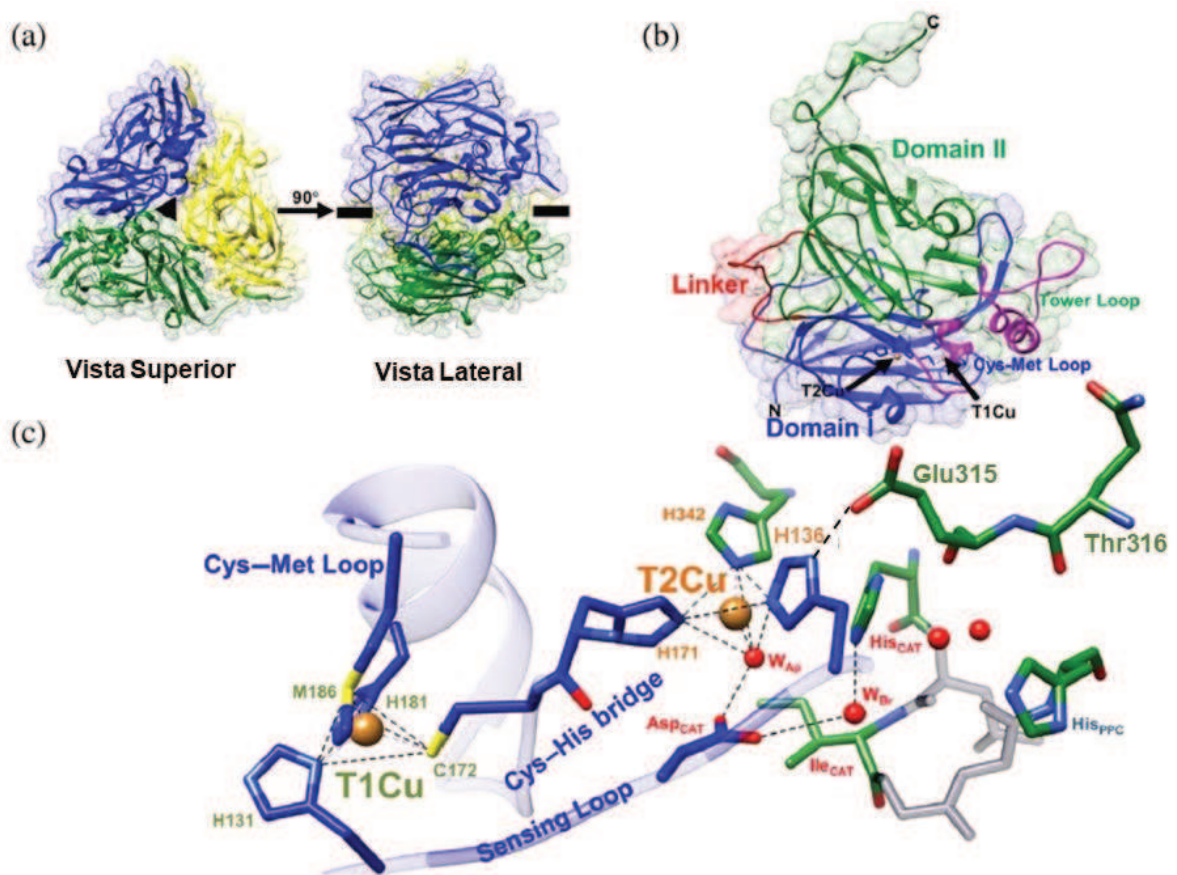


Figura 7. Estructura general de *SmNirK*. **a.** Vistas superior y lateral de la estructura trimérica. **b.** Distribución de los dominios dentro de cada subunidad. El dominio I (azul) y dominio II (verde). **c.** Coordinación alrededor de cada centro de cobre y vías que unen T1Cu y T2Cu. Los aminoácidos en azul pertenecen a la misma subunidad, mientras que los que están en verde pertenecen a la subunidad adyacente. Otros residuos implicados en la catálisis se representan con subíndices CAT y las moléculas de agua catalíticamente relevantes están en rojo. Figura modificada de Ramírez y col. (30).

Como el resto de las NirK, *SmNirK* presenta estructura homotrimérica (Figura 7a) y en la subunidad se distinguen dos dominios (I y II) con estructuras β -barril (Figura 7b). El dominio I (residuos 47-193, N-terminal) contiene los residuos que coordinan al sitio T1Cu y parte de los ligandos que coordinan al sitio T2Cu, mientras que el dominio II (residuos 210-375, C-terminal)

contiene una de las His (342) coordinante al sitio T2Cu y residuos de carácter relevante que forman parte de la segunda esfera de coordinación (30).

Como se mencionó anteriormente, el sitio T1Cu presenta geometría tetraédrica distorsionada y está coordinando dos residuos de His, una Met y una Cys. La coordinación de estos residuos se produce mediante los átomos $N_{\delta 1}(\text{His})$, $S_{\delta}(\text{Met})$ y $S_{\gamma}(\text{Cys})$. Las His89 e His139 coordinan con una distancia Cu-N de 2.02 Å y 2.03 Å respectivamente, mientras que la Cys172 coordina con una distancia Cu-S de 2.30 Å y la Met186 con distancia Cu-S de 2.37 Å. El sitio T2Cu está coordinado a una molécula de solvente (H_2O u OH^-) y a tres residuos de His mediante el átomo $N_{\epsilon 2}(\text{His})$, este centro también presenta una geometría tetraédrica distorsionada. Las His136 e His171 pertenecen al dominio I de una subunidad mientras que la His342 pertenece al dominio II de la subunidad adyacente. Las distancias de coordinación Cu-N para las His 136, 171 y 342 son 2.05, 2.04 y 2.04 Å respectivamente (30). Es importante destacar que la variante de AfNirK, donde se modificó la His que pertenece a la subunidad adyacente por un residuo no coordinante como la Ala, presentó evidencia de que esta His sería un residuo relevante en la estabilidad estructural y funcional de la proteína (31). Este punto será estudiado en el presente trabajo de tesis.

Formando parte de la segunda esfera de coordinación del sitio activo T2Cu, como en la mayoría de las NirKs reportadas, en *SmNirK* están presentes los residuos de relevancia catalítica Asp_{CAT} (Asp134), His_{CAT} (His291) e Ile_{CAT} (Ile293) (Figura 7c). Otro residuo también relevante, que se encuentra conectado a la His_{CAT} por moléculas de agua, es el Glu315 (Figura 7c). Además, Glu315 presenta un enlace puente de hidrógeno con la His136. Esta His316 se encuentra ubicada en el final de la estructura constituida por seis residuos *sensing loop* (Figura 7c), mencionada anteriormente, que transmite información sobre el estado (unido al nitrito o no) del sitio T2Cu para el transporte de electrones a través del puente Cys-His (30).

Para abordar el estudio del mecanismo catalítico y la estabilidad estructural de la *SmNirK* se verá más adelante, que este trabajo de tesis plantea elucidar el rol de un residuo de la primera esfera de coordinación del T2Cu que está involucrado en la estabilidad estructural (His342, Figura 7c) de la enzima y de un residuo de la segunda esfera de coordinación del T2Cu, sugerido como relevante en el mecanismo catalítico (Glu315, Figura 7c).

I.5 Mecanismo catalítico de las NirK

El mecanismo catalítico general de las NirK puede describirse como un proceso en el que pueden diferenciarse tres etapas, reducción del sitio T1Cu como consecuencia de la TE interproteína a partir de la interacción dador electrónico/NirK, TE intraproteína T1Cu→T2Cu y reducción del nitrito en el sitio T2Cu. El dador electrónico fisiológico interactúa con la enzima de manera

dinámica y transitoria, lo que permite al dador repetir la entrega de electrones de manera sucesiva. A partir de la formación de este complejo transitorio enzima/dador tiene lugar la TE interproteína (9). Es importante destacar que en general, se observa que el sitio de TE del dador electrónico presenta valores de potencial formal de reducción ($E^{0'}$) mayores o cercanos al del sitio T1Cu de la NirK ($E^{0'}_{\text{dador}} > E^{0'}_{\text{T1Cu-NirK}}$) lo que implica que la TE interproteína es termodinámicamente desfavorable, sin embargo esto es contrario a lo observado en los ensayos cinéticos que demuestran que la velocidad de TE desde el dador a la NirK ocurre a velocidades elevadas (9). En la Tabla 1 se recopilan los valores de potencial formal de reducción ($E^{0'}$) medidos experimentalmente para las NirK. La TE intraproteína T1Cu→T2Cu ocurre a través del puente estructural T1Cu-T2Cu conformado por los aminoácidos Cys-His. En estudios en donde este camino químico fue modificado mediante mutagénesis sitio dirigida se observó que las variantes obtenidas eran catalíticamente inactivas. Los aminoácidos seleccionados para construir estas variantes no poseen capacidad de coordinar el T1Cu en condiciones fisiológicas, provocando de esta forma una interrupción en la conexión entre ambos centros por esta vía estructural (32, 33). También se demostró que el reemplazo de la His que coordina al T2Cu por un ligando coordinante origina formas inactivas de NirK (34). A partir de estos resultados se tiene indicios de que el puente estructural es relevante para la TE entre ambos sitios. Además, en este proceso de TE intraproteína, de manera similar a lo que ocurre en la TE interproteína, el potencial de reducción del sitio T1Cu es mayor o similar al potencial del sitio T2Cu ($E^{0'}_{\text{T1Cu}} > E^{0'}_{\text{T2Cu}}$) (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 centro T2Cu favoreciendo la TE (35, 36). Es decir, la unión del sustrato al sitio activo T2Cu incrementaría el $E^{0'}_{\text{T2Cu}}$ invirtiendo así los valores relativos de $E^{0'}$ de ambos centros ($E^{0'}_{\text{T1Cu}} < E^{0'}_{\text{T2Cu}}$). Sin embargo, estas evidencias indirectas de la modulación del $E^{0'}_{\text{T2Cu}}$ debida a la unión del sustrato no se verifican en todas las NirK, lo que podría sugerir que la TE sea un proceso complejo y que además podría involucrar alteraciones estructurales producto de la interacción enzima/dador (37, 38) contribuyendo a la modulación de los $E^{0'}$ de ambos centros.

Las NirK presentan además actividad catalítica dependiente del pH, teniendo un máximo de actividad a pH en el rango 5-6 (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 del nitrito. A pH cercanos a 8 ambos residuos se encontrarían desprotonados siendo incapaces de transferir protones al sustrato unido (39, 40). Otro factor que daría soporte a esta hipótesis es que la desprotonación del Asp_{CAT} desestabilizaría la red de puentes de hidrógeno en la que está involucrado (Figura 7c), lo que implicaría que el sustrato se une al sitio

activo en una conformación poco favorable para la catálisis. Además, es relevante destacar que las modificaciones estructurales que ocurren en la cercanía 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 $T1Cu \rightarrow T2Cu$ (40).

I.6 Relevancia del residuo His342

Como se mencionó anteriormente, el ión cobre del sitio activo de la enzima se encuentra coordinado a tres residuos de histidina y a una molécula de agua apical (W_{AP}). Dos de los residuos de histidina (His136 e His171) pertenecen a una subunidad, mientras que la tercer histidina (His342) pertenece a la cadena polipeptídica de la subunidad adyacente y se encuentra en la interfase entre ambas subunidades (Figura 7c). Stirpe y col. realizaron un estudio en una NirK de *A. faecalis* donde reemplazaron el residuo equivalente a His342 (His306) por un residuo de alanina y obtuvieron la variante denominada H306A (31). Si bien las características típicas de los sitios de cobre tipo 1 y tipo 2 (~ 2 Cu/subunidad) se observan en la forma *wild type* de la *AfNirK*, en la variante H306A la cuantificación de metales dio como resultado 1.0–1.2 átomos de Cu por subunidad. El hecho que no se detectó la señal EPR para el centro $T2Cu$ sugirió, que solo se conservó el $T1Cu$, lo cual fue confirmado espectroscópicamente por UV-vis. Aunque para H306A el centro $T2Cu$ no es detectable por EPR, la cuantificación de metal indicaría que habría una pequeña incorporación de cobre a ese nivel, lo cual es sugerido por la baja actividad catalítica que presenta la enzima (31). Es importante destacar que este tipo de variante, donde la histidina es reemplazada por una alanina, es empleada cuando se quiere obtener una enzima que carece del $T2Cu$.

Además, en su trabajo Stirpe y colaboradores analizaron la estabilidad del trímero mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para H306A observaron un perfil de DSC con una temperatura de máxima absorción de calor (T_{max}), menor a la observada en la proteína en su forma *wild type* (85°C y 100°C, para H306A y *AfNirK* respectivamente) (15, 31). Asimismo, evidenciaron una disminución significativa de la actividad enzimática respecto de la enzima en la forma *wild type*. La actividad encontrada en H306A para un lote con 1.2 átomos de Cu por subunidad, es 2.000 veces menor ($k_{cat} = 0.43 \text{ s}^{-1}$) que la observada para la enzima en la forma *wild type*. Si bien, la variante que analizaron presenta muy baja actividad, probablemente debido a la baja ocupación de cobre en el entorno donde se forma el centro $T2Cu$, el plegamiento global de la proteína y su organización trimérica no se vio significativamente afectado, aunque los resultados que obtuvieron conducen a demostrar que el residuo His306, y putativamente el enlace Cu-T2, contribuyen significativamente a la estabilidad estructural del trímero.

Se verá más adelante en este trabajo de tesis, que con la finalidad de estudiar la estabilidad estructural y funcional del trímero, se plantea el reemplazo de la histidina H342 por un residuo no coordinante como la glicina. Donde el reemplazo de un ligando coordinante, por uno no coordinante implica la disrupción de un enlace de coordinación entre el ión cobre del centro T2 y el residuo His342 de la subunidad adyacente, mientras que el resto de las interacciones no covalentes relevantes en la vinculación de las subunidades adyacentes permanecerían, en principio, estables de manera semejante a lo que se observa en la forma *wild-type* de *SmNirK*.

I.7 Relevancia del residuo Glu315

Como se mencionó previamente, dentro de la segunda esfera de coordinación del sitio activo de la enzima se encuentran dos residuos de relevancia catalítica, Asp_{CAT} e His_{CAT}, conservados en la mayoría de las NirK, estos residuos están ubicados cercanos al sitio T2Cu y están conectados por una molécula de agua puente (W_{BR}) (Figura 7c)(30). Otros dos residuos presentes en el segundo entorno de coordinación y relevantes en el proceso catalítico son Glu315 y Thr316, los cuales se encuentran conectados a His_{CAT} por enlace puente hidrógeno. Como se describió en la sección I.4, Glu315 además se encuentra unido mediante enlace puente hidrógeno al residuo His136 que se encuentra en el final de la estructura de *sensing loop*. En la Figura 8 se muestra la estructura del primer entorno de coordinación del sitio activo de *SmNirK* y tres de los residuos de relevancia catalítica de la segunda esfera de coordinación (His_{CAT}, Glu315 y Thr316).

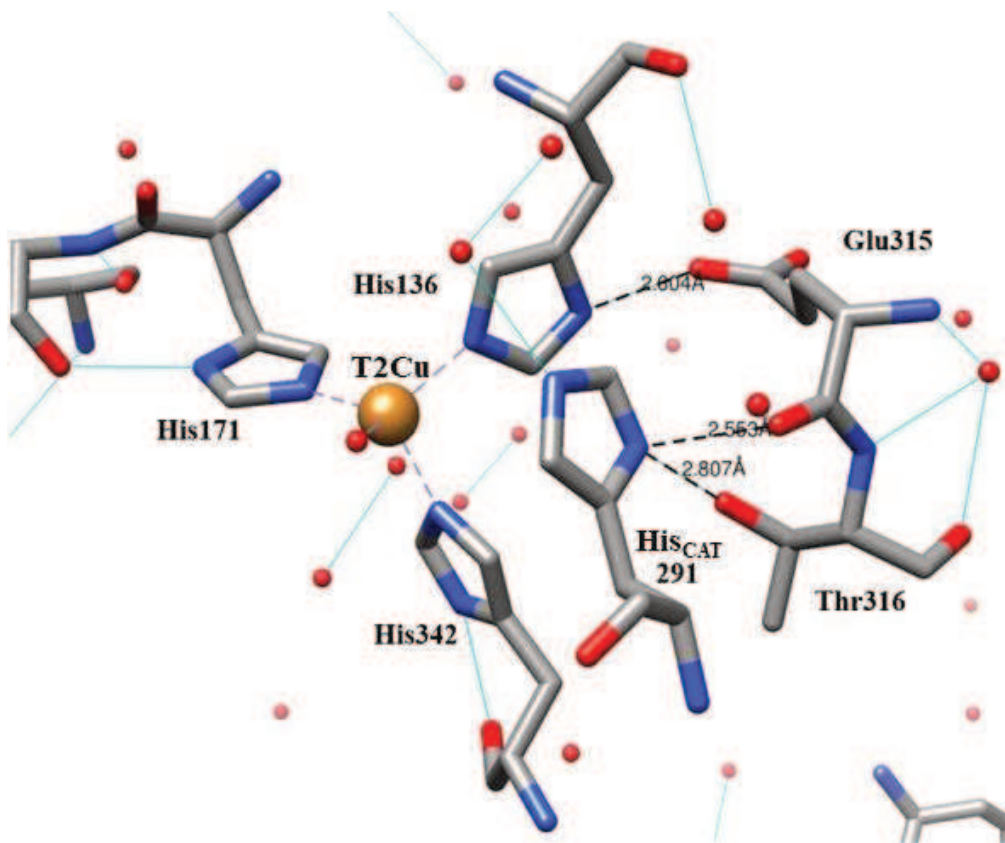


Figura 8. Estructura de T2Cu de *SmNirK* (PDB 7P2F) en donde se muestran los residuos His_{CAT}, Glu315 y Thr316 de relevancia catalítica, presentes en la segunda esfera de coordinación del sitio activo de la enzima. Se muestran el enlace puente hidrógeno H136---Glu315 y los enlaces puente hidrógeno His_{CAT}---Glu315/Thr316.

El par de residuos Glu315-Thr316 es equivalente al par Glu279-Thr280 (Glu-Thr) en *AfNirK* (PDB 5F7B) (41). Fukuda y col. observaron en estudios de difracción por rayos X, como la fotorreducción puede generar un cambio alternando la conexión de His_{CAT} (His255) con el par Glu-Thr. En su trabajo determinaron estructuras intactas de *AfNirK*, en estado de reposo (ER), donde el nitrito no se encuentra unido al T2Cu (41). Los centros de Cu en NirK se reducen rápidamente por exposición a rayos X de sincrotrón (42, 43) y tras la fotorreducción del centro T2Cu, se produce fácilmente la reducción del NO₂⁻ a NO y agua (42). La comparación entre las estructuras ER obtenidas mediante cristalografía con radiación de sincrotrón convencional (SRX) y cristalografía de femtosegundos en serie (SRF) reveló que la fotorreducción puede generar una alternación en el enlace de His_{CAT} con el par de residuos Glu-Thr. His_{CAT} alterna de enlace puente hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo de la cadena polipeptídica de Glu279 y el grupo hidroxilo de la cadena lateral de Thr280 (41). En la Figura 9 se muestra el giro de 20° del anillo de imidazol en la estructura SRX ER respecto de la estructura SFX ER donde el enlace puente hidrógeno se alternó en His_{CAT} (41).

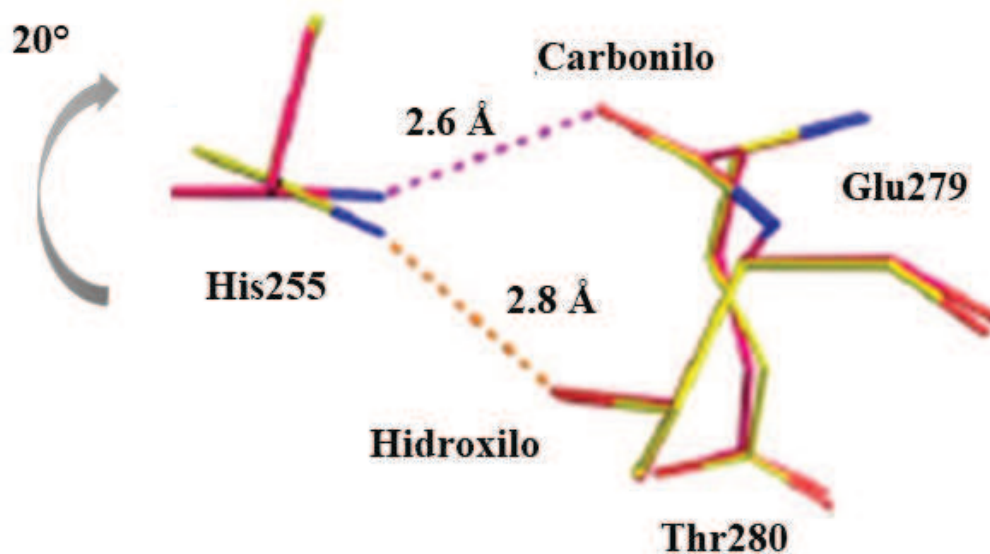


Figura 9. Cambio del par Glu-Thr. Las estructuras SFX ER y SRX ER se muestran en rosa y amarillo, respectivamente. Las líneas discontinuas representan enlaces puente de hidrógeno. Figura modificada de Fukuda y col. (41).

Los residuos Asp_{CAT} e His_{CAT}, conservados en la mayoría de las NirK, y que son esenciales para la actividad catalítica, ayudan a la transferencia de protones (TP) al sustrato (44-46). Aunque la TE intraproteína de T1Cu a T2Cu puede ocurrir en ER (47, 48), la diferencia de potenciales redox entre T2Cu y T1Cu no solo es pequeña sino que también negativa en ausencia de NO₂⁻ en la mayoría de las NirK, lo que significa que la TE intraproteína antes de la vinculación con el NO₂⁻, no es energéticamente favorable (17, 49). Por el contrario, la TE intraproteína se encuentra acelerada en presencia de NO₂⁻ (49, 50). Una explicación para este fenómeno sería que la unión del sustrato aumenta el potencial redox del centro T2Cu favoreciendo la reacción de TE (17). Se ha demostrado que la TE intraproteína está acoplada a la TP (PCET) (50, 51). Por ello, se ha especulado que la TE intraproteína contribuye en la TP a NO₂⁻, estando involucrado en este proceso el cambio estructural de His_{CAT} descrito arriba.

Aunque His_{CAT} no está vinculado al sitio T1Cu o al sitio T2Cu, la cadena lateral de Glu279 del par Glu-Thr está conectada a la His100 de *AfNirK* (equivalente a His136 en *SmNirK*) a través de un enlace puente de hidrógeno (41). His100 es ligando del sitio T2Cu y también el residuo terminal del *sensing loop* a través del cual se ajusta la TE entre T1Cu y T2Cu (52). Estas observaciones sugieren que el cambio estructural de His_{CAT} está involucrado en la reacción redox, aunque el mecanismo preciso por el cual His_{CAT} percibe los estados electrónicos de los centros de Cu, se desconocen. Estudios cristalográficos (45, 46) y estudios computacionales (53) avalan la TP indirecta de His_{CAT} a NO₂⁻ a través del puente de agua luego de la reducción del sitio T2Cu. Alternar el enlace puente de hidrógeno entre la His_{CAT} y el par Glu-Thr puede facilitar esta reacción de TP.

Debido a que el átomo de O hidroxilo del Thr280 es menos electronegativo que el átomo O carbonilo del Glu279, el átomo de $N^{\delta 1}$ de His_{CAT} forma un enlace puente hidrógeno más largo y más débil con Thr280. Como resultado, el átomo de H es más atraído por el átomo de $N^{\delta 1}$ y un protón en el átomo de $N^{\delta 2}$ se mueve hasta W_{BR} (Figura 10) (41).

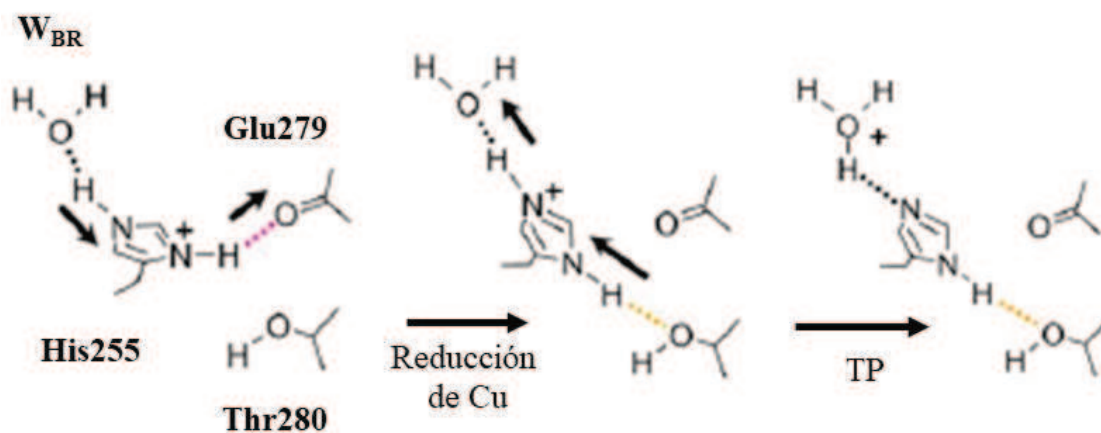


Figura 10. Propuesta de mecanismo de PT eficiente accionado por la rotación de His255 (His_{CAT}). Las líneas discontinuas representan enlaces puente hidrógeno. Enlaces puente hidrógeno fuertes y débiles involucrados en PCET están coloreados como en la Fig. 9. Las flechas negras finas ilustran las direcciones a las que los átomos de H se atraen. Figura modificada de Fukuda y col. (41).

No obstante hay que notar, que si bien los resultados presentados por Fukuda y col. son de alguna manera contradictorios con los estructurales en la *SmNirK*, (30) los cuales están además verificados por cálculos computacionales (16), donde los dos puentes de hidrógeno mostrados en la Figura 8 se encuentran presentes en la forma *as-purified* de *SmNirK* y no se requeriría de reducción de los centros de Cu para que se observe la alternancia. Cualquiera sea la explicación, es evidente que una de las relevancias de estos residuos es en el proceso de transferencia de protones necesarios para la catálisis.

Con la finalidad de analizar el sitio catalítico de *SmNirK*, se verá planteado en este trabajo de tesis el estudio del residuo Glu315, para lo cual se reemplazó este residuo por una alanina. Esta variación implica una modificación en la cadena lateral del residuo 315 que genera la pérdida del enlace puente hidrógeno de este residuo con H136, sin alterar hipotéticamente el resto de las interacciones de la primer y segunda esfera de coordinación del T2Cu. La conexión entre el residuo 315 y His_{CAT} no se vería afectada por este reemplazo ya que el enlace puente hidrógeno entre ambos residuos es a través del carbonilo de la cadena polipeptídica del residuo 315. Por otra parte, se verá además que el reemplazo de Glu315, residuo con carga negativa, por uno no polar como la alanina debería aumentar el E° del sitio T2Cu por las razones que se discutirán más adelante. Como se

mencionó anteriormente, en *SmNirK* el potencial de reducción del T1Cu es mayor al potencial del T2Cu ($E^{0'}_{T1Cu} > \sim E^{0'}_{T2Cu}$) por lo que la TE intraproteína T1Cu→T2Cu se produce en contra del gradiente de potenciales. Por tanto, la modificación propuesta, persigue modificar el $E^{0'}$ del sitio activo de la enzima, para comprobar de qué manera la diferencia de potencial T1Cu-T2Cu es un factor decisivo para la TE. Esta propuesta toma como precedente el trabajo de Goodin y colaboradores, quienes observaron un fenómeno de variación en el potencial del sitio activo de la citocromo c peroxidasa (CcP), enzima de levadura que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, cuando modificaron el residuo Asp235 perteneciente a la interacción Asp-His-Fe⁺³ presente en el centro hemo (Figura 11) (54). Esta triada Asp-His-Fe⁺³, también denominada Asp-His-X (análoga a Glu315-His136-Cu²⁺), se asemeja a la triada catalítica presente en las serina proteasas (55), al sitio activo de muchas enzimas de zinc (56, 57) y presenta una semejanza también con Glu315-His136-Cu²⁺ en *SmNirK*. En Asp-His-Fe⁺³ la histidina (His175) coordina a través del N^ε con el hierro y también forma un fuerte enlace puente hidrógeno a través de N^δ con el Asp235 (58).

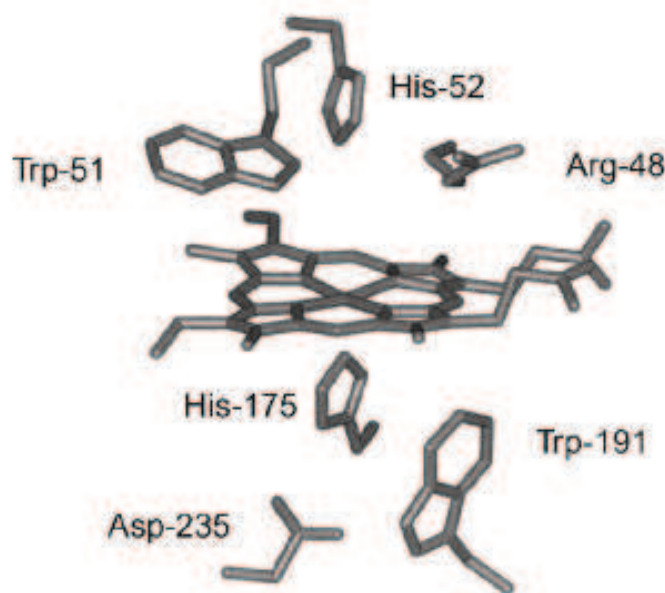


Figura 11. Estructura del sitio activo de CcP. His-175 es el ligando proximal coordinado con el hierro del hemo. Trp-191 y Asp-235 residuos en el bolsillo proximal del hemo. Arg-48, Trp-51 e His-52 residuos de bolsillos distales. Figura extraída de Erman y col. (59).

Un carboxilato bien posicionado puede influir significativamente en las propiedades del sitio activo del hemo ya sea por estabilización electrostática de la carga positiva del hierro o por desprotonación parcial (o completa) de la histidina para formar el imidazolato, aumentando así la fuerza del enlace histidina-hierro (60). También se conoce que la carga del carboxilato cerca del

centro hemo altera la energía libre electrostática de la carga neta en la porfirina férrica, esto ha sido caracterizado en variantes para mioglobina (61, 62) y cyt b5 (63). Una disminución de 200 mV en el potencial de reducción del punto medio de la mioglobina fue observado introduciendo un carboxilato en el entorno hemo distal (61).

El estudio que Goodin y colaboradores realizaron sobre las tres variantes de CcP, muestra que la modificación del residuo Asp de la triada tiene un efecto directo sobre el potencial del centro metálico atribuible al carboxilato. Las variantes que estudiaron corresponden a la sustitución del Asp235 por Glu (D235E), Ala (D235A) y Asn (D235N). Observaron que las mutaciones D235N y D235A interrumpen completamente el enlace puente hidrógeno entre la His175 y el Asp235, dejando un ligando imidazol normal, sin carga negativa a lo largo de la dirección axial del centro de hierro. Esto altera drásticamente el estado de coordinación, el potencial redox, la estructura electrónica y la función de la enzima. Mientras que D235N y D235A no pueden catalizar eficazmente la oxidación del citocromo c, D235E conserva el 41 % de la actividad respecto de la enzima en su forma *wild type*. Las propiedades espectroscópicas y funcionales sugieren que el enlace puente hidrógeno a N γ de His175 puede permanecer intacto en la variante D235E. Asimismo, observaron que la interrupción del enlace puente hidrógeno Asp235-His175 tiene un efecto drástico en el potencial redox de CcP. El potencial de reducción del centro de hierro (Fe²⁺/Fe³⁺) para CcP en la forma *wild type* tiene un valor de -182 mV, mientras que en las variantes obtuvieron -79, -78 y -113 mV para D235N, D235A y D235E, respectivamente (54). Si bien en el trabajo de Goodin y colaboradores, el 70% del aumento en el potencial del centro se realiza mediante la retención del carboxilato (D235E), sin el posicionamiento crítico necesario para un enlace puente hidrógeno fuerte con His175, en las variantes D235N y D235A se observó un incremento del 100% en el potencial con la pérdida del carboxilato y el correspondiente enlace puente hidrógeno entre la His175 y el residuo 235 (54).

II. Objetivos

II.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar del mecanismo catalítico y la estabilidad estructural de la *SmNirK*, enzima que presenta un rol clave en la vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno. Con este fin, se aplicaron técnicas de biología molecular y purificación de proteínas, y estudios cinéticos y espectroscópicos, entre otras herramientas.

II.1.1 Objetivos específicos

- I. Producir y purificar variantes de *SmNirK* que modifiquen el entorno de coordinación del sitio activo de la enzima (T2Cu) manteniendo inalterado el centro de transferencia electrónica (T1Cu).
- II. Evaluar las propiedades moleculares y espectroscópicas de las variantes obtenidas.
- III. Evaluar la función catalítica de las variantes H342G y E315A mediante ensayos cinéticos empleando el dador electrónico fisiológico *SmPaz* y dadores artificiales.
- IV. Evaluar el camino de transferencia electrónica en H342G y E315A.
- V. Evaluar la interacción sustrato con el sitio activo en H342G y E315A.
- VI. Evaluar el rol funcional y estructural del ligando His342 en la *SmNirK*.
- VII. Evaluar el efecto de la His342, ligando de la primera esfera de coordinación del T2Cu en la *SmNirK*, sobre el potencial de reducción de los centros de cobre T1 y T2.
- VIII. Evaluar el efecto del Glu135, ligando de la segunda esfera de coordinación del T2Cu en la *SmNirK*, sobre el potencial de reducción del T2Cu y su relación con la transferencia electrónica T1Cu→T2Cu.

III. *Materiales y Métodos*

Los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron obtenidos de estudios realizados con las proteínas *SmNirK*, *SmPaz* y variantes de *SmNirK*. La nomenclatura *SmNirK* será utilizada para la forma salvaje de esta proteína (*wild type*), mientras que para las variantes de *SmNirK* se utilizará E315A y H342G. En un trabajo previo realizado por integrantes del grupo de investigación (11), se realizó la amplificación de los genes que codifican para *SmNirK* y *SmPaz* a partir del ADN genómico y el clonado de los mismo fue realizado en el vector de expresión que permite la obtención de proteínas recombinantes.

III.1 Metodologías utilizadas para la obtención de las variantes de *SmNirK*

III.1.1 Mutagénesis sitio dirigida

Los residuos His342 y Glu315 fueron reemplazados por glicina (G) y alanina (A) obteniéndose las variantes H342G y E315A, respectivamente. Estas variantes fueron construidas a partir del plásmido p22SK que codifica para *SmNirK* (11). 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 puntual. 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 puntual (ver Tabla 2) en un volumen de reacción de 50 μ L siguiendo el programa descrito en la Tabla 3. En cada reacción se usó 0.2 μ M de cada primer, aproximadamente 10 ng de ADN molde, 0.6 U/ μ L de TransTaq[®] HiFi *DNA polymerase* (TransGen Biotech Co.), tampón comercial de reacción de PCR 1X de TransTaq[®] HiFi suplementado con *CG Enhancer* comercial 1X (TransGen Biotech Co.) y 0.2 mM de dNTPs (Genbiotech). Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v) y luego se purificaron usando kit comercial Puro Clean Up (PBL, Argentina). Los detalles de la técnica electroforesis en gel de agarosa se muestran en sección III.1.2. Los productos de la reacción de amplificación se trataron con *DpnI* (Promega) en un volumen final de 20 μ L de solución mezcla conteniendo: 10 μ L del producto de PCR purificado, tampón comercial 1X (Promega), 2 μ g de BSA acetilada y 5 U de enzima *DpnI* (Promega). La solución se incubó 2 h a 37 °C y posteriormente la enzima se inactivó a 65 °C durante 20 min.

El producto obtenido luego de la incubación, se utilizó para transformar células competentes TOP 10 de *E. coli*. En las secciones III.1.3 y III.1.4 se detalla la cepa bacteriana, plásmido y

procedimientos de la transformación. Las colonias aisladas fueron crecidas separadamente en medio LB líquido (ver sección III.1.5) suplementado con ampicilina para posterior extracción de ADN plasmídico. Por último, se realizó la secuenciación para confirmar la mutación puntual. Los detalles de la extracción de ADN y secuenciación se describen en las secciones III.1.6 y III.1.7. Al final del procedimiento descrito se obtuvieron las construcciones que contienen las mutaciones, de ahora en más denominadas p22SK-H342G y p22SK-E315A. En la Tabla 4 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.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de mutagénesis sitio dirigida.

Variante	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Orientación
H342G	CCTACGTCAACGGTAACCTGATCG	69.2	Forward
	CGATCAGGTTACCGTTGACGTAGG		Reverse
E315A	CGTCGATCAGGCGACCTGGTTCATACC	77.4	Forward
	GGTATGAACCAGGTCGCCTGATCGACG		Reverse

Tabla 3. Programa de PCR para la mutagénesis sitio dirigida.

Etapa	Numero de ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	180	94
Desnaturalización	30	30	94
Hibridación		30	60
Elongación		420	72
Elongación final	1	300	72

Tabla 4. 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</i> 1250	1131
p22SK-H342G	H342G		
p22SK-E315A	E315A		
p22SPaz	<i>SmPaz</i>	<i>SMA</i> 1243	444

III.1.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 2% (p/v) utilizando marcadores de ADN (Thermo Fisher Scientific) y solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM a pH 8; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM). La visualización de las bandas de ADN se realizó utilizando GelGreen (BIOTIUM) como fluoróforo bajo luz azul (400-500 nm) utilizando un transluminador.

III.1.3 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el clonado y expresión de las proteínas

Para el clonado de las variantes se utilizó la cepa de *E. coli* Top10 F' cuyo genotipo se detalla en la Tabla 5. En esta tabla se describe, además, el genotipo de la cepa BL21(DE3) utilizada para la expresión de las proteínas recombinantes, mencionada más adelante (sección III.2.1). El plásmido utilizado para el clonado y la expresión de las proteínas fue pET-22b(+) (Novagen) el cual es utilizado para sobre-expresar proteínas recombinantes en forma soluble y activa, confiriendo resistencia a ampicilina al organismo transformado.

Tabla 5. Características y usos de las cepas de *E. coli* utilizadas.

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

III.1.4 Obtención de células competentes y transformación

Medio LB fue inoculado con células *E. coli* e incubado durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm de modo de obtener el pré-inóculo. Un volumen de 0.5 mL de cultivo saturado fue utilizado para inocular 50 mL de medio SOC estéril que fue luego incubado en las mismas condiciones descriptas previamente hasta una DO₆₀₀ (densidad óptica medida a 600 nm) de aproximadamente 0.4-0.6. Posteriormente, las células fueron incubadas en hielo durante 10 min, centrifugadas a 4000 xg por 5 min a 4 °C y resuspendidas en 15 mL de tampón CMG estéril (CaCl₂ 50 mM, MgCl₂ 50 mM) e incubadas en hielo por 15 minutos. Las células se recolectaron mediante centrifugación en las mismas condiciones descriptas, se resuspendieron nuevamente en 3.5 mL de tampón CMG, se incubaron durante 5 min en hielo, se agregaron 125 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril frío y se incubaron

5 minutos más en hielo. El agregado de DMSO e incubación se repitió una vez más. Las células resuspendidas fueron fraccionadas en alícuotas de 250 μ L en tubos de plástico estériles, congeladas con N₂ líquido y almacenadas en freezer a -80 °C hasta su uso.

La transformación de estas células competentes con ADN plasmídico se logró mediante el protocolo de cuatro pasos que se describe a continuación. En primer lugar, 250 μ L de células competentes fueron incubadas en hielo con aproximadamente 4 ng de ADN plasmídico 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 μ L de medio LB fresco e incubación a 37°C durante 1 h en agitación a 200 rpm. Por último, las células fueron plaqueadas en medio sólido LB-agar (ver sección III.1.5) suplementado con el antibiótico correspondiente e incubadas a 37°C durante toda la noche de manera de obtener colonias aisladas.

III.1.5 Medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli* utilizados en el clonado y expresión de las proteínas

En la Tabla 6 se detalla la composición de los dos medios de cultivos utilizados en las técnicas de clonado y expresión de *SmNik*, *SmPaz* y las variantes de *SmNirK*. El medio ZYM-5052 es un medio de cultivo de autoinducción en el que se obtiene mayor cantidad de biomasa (64). Ambos medios de cultivos fueron utilizados para el crecimiento de células y expresión de proteínas recombinantes en mayor escala. El medio LB también fue utilizado para cultivos pequeños requeridos para la obtención de células competentes y extracción de ADN plasmídico (miniprep). El aislamiento de colonias en medio sólido se realizó en medio LB suplementado con agar-agar en placas de petri incubando a 37 °C durante toda la noche.

Los medios de cultivos fueron suplementados con antibiótico y solución de CuSO₄ cuando fue requerido. El antibiótico utilizado fue ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. La inducción de la expresión de proteínas en el medio LB fue realizada con Isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 48 mg/L (0.2 mM).

Tabla 6. 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

III.1.6 Extracción de ADN plasmídico

Para extraer el ADN plasmídico de las bacterias *E. coli* Top10 transformadas con las diferentes construcciones (Tabla 4) se utilizó un kit comercial (Nzytech) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido fue conservado a -20 °C hasta su uso.

III.1.7 Secuenciación de ADN

Para confirmar las mutaciones puntuales introducidas para generar las variantes H342G y E315A, alícuotas de ADN plasmídico (~200 µg/mL) fueron enviadas para secuenciación a la empresa MacroGene.

III.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

III.2.1 Crecimiento de células *E. coli* y expresión de proteínas

Diferentes condiciones de expresión fueron evaluadas en pequeña escala (5 a 10 mL) para lograr las condiciones óptimas de cultivo de células de *E. coli* para la expresión de proteínas. En estas pruebas 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 y tiempo 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 células de *E. coli* BL21(DE3) (ver sección III.1.4) con cada uno de los vectores de expresión (Tabla 4). En todos los casos, los crecimientos se realizaron en condiciones aeróbicas y los cultivos se iniciaron a partir de un pre-inóculo saturado de las células transformadas en medio LB. Se utilizaron frascos de Erlenmeyers de 2 L y un agitador orbital con temperatura controlada. Todos los crecimientos se realizaron en presencia de antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) y se monitoreó el crecimiento celular midiendo la DO_{600} .

Para la producción de *SmNirK* y H342G, células BL21(DE3) transformadas con las construcciones p22SK y p22SK-H342G, respectivamente, fueron crecidas en medio ZYM-5052 (64) en inducción continua con lactosa durante 26 h a 200 rpm y temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). El medio de cultivo fue suplementado con Cu_2SO_4 (0.2 mM). En la última etapa del crecimiento, se adicionó Cu_2SO_4 en una concentración final de 0.4 mM y se incubó durante 4 h a 80 rpm.

Para la producción de *SmPaz* y E315A, células BL21(DE3) transformadas con las construcciones p22SPaz y p22SK-E315A, respectivamente, fueron cultivadas en medio LB a 200 rpm y 37 °C hasta una DO_{600} de aproximadamente 0.6 unidades de absorbancia. A partir de ese momento, se adicionó Cu_2SO_4 en una concentración final de 0.6 mM y 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.

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

III.2.2 Obtención del extracto soluble

Las células obtenidas durante los cultivos celulares se resuspendieron en tampón de baja fuerza iónica Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF, Roche) como inhibidor de proteasas. Posteriormente se les adicionó Cu_2SO_4 (1-10 mM), con el objetivo de inducir la formación de los centros metálicos de las proteínas. La disrupción celular se realizó utilizando un sonicador Vibra Cell™ VC 750 realizando ciclos de 1 min a 50 % de amplitud manteniendo las células siempre en baño de hielo de manera de evitar el calentamiento de las mismas. El extracto bruto obtenido se centrifugó durante 60 min a $13000\times g$ y 4 °C, se descartó el pellet y la fracción soluble (extracto soluble) se dializó por al menos 12 h contra el tampón Tris-HCl 10mM (pH 7.6).

III.2.3 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. En la sección III.3.3 se indica la metodología para SDS-PAGE. En los protocolos donde se requirió dos pasos de purificación, luego de la primera columna cromatográfica se realizó un paso de diálisis durante aproximadamente 12 h contra el tampón de equilibrado utilizado en el paso de purificación posterior.

III.2.3.1 Purificación de *SmNirK* y sus variantes

La purificación de *SmNirK* se realizó según protocolo previamente publicado (11) incorporando algunas modificaciones. En todo el proceso se utilizó Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) 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 del 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 la resina DEAE *Sepharose 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.

Las variantes de *SmNirK* fueron aisladas mediante un protocolo de un solo paso empleando la resina de cromatografía de intercambio aniónico débil DEAE *Sepharose Fast Flow* (GE-Healthcare) equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7.6). Una vez que el extracto soluble fue sembrado en la resina, se realizó un paso de lavado con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y luego se realizó un gradiente lineal de fuerza iónica con NaCl de 0 a 300 mM, en 15 volúmenes de columna.

La pureza de la muestra se evaluó mediante espectroscopía UV-vis y SDS-PAGE y las fracciones proteicas puras se dializaron contra tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) y Cu_2SO_4 50 μM , se concentraron utilizando una unidad Centricon® (10 000 NMWL) y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

III.2.3.2 Purificación de SmPaz

Para esta proteína todos los pasos cromatográficos se realizaron con un tampón de fosfato de potasio (KPB) 5 mM a pH 6.0. 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 Sepharose* (GE-Healthcare) previamente equilibrada con KPB 5 mM (pH 6.0). La elución de la proteína se realizó mediante gradiente salino con NaCl (0-300 mM) preparado en el mismo tampón KPB en 15 volúmenes de columna. La proteína purificada fue dializada contra el mismo tampón, concentrada y almacenada a -80 °C.

III.2.4 Concentración y diálisis 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 Centricon® (10 000 NMWL) para centrífuga. En cada caso se utilizaron dispositivos con membranas de *cut off* adecuado (10 o 30 kDa) según la proteína a concentrar.

III.3 Metodologías utilizadas para la determinación de propiedades moleculares

III.3.1 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el método de Lowry (65) utilizando albúmina sérica bovina como proteína patrón (0-0.5 mg/mL). La determinación se realizó siempre con un error menor al 10 %.

III.3.2 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 (GE Healthcare). La columna se equilibró con tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6) suplementado con NaCl 150 mM. 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 aproximada de las subunidades fue determinada mediante SDS-PAGE (ver sección III.3.3).

III.3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizó SDS-PAGE según el método de Laemmli (66) para determinar el grado de pureza de fracciones obtenidas durante el proceso de purificación así como también durante la determinación de la masa molecular aproximada de la subunidad proteínica. El porcentaje de acrilamida utilizado fue de 12 y 15% para *SmNirK*/variantes y *SmPaz*, respectivamente. Los marcadores de masa molecular fueron adquiridos en Biorad.

III.3.4 Determinación del contenido de cobre

La determinación de cobre se realizó con un método basado en la formación de un complejo entre Cu(I) y 2,2'-biquinolina en medio de ácido acético utilizando acetato de cobre (II) como estándar (rango de concentración 100-500 μM) con algunas modificaciones (67, 68).

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 DO_{600} . 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 a una concentración de $\sim 200 \mu\text{M}$ en una mezcla de tampones MES/CAPS/Tris-HCl (pH 6) cada uno a una concentración de 30 mM (tampón Mix). 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.

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/>) (69). Los espectros fueron simulados asumiendo el Hamiltoniano de espín: $\hat{H} = \mu_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{\mathbf{S}}$ 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{S} e \hat{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.4.3 Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por UV-vis y EPR

La reducción controlada y posterior reacción con sustrato monitoreada por UV-vis y EPR se llevó a cabo bajo atmósfera de argón. Las soluciones de proteínas se prepararon en tampón Mix y las soluciones de reductores (ascorbato de sodio y ditionito de sodio) y sustrato se prepararon en Tris-HCl 100 mM (pH 7.6) y en todos los casos fueron mantenidas bajo atmósfera de argón. El rango de concentraciones de las soluciones de ascorbato de sodio, 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 fue realizada utilizando jeringas *gas-tight* Hamilton asegurando las condiciones anaeróbicas y homogeneizando luego de cada agregado. Para los ensayos de EPR estas mezclas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en esas condiciones hasta su medición, mientras que en los ensayos por UV-vis los espectros fueron adquiridos luego de la homogenización.

III.5 Métodos cinéticos. Ensayos de actividad enzimática

III.5.1 Método continuo

La actividad enzimática de *SmNirK* y las variantes frente al dador electrónico se evaluó mediante un ensayo cinético continuo de estado estacionario, adaptado de un protocolo previamente publicado (38). El ensayo consistió en monitorear espectrofotométricamente a 597 nm la oxidación de *SmPaz* en presencia de la enzima y nitrito. Brevemente, una solución que contiene una mezcla de la enzima y *SmPaz* preparada en tampón Mix (pH 6.0), se hizo reaccionar con una solución de ditionito de sodio 0.02 g/ml hasta la reducción completa (absorbancia a 597 nm cercana a 0). La reacción cinética fue iniciada mediante la adición de solución de nitrito con jeringa Hamilton *gas-tight*. La concentración final fue de 25 nM para la enzima, 20 μ M para *SmPaz* y NaNO_2 (0-1.0mM), en un volumen final de 1050 μ L. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante y bajo atmósfera de argón. Todas las soluciones de reactivos fueron preparadas en Tris-HCl 100mM (pH 7.6) y burbujeadas con argón antes de su uso para minimizar la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción.

III.5.2 Método discontinuo

La actividad enzimática de H342G también se ensayó mediante un método cinético discontinuo utilizando metil viologen (MV) como dador electrónico artificial. Para este ensayo se procedió según el protocolo previamente descrito (11) pero con algunas modificaciones. El ensayo se inició con el agregado de 50 μL de una dilución de la 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 tampón Mix (pH 6.0). La reacción cinética en cada ensayo se llevó a cabo con 50 nM de enzima. Luego de 2.5 minutos de reacción, 25 μL de la solución fueron diluidos en tampón Mix 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 HCl 3 M 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.

III.6 Ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia

Los ensayos de desplazamiento térmico (EDT) se realizaron utilizando el programa de *melting curve* en un equipo Step One Real-Time PCR SystemTM (Applied Biosystems) con un incremento de temperatura de 1 $^{\circ}\text{C}$ y un rango de 25 a 95 $^{\circ}\text{C}$. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μL usando tiras de 8 tubos de PCR que contenían 10 μM de proteína recombinante (de tipo nativa o mutante H342G), 4 \times de solución de SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) y tampón de MES/CAPS/HEPES 30 mM (rango de pH 6.0-7.0). Cada reacción se repitió nueve veces y se promedió. También se incluyó un control sin proteína para todas las condiciones. Se realizó un ajuste no lineal del conjunto de datos truncados a una curva sigmoidea de Boltzmann (Ecuación 1) para estimar la temperatura *melting* (T_m), la cual corresponde a la temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada. El programa utilizado en el ajuste fue Origin Software, donde “y” es la emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias, “superior” es la fluorescencia máxima en la parte superior del conjunto de datos truncado, “inferior” es la fluorescencia de referencia a baja temperatura, “x” es temperatura y “pendiente” la inclinación de la curva (70).

$$y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / \left[1 + \exp\left(T_m - \frac{x}{\text{pendiente}}\right) \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

III.7 Métodos computacionales

Se utilizó la estructura recientemente disponible de *SmNirK* (ID de PDB: 7P2F) (30) como plantilla para construir las variantes. Como se obtuvo un modelo mediante cálculos combinados de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) de *SmNirK* que resultó ser muy similar a la estructura cristalina de *SmNirK*, se empleó este modelo como validación y referencia estructural (34). Los átomos de hidrógeno y los estados de protonación a pH 7.0 de los residuos titulables (p. ej., His, Glu, Asp) se agregaron utilizando el procedimiento empírico PROPKA, empleando el servidor *pdb2pqr* (71). El residuo catalítico His291 (His_{CAT}) se protonó tanto en N_δ como en N_ε y Asp134 (Asp_{CAT}) se desprotonó. La estructura se solvató con una capa de moléculas de agua con 6 Å alrededor de los residuos de la superficie (Figura 12, izquierda). Para neutralizar el sistema se añadieron 9 iones Na⁺. Se realizó una breve simulación de dinámica molecular para relajar los átomos de hidrógeno y las moléculas de agua de solvatación junto con los átomos de la columna vertebral de todos los residuos fijados. Los cálculos QM/MM se realizaron tal como se implementó en el código Gaussian 09 (72). Para la parte QM, se usó el funcional WB97XD polarizado por espín, que incluye correcciones empíricas de dispersión átomo-átomo (73), mientras que el campo de fuerza clásico Amber se usó para la parte MM (74). La base establecida para los átomos en la parte QM fue 6-31G(d,p). Tratamos en la parte QM todos los residuos y moléculas de agua que rodean los centros T1 y T2 (Figura 12, derecha), que en nuestro modelo comprendían residuos de las subunidades A y C. Por lo tanto, los residuos His131, Asp134, His136, Tyr170, His171, Cys172, Ala173, His181, Met186, His291, Ile293, His342 (Gly342 en H342G) se trataron como átomos QM y el resto de los átomos como átomos MM. Seis moléculas de agua, W_{AP} coordinado con el centro T2, W_{BR} puente catalítico His291 y Asp134 y otras cuatro moléculas relevantes que se encuentran en la estructura PDB ID: 7P2F también se trataron en la parte QM. Para la variante H342G se estudiaron tres modelos, uno, 0W-H342G, asumiendo que la ausencia de la cadena lateral C_β-Imidazol de His342 conduce a la formación de un vacío, y 2W-H342G y 4W-H342G con 2 y 4 moléculas de agua adicionales llenando el vacío, respectivamente. Las estructuras se optimizaron con los residuos de QM libres para relajarse y manteniendo fijos en posición los átomos tratados en la parte de MM. Las coordenadas estructurales QM para los diferentes modelos se dan como datos complementarios. Para la variante E315A, el campo eléctrico se calculó a partir del gradiente del potencial electrostático que se obtiene del método de QM/MM anteriormente descrito.

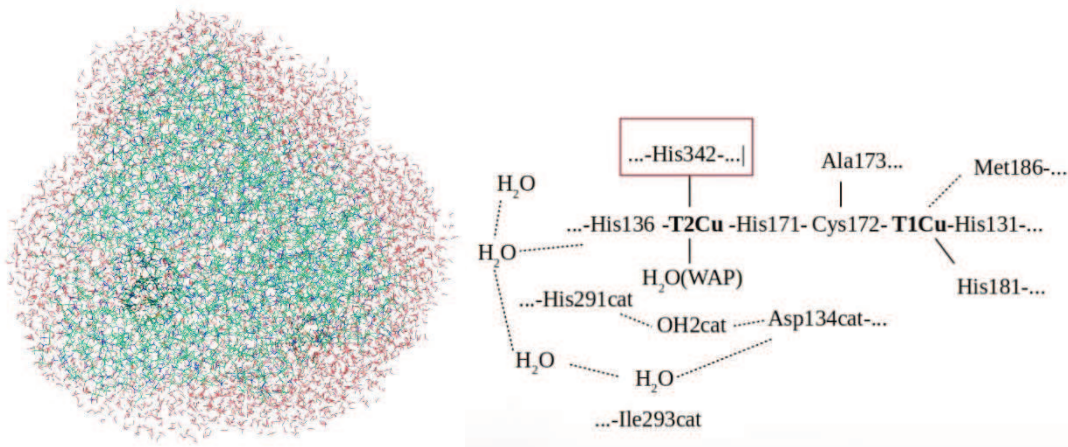


Figura 12. Izquierda: estructura solvatada de *SmNirK* con una capa de moléculas de agua con 6 Å alrededor de los residuos de la superficie para los cálculos de QM/MM. La figura se realizó utilizando el programa VMD con parámetros predeterminados. Derecha: residuos de aminoácidos, moléculas de agua y átomos tratados como átomos QM.

IV. Resultados y Discusión

IV.1 Resultados H342G

IV.1.1 Propiedades moleculares

La caracterización molecular de H342G se realizó mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular, y cuantificación de metales. Mediante SDS-PAGE se observó una banda correspondiente a una masa molecular de ~40 kDa (Figura 13), mientras que a través del análisis de los datos obtenidos por cromatografía de exclusión se obtuvo una masa molecular de ~125 kDa. Estos resultados indican la presencia de un homotrímero y se encuentran en línea con los reportados previamente para *SmNirK* (11). La estructura cuaternaria de la enzima no se encuentra modificada tras la mutación. Una conclusión similar se obtuvo tras la mutación del residuo His306 en *AjNirK* (31).

Para H342G el análisis de metales identificó 2.1(2) Cu/subunidad, resultado que se corresponde con los sitios T1 y T2 totalmente ocupados y se encuentra en línea con lo reportado para *SmNirK* (Tabla 7) (11). A diferencia de lo observado por Stirpe y col. para *AjNirK* (31), la sustitución del residuo H342 por glicina en *SmNirK* no afectó la incorporación de cobre en el sitio T2.

Tabla 7. Propiedades moleculares, Características estructurales y espectroscópicas (UV-vis y EPR) de *SmNirK* y H342G.

	<i>SmNirK</i>	H342G
Masa molecular de la subunidad (kDa)	~40	
Conformación estructural	trímero	
Átomos de Cu / subunidad	2.0	2.1
Espectro UV-vis	$\lambda(\text{nm})$ [ϵ ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]	
	393, 456 [3.3], 586 [2.9], 670-780	395, 460 [3.4], 586 [3.1], 670-780
Espectro EPR	$g_{\parallel}, A_{\parallel}$ (G)	
T1Cu	2.190, 70	
T2Cu	2.315, 150	2.277, 175

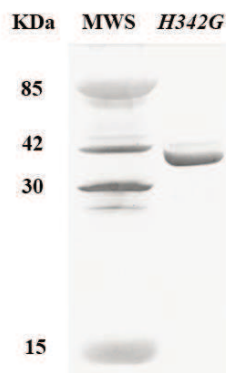


Figura 13. SDS-PAGE de H342G. Los marcadores de masa molecular se indican en kDa (Genbiotech).

IV.1.2 Actividad catalítica

La caracterización cinética de H342G se realizó mediante un ensayo cinético continuo utilizando el dador electrónico fisiológico *SmPaz*. El uso de *SmPaz* como donador de electrones permite evaluar la actividad catalítica de la enzima garantizando que los electrones sean entregados al sitio activo a través de la reacción de TE T1Paz→T1NirK→T2NirK. En la Figura 14 se muestran ejemplos representativos de la reoxidación de *SmPaz* en función del tiempo tras la adición de nitrito para H342G y *SmNirK*, junto con los gráficos de Michaelis-Menten obtenidos (ver recuadro inserto en la figura).

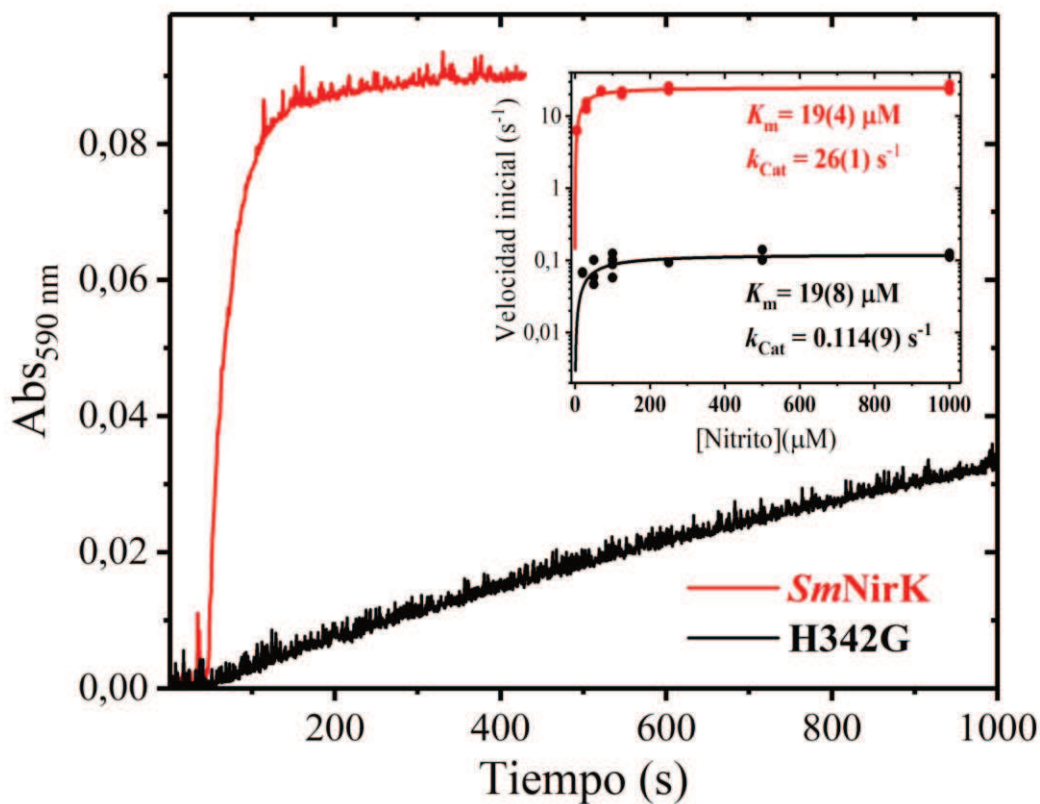


Figura 14. Evolución temporal de la oxidación de *SmPaz* (reducción de nitrito) catalizada por *SmNirK* (rojo) y la variante H342G (negro) para una concentración de nitrito de 1000 μM . Recuadro: Gráficos de Michaelis-Menten en función de la concentración de nitrito (en escala logarítmica para una mejor comparación).

Los valores $K_m = 19(8) \mu\text{M}$ y $k_{\text{Cat}} = 0.114(9) \text{ s}^{-1}$ de H342G indican un número de recambio ~ 100 veces menor en comparación con la enzima en su forma *wild type* ($K_m = 19(4) \mu\text{M}$ y $k_{\text{Cat}} = 26(1) \text{ s}^{-1}$). Este resultado está en línea con los datos cinéticos obtenidos en H306A, donde se informó una disminución del número de recambio de ~ 2000 veces en comparación con la enzima *wild type* (31). La diferencia entre H342G y H306A probablemente se deba al contenido completo de cobre en T2

de H342G. Las relaciones k_{cat}/K_m de 1.4 y 0.006 para *SmNirK* y H342G, respectivamente, sugieren que la afinidad por el sustrato se ve significativamente afectada, en relación con la perturbación que implica la mutación del residuo 342. El hecho de que la variante H342G muestre alguna actividad enzimática con *SmPaz* indica que la falta de His342 no suprime el ciclo catalítico de la enzima. Lo cual significa, como se demostrará más adelante, que no solo el nitrito se une al sitio activo, sino también que el camino de TE Cys172-His171 se encuentra operativo.

La cinética de reacción se evaluó también empleando 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 (75, 76). A diferencia de *SmNirK*, H342G no presentó actividad catalítica con este ensayo. Es relevante destacar en este punto, que H342G presentó menor estabilidad en los ensayos donde se empleó ditionito de sodio. Por lo tanto, no detectar actividad en H342G cuando se emplea MV como dador electrónico podría deberse a una combinación de una baja actividad enzimática intrínseca y a la inestabilidad de ésta frente a la concentración de ditionito de sodio empleada en el ensayo.

IV.1.3 Caracterización espectroscópica

IV1.3.1 Espectroscopía de absorción UV-vis

La caracterización espectroscópica por UV-vis de H342G se muestra en la Figura 15. En esta figura se comparan los espectros de absorción de H342G y *SmNirK* (espectros negro y rojo respectivamente) a pH 6.0. Se puede observar que ambos espectros se componen principalmente de dos bandas de absorción ubicadas a 586 y 460 nm características de los espectros de las NirK verdes asociadas al centro T1Cu. Como se mencionó en el capítulo introductorio, la primera banda se atribuye a la transición de transferencia de carga (TC) $(3p\pi)S(Cys) \rightarrow (d_x^2-y^2)Cu^{2+}$ mientras que la banda a 460 nm se atribuye a la transición de TC $(3p\sigma)S(Cys) \rightarrow (d_x^2-y^2)Cu^{2+}$. En la Tabla 7 se incluyen las longitudes de onda (λ) y los coeficientes de extinción molar (ϵ) de las bandas de máxima absorción de *SmNirK* y H342G. En la comparación de ambos espectros se observa que las dos proteínas presentan intensidades similares en los picos de absorción. Además, puede apreciarse que al igual que en el caso de la forma *wild type*, el espectro de H342G presenta una banda de absorción más ancha centrada a los 670-780 nm correspondiente a transiciones d-d y una banda de absorción ubicada a ~ 393 nm atribuida a la transición de TC que ocurre debido al enlace S(Met)-Cu. Las posiciones de las bandas de absorción y la relación del coeficiente de extinción $\epsilon_{460}/\epsilon_{586} = 1.10$ de H342G son muy similares a las de *SmNirK* ($\epsilon_{456}/\epsilon_{586} = 1.13$), indicando que la mutación a nivel de T2Cu no modifica

significativamente las propiedades electrónicas del T1Cu. Este resultado está en línea con lo observado por Stirpe y col., donde H306A presentó un espectro de absorción UV-vis de características similares al observado para *A/NirK* (31).

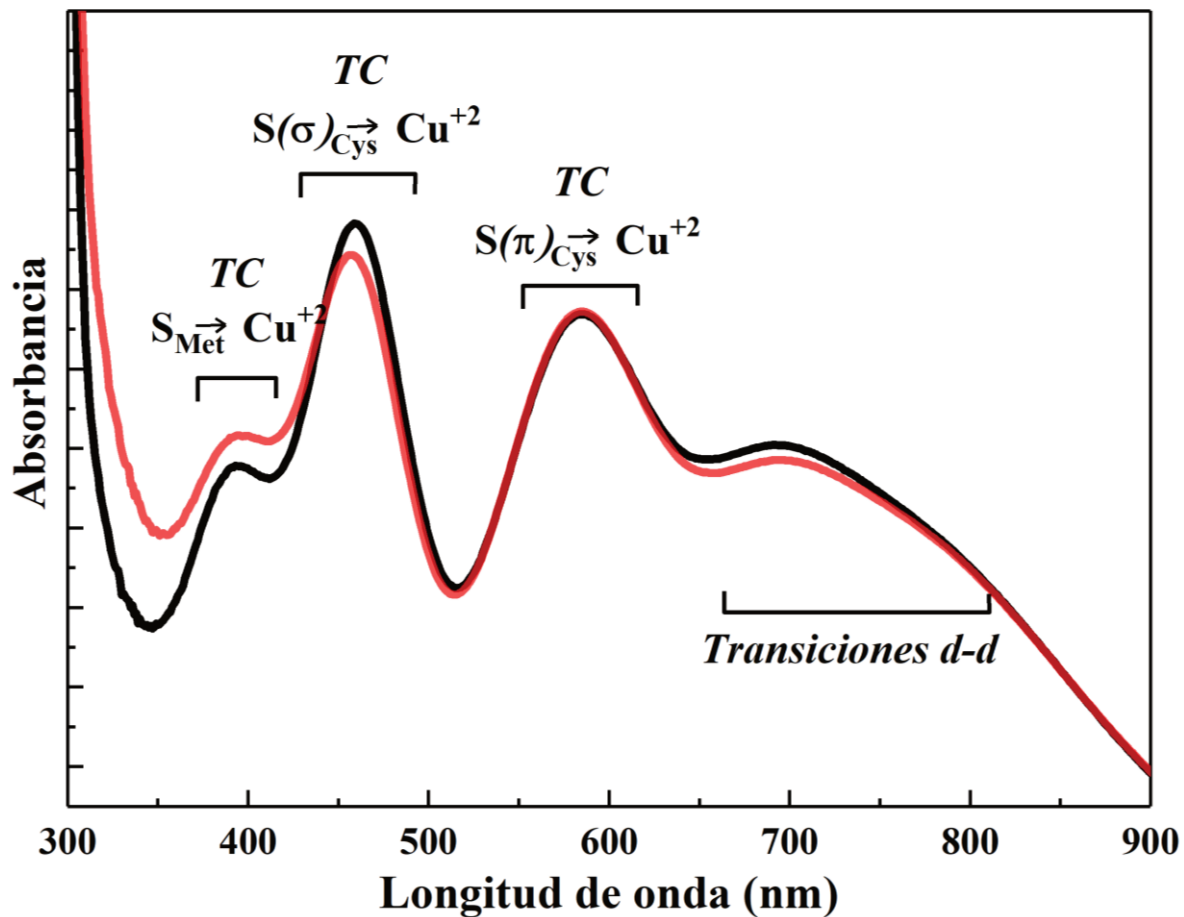


Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis de H342G (negro) y *SmNirK* (rojo) a pH 6.0 en los que se encuentran indicadas las transiciones asignadas a cada banda de absorción (TC: transferencia de carga).

IV.1.3.2 Espectroscopía de EPR

En la Figura 16a se presentan los espectros obtenidos en banda X a pH 6.0 para *SmNirK* y H342G, en sus formas *as-purified* (espectros rojo y negro respectivamente). En ambos espectros se observan dos componentes espectrales superpuestas correspondientes a T1Cu y T2Cu. En la Tabla 7 se muestran los valores de $g_{//}$ y $A_{//}$ determinados para los centros T1Cu y T2Cu.

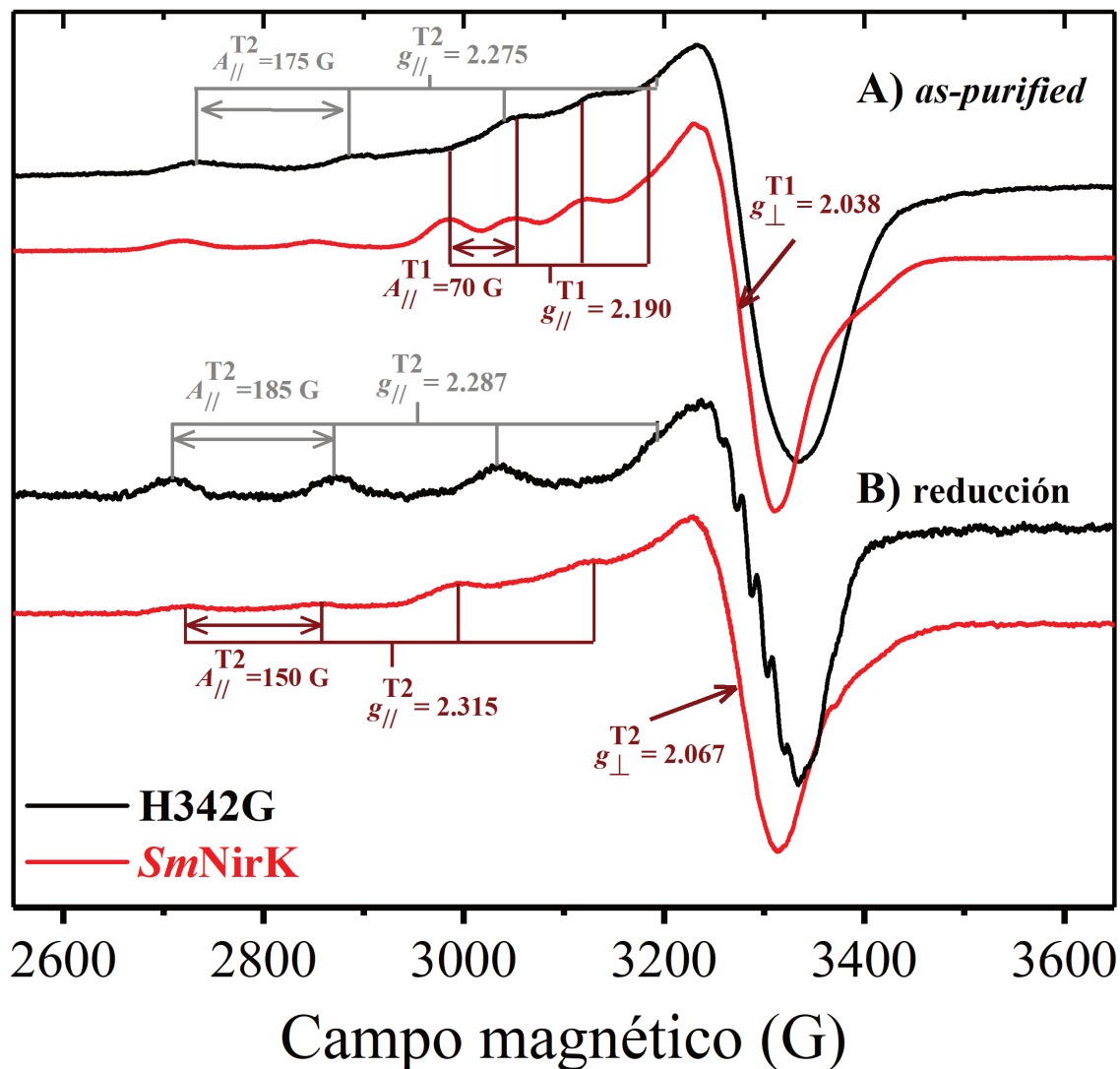


Figura 16. Espectros EPR de H342G (negro) y *SmNirK* (rojo). Las muestras de proteínas se prepararon en tampón MIX pH 6.0. La reducción con ascorbato se realizó en atmósfera de argón; la concentración final de ascorbato de sodio fue de 10 mM. Las condiciones experimentales fueron frecuencia de microondas, 9.45 GHz; potencia de microondas, 2 mW; amplitud del campo de modulación, 2 Gpp; frecuencia de modulación, 100 kHz; temperatura, 120 K.

La simulación espectral del sitio T1Cu para H342G arrojó $g_{//} = 2.190$, $A_{//} = 70$ G, que son idénticos a los de *SmNirK* (11). Para el caso del sitio T2Cu en H342G la señal no está bien definida, ya que se observan resonancias más intensas flanqueadas por otras menos intensas. Para el T2Cu de H342G, considerando solo las resonancias más intensas, la simulación arrojó $g_{//} = 2.275$, $A_{//} = 175$ G. Estos parámetros de EPR para T2Cu difieren de los obtenidos en *SmNirK* ($g_{//} = 2.315$ y $A_{//} = 150$ G), lo que está en consonancia con la mutación puntual realizada. En la Figura 17, panel izquierdo se muestra la simulación de H342G *as-purified* (espectro azul) asumiendo dos centros T2Cu y T1Cu independientes superpuestos. Los parámetros EPR para T1Cu fueron $g_{x/y/z} = 2.023, 2.052, 2.190$ y $A_{x/y/z} = 4.0, \text{n.d.}, 7.0$ mT, mientras que para T2Cu fueron $g_{x/y/z} = 2.055, 2.075, 2.275$ y $A_{x/y/z} = \text{n.d.}, \text{n.d.}, 17.5$ mT para el componente mayoritario de la señal del T2Cu (70 %); y $g_{x/y/z} = 2.055, 2.075, 2.225$ y $A_{x/y/z} = \text{n.d.}, \text{n.d.}, 18.0$ mT para el componente minoritario de la señal del T2Cu (30 %).

Para H342G la presencia de resonancias adicionales en el $g_{//}$ del T2Cu sugiere un centro de cobre con cierta anisotropía estructural o un espectro más complejo resultante del acoplamiento T1-T2 por intercambio ($H = -J S_{T1} \cdot S_{T2}$). La mejor coincidencia entre experimento y simulación se obtuvo con esta última posibilidad ($g_{//} = 2.300$ y $A_{//} = 195$ G para T2, $J = 0.009 \text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, se deberían realizar experimentos de EPR a diferentes frecuencias de microondas para llegar a una conclusión definitiva sobre este tema. En la Figura 17, panel izquierdo, se muestra la simulación de H342G *as-purified* (espectro rojo) asumiendo que T1Cu y T2Cu están acoplados por intercambio isotrópico. Los parámetros EPR para T1Cu fueron $g_{x/y/z} = 2.023, 2.052, 2.190$ y $A_{x/y/z} = 4.0, \text{n.d.}, 7.0$ mT, mientras que para T2Cu fueron $g_{x/y/z} = 2.025, 2.090, 2.300$ y $A_{x/y/z} = \text{n.d.}, \text{n.d.}, 19.5$ mT; $J_{T1-T2} = 0.009 \text{ cm}^{-1}$. Se calculó que la interacción dipolo-dipolo bajo la aproximación dipolo puntual era $< 0.001 \text{ cm}^{-1}$. Por lo tanto, su contribución forma parte del ancho de línea espectral.

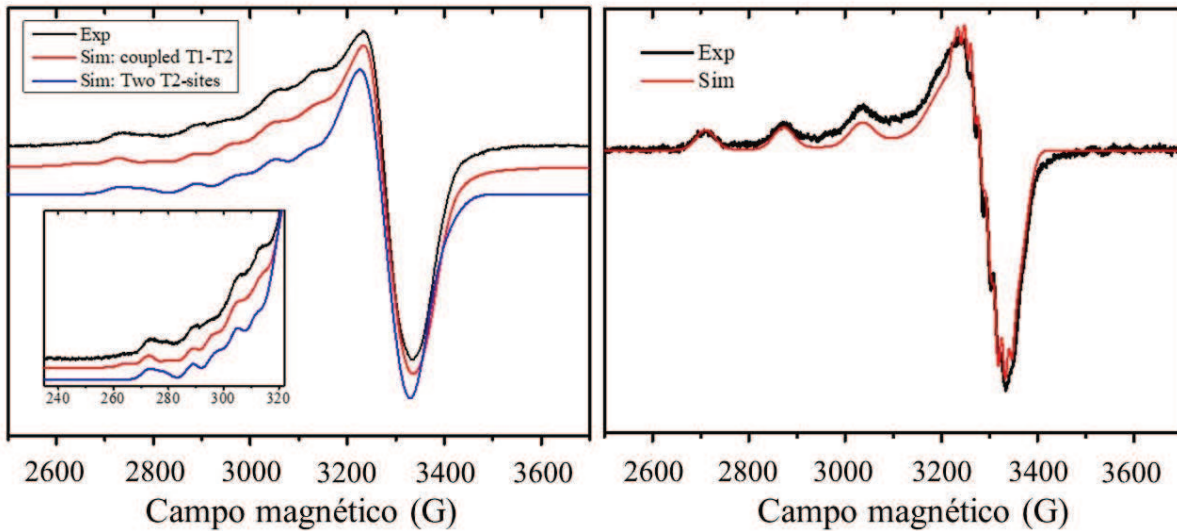


Figura 17. Panel izquierdo. Espectro azul. Simulación de H342G *as-purified* suponiendo dos centros T2 y T1 independientes superpuestos. Espectro rojo. Simulación de H342G *as-purified* asumiendo que T1 y T2 están acoplados por intercambio isotrópico. Panel derecho. Simulación de H342G *as-purified* reducido con ascorbato suponiendo un espín $S=1/2$ acoplado por interacción hiperfina con un núcleo de cobre ($I=3/2$) y dos núcleos de nitrógeno equivalentes ($I=1$).

En la Figura 16b se muestra la señal T2Cu EPR para H342G y *SmNirK* reducidas con ascorbato. Para H342G se observan resonancias individuales bien definidas con $g_{\parallel}=2.287$ y $A_{\parallel\text{Cu}}=185$ G, ligeramente diferentes a las del H342G *as-purified*. Como se dijo anteriormente, debería ser necesario un trabajo experimental adicional para concluir si estas diferencias se deben a las interacciones magnéticas T1-T2 que desaparecen con la reducción total de T1Cu (29). Notablemente, la región g_{\perp} del espectro T2Cu muestra una estructura hiperfina de 9 líneas atribuible a la interacción hiperfina del espín del electrón del cobre (II) ($S=1/2$) con dos N-núcleos equivalentes ($I=1$). Esta observación está en línea con el reemplazo del residuo H342, es decir, la pérdida de uno de los N coordinados al T2Cu, lo cual facilita la observación de la estructura hiperfina con los dos N restantes. En la Figura 17, panel derecho se muestra la simulación de H342G *as-purified* reducido con ascorbato suponiendo un espín $S=1/2$ acoplado por interacción hiperfina con un núcleo de cobre ($I=3/2$) y dos núcleos de nitrógeno equivalentes ($I=1$). Los parámetros de EPR para T2 fueron $g_{x/y/z}=2.039, 2.072, 2.287$; $A_{\text{Cu},x/y/z}=\text{n.d.}, \text{n.d.}, 18.5$ mT; $A_{\text{N},x/y/z}=1.5, 1.5, \text{n.d.}$ mT.

Por un lado se observa para H342G (Figura 16b, espectro negro) que frente a la adición de ascorbato en exceso, el centro T1Cu se reduce completamente, tal como sucede en *SmNirK* (Figura 16b, espectro rojo). Mientras que el centro T2Cu en H342G presenta una reducción parcial similar a la observada en *SmNirK*. Por otra parte, como se muestra más adelante (sección IV.1.5), de manera similar a lo observado en *SmNirK* los centros T1Cu y T2Cu de H342G se reducen completamente

frente a la adición de ditionito de sodio en exceso. El comportamiento que presenta H342G hacia los reductores indica que tanto T1Cu como T2Cu tienen un comportamiento redox similar al de *SmNirK*, es decir, $E^{0'}_{T1Cu} > E^{0'}_{T2Cu}$.

A partir de los resultados presentados es posible inferir por un lado que el sitio T1Cu no se ve significativamente afectado por la mutación. Mientras que respecto al sitio T2Cu, la señal de EPR en H342G muestra que dicho centro se encuentra indudablemente como Cu^{2+} y está coordinado con dos átomos de N equivalentes, estando esto último en línea con lo predicho por la mutación puntual realizada. Además, los parámetros de EPR para H342G sugieren un sitio de cobre T2 con mayor número de coordinación (77), lo cual está en línea con el hecho de que una coordinación 2N-O es altamente improbable para un ion Cu^{2+} . Este último punto se abordará más adelante en los resultados de cálculos computacionales.

IV.1.4 Reducción con ascorbato y oxidación con nitrito monitoreada por EPR

En base a lo desarrollado en un estudio previo, donde se determinó que *SmNirK* presenta un corrimiento en la señal de EPR del centro T2Cu luego de la adición de nitrito (11), se realizó un ensayo para determinar si H342G tiene capacidad de unir nitrito. Para esto se llevó a cabo una experiencia donde H342G en su forma *as-purified* se redujo con ascorbato y luego se hizo reaccionar con nitrito de sodio. En la Figura 18 se muestran los espectros de EPR adquiridos. En negro se presenta el espectro correspondiente a la forma *as-purified* de H342G, el espectro correspondiente a la enzima reducida con ascorbato se muestra en azul y en rojo se muestra el espectro adquirido luego de la reacción con nitrito. El agregado de ascorbato reduce por completo la señal del sitio T1Cu dejando el sitio T2Cu en un estado parcialmente oxidado (espectro azul). La adición de nitrito a H342G previamente reducida (espectro rojo) no evidencia diferencias significativas en la señal de T2Cu. Este resultado difiere significativamente del obtenido en un estudio previo para *SmNirK*, donde se observó un corrimiento en la señal de T2Cu, indicando una interacción del sustrato con el ion $Cu(II)$ del sitio activo (11). Al contrario de lo observado en *SmNirK*, el comportamiento inalterado en la señal de T2Cu para H342G luego de la reacción con nitrito, está indicando que el sustrato presenta dificultad para interactuar con el sitio activo en H342G. Este hecho que se encuentra en relación con lo observado anteriormente (sección IV.1.2), donde las relaciones k_{cat}/K_m para H342G y *SmNirK* sugieren que la afinidad por el sustrato se ve significativamente afectada por la mutación del residuo H342.

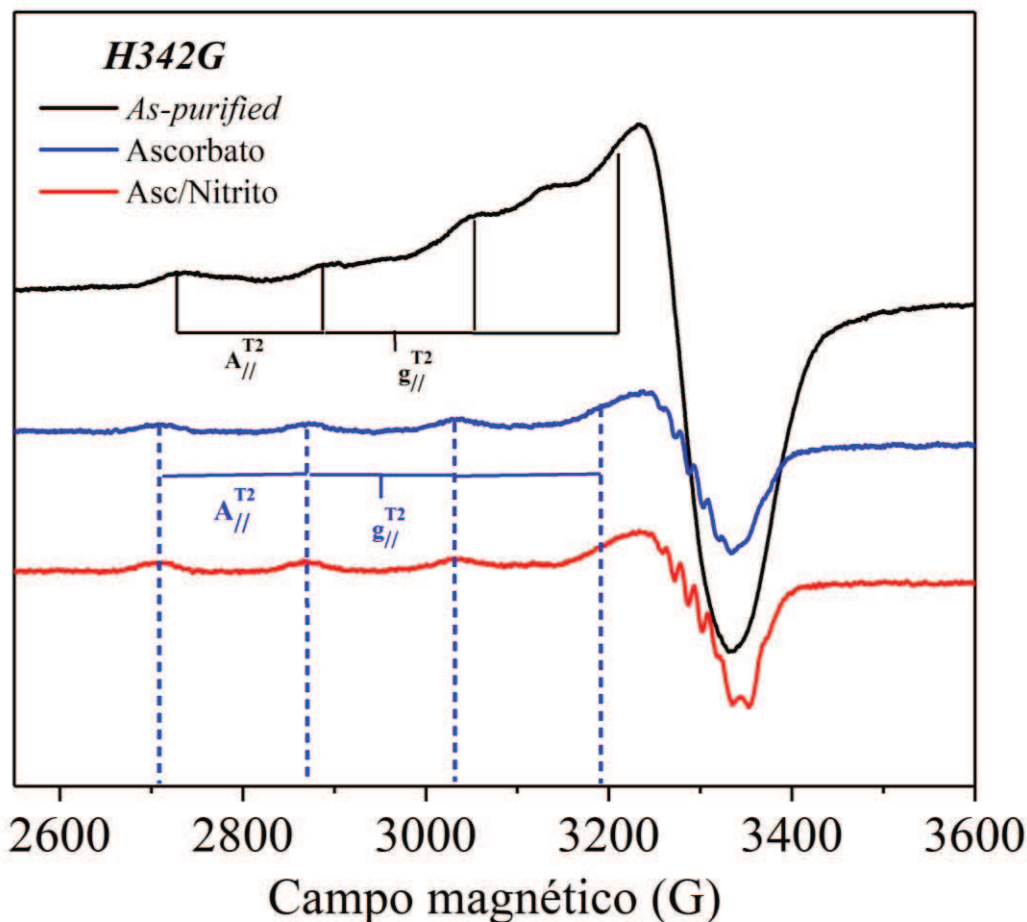


Figura 18. Espectros de EPR de H342G *as-purified* (negro), H342G *as-purified* + ascorbato (azul) y H342G reducida + nitrito (rojo). Condiciones experimentales: pH 6.0, relación proteína/nitrito 1:45, relación proteína/ascorbato 1:50, relación ascorbato/nitrito 1:1, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

A partir de los resultados hasta aquí expuestos se puede inferir que la dificultad del nitrito para interactuar con el T2Cu sería una plausible causa de la marcada disminución en la actividad catalítica de la variante respecto de la forma *wild type*. Más adelante, partir de los resultados del estudio computacional, se analiza la geometría que adoptaría este centro frente al reemplazo del residuo H342 y la relevancia que tiene esta modificación debido a la cavidad que genera en la estructura de la proteína la ausencia del grupo imidazol de la H342.

IV.1.5 Reducción con ditionito y reoxidación con sustrato, monitoreada por Uv-vis y EPR

Si bien los datos de EPR indicarían una interacción nitrito-T2 muy débil, los datos cinéticos con *SmPaz* confirman la presencia de catálisis y por ende TE $T1Cu \rightarrow T2Cu$. Con la finalidad de estudiar la TE $T1Cu \rightarrow T2Cu$ en H342G y verificar que la baja actividad de H342G no se deba a una ruta Cys172-His171 modificada por la mutación, se realizó un ensayo de reducción con ditionito de sodio y reoxidación con nitrito de sodio bajo condiciones de anaerobiosis, donde se monitorearon las características espectrales de T1Cu y T2Cu mediante espectroscopia de absorción UV-Vis y EPR.

En la Figura 19, panel izquierdo se muestra los espectros de absorción UV-vis. El espectro negro corresponde a la forma *as-purified* de H342G y en azul se muestra el espectro adquirido luego de la reacción con ditionito, donde se observa la desaparición de todas las bandas de absorción características del T1Cu. El espectro rojo se obtuvo luego de la adición de nitrito a la enzima previamente reducida, donde se observa la restauración parcial de todas las bandas observadas en la forma *as-purified*. Esto indica una oxidación parcial a Cu(II) del T1Cu de H342G.

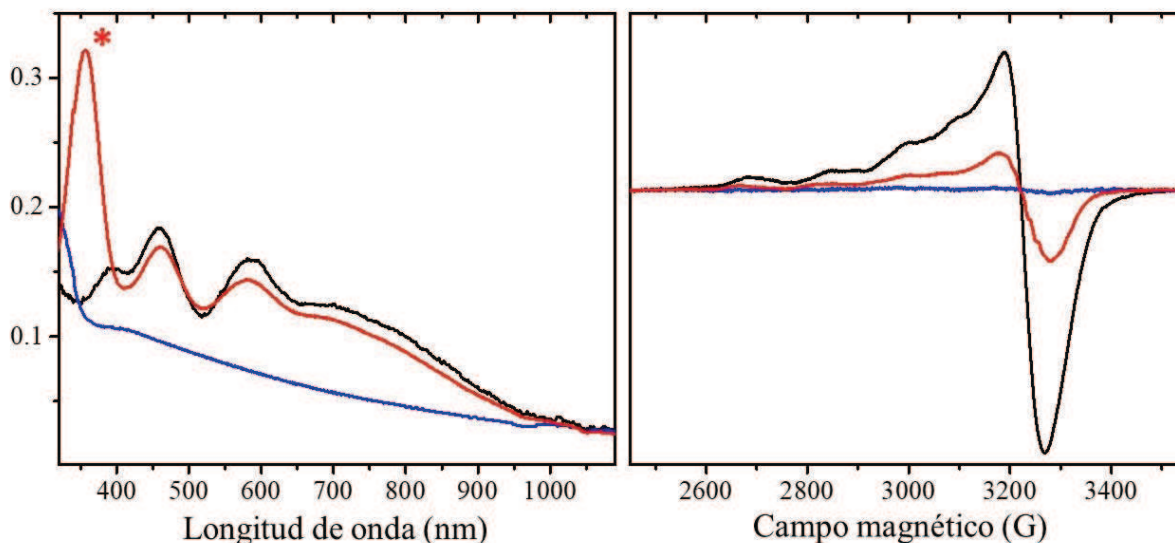


Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis (panel izquierdo) y EPR (panel derecho) de H342G. Espectros se obtuvieron en condiciones anaeróbicas, H342G *as-purified* (negro), H342G reducido con ditionito (azul), H342G reoxidado con nitrito (rojo). La banda de absorción marcada con asterisco corresponde al nitrito.

La Figura 19, panel derecho muestra los espectros de EPR obtenidos para el mismo ensayo. En negro se muestra el espectro correspondiente a la forma *as-purified* de H342G, donde se observan las señales correspondientes a los dos centros T1Cu y T2Cu. En azul se muestra el espectro adquirido luego de la reacción con ditionito, aquí se observa la desaparición de las señales correspondiente a

ambos centros, indicando una reducción completa de los sitios T1Cu y T2Cu. El espectro rojo se obtuvo luego de la adición de nitrito a H342G previamente reducida, aquí se observa la restauración de las señales correspondientes a los dos sitios T1 y T2 presentes en la forma *as-purified*, indicando una oxidación a Cu(II) del T1 y T2 de H342G.

El resultado obtenido mediante espectroscopía UV-Vis permite verificar la reoxidación del sitio de cobre T1, mientras que el resultado obtenido mediante espectroscopía de EPR permite verificar la reoxidación de los sitios T1Cu y T2Cu luego de la reacción con el sustrato. Esta experiencia realizada con ambas espectroscopias es útil para controlar la reoxidación de T1Cu y T2Cu tras la interacción de T2Cu con nitrito. Estos resultados indican que en H342G, al igual que en *SmNirK* (11), el ditionito reduce completamente los centros T1 y T2 y que la reacción con el nitrito, del centro T2Cu reducido, está acoplada a la reoxidación del T1Cu. Por lo tanto, esto indica que en H342G el sitio activo está operativo (aunque menos eficiente, como lo muestran los estudios cinéticos) y que la ruta de transferencia de electrones Cys172-His171 no se ve afectada.

IV.1.6 Ensayos de estabilidad térmica

Se estudió la estabilidad térmica de *SmNirK* y H342G a partir de un ensayo basado en fluorescencia, donde se determinó la temperatura de transición de despliegue de la proteína (T_m) en función del pH, para ambas enzimas.

Se observó que los valores de T_m para *SmNirK* y H342G disminuyen a medida que aumenta el pH, indicando que ambas enzimas no son estables en condiciones de pH alto (Figura 20). En el caso de H342G, no pudo determinarse el valor de T_m para un pH superior a 6.5. La sustitución del residuo H342 por una glicina produjo un cambio de T_m de 55(2) a 50(2)°C a pH 6.0 (Figura 20). Este resultado está en línea con lo observado por Stirpe y col. en los estudios DSC realizados en la variante H306A, la cual mostró una menor estabilidad térmica (31). A partir de este resultado se puede inferir que, si bien se observa una disminución en la T_m de H342G respecto de *SmNirK*, la estabilidad estructural de H342G no está drásticamente comprometida en la condición de pH que se corresponde con una actividad cinética óptima.

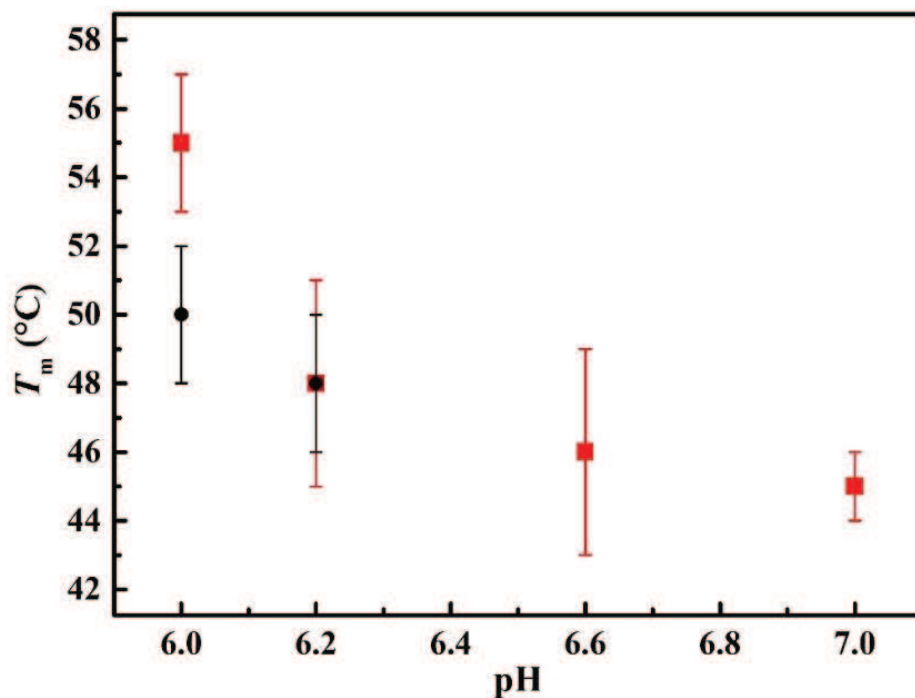


Figura 20. Temperatura de transición de desplegamiento de la proteína (T_m) para *SmNirK* (rojo) y H342G (negro), en función del pH.

IV.1.7 Modelado estructural QM/MM de H342G: implicancia para la catálisis

Para entender los resultados experimentales obtenidos en H342G se trabajó en un modelo estructural mediante estudios computacionales (también denominados estudios *in silico*), empleando la metodología QM/MM (*quantum mechanics/molecular mechanics*) usando como modelo de partida la estructura cristalográfica de *SmNirK* (PDB 2P7F) (30). En la Figura 21 se muestra como la sustitución de histidina por glicina (residuo no coordinante) en H342G da lugar a un hueco alrededor de T2Cu con un volumen similar al ocupado por la cadena lateral del residuo H342 (C β -imidazol). En H342G el ion de cobre T2 está indudablemente en el estado de oxidación Cu²⁺ y coordinado a dos N de residuos de histidina, como se evidenció en la estructura hiperfina resuelta en la zona de g_{\perp} en el espectro de EPR de esta variante (Figura 16b, espectro negro), resultado que se encuentra en línea con la mutación puntual efectuada. Como se verá a partir de los cálculos realizados, la dificultad de coordinación de nitrito al sitio T2Cu de H342G sugiere que el hueco induce cambios estructurales que conducen a obtener un sitio T2Cu con mayor número de coordinación.

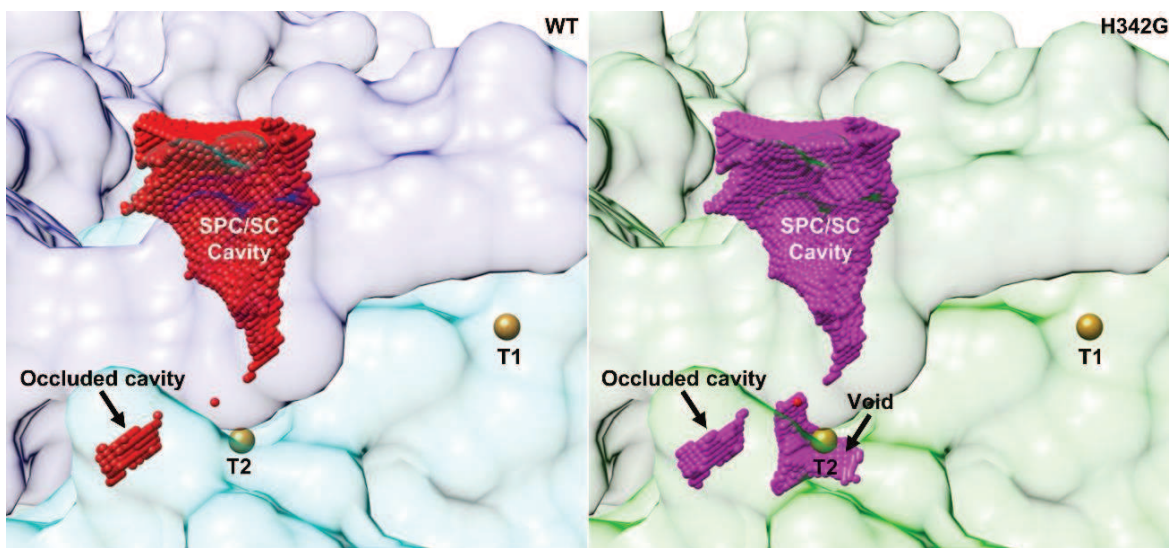


Figura 21. Panel izquierdo, estructura de *SmNirK*. Panel derecho, vacío generado alrededor de T2Cu al reemplazar H342 con glicina. Se muestran el canal de sustrato (SC) y el canal de protones secundario (SPC).

Con el objetivo de analizar cómo los cambios estructurales en H342G podrían afectar la actividad catalítica de la enzima, se comparó la estructura computacional de H342G con la de *SmNirK*. Es importante tener en cuenta que tanto la estructura computacional como la cristalina de rayos X de *SmNirK* son muy similares (30, 34), por lo que se utilizó la estructura de *SmNirK* computacional como referencia. Los cálculos se realizaron de dos formas, el primero consideró que en H342G se forma un hueco (0W-H342G), mientras que dos cálculos adicionales consideraron el hueco lleno con dos y cuatro moléculas de agua (2W-H342G y 4W-H342G, respectivamente), siendo cuatro el máximo permitido por las restricciones dimensionales.

En la Figura 22a se muestran las estructuras computacionales de 4W-H342G y *SmNirK* superpuestas. El modelado computacional de 0W-H342G mostró que la vía de TE Cys172-His171 es similar a la de *SmNirK*. T1Cu de 0W-H342G también muestra una geometría de coordinación similar a *SmNirK*, con 2N de His131 e His181 y 2S de los ligandos Cys172 y Met186, con la única diferencia de una distancia de enlace Cu-SCys $\sim 0,1$ Å más larga que en *SmNirK* ($d_{\text{Cu-S}} = 2.23$ Å para 0W-H342G y $d_{\text{Cu-S}} = 2.13$ Å para *SmNirK*). Estos resultados para el sitio T1Cu están en línea con la conclusión obtenida de los experimentos UV-vis y EPR en H342G (secciones IV.1.3.1 y IV.1.3.2). Para las estructuras 2W-H342G y 4W-H342G se obtuvo una conclusión similar del sitio T1Cu.

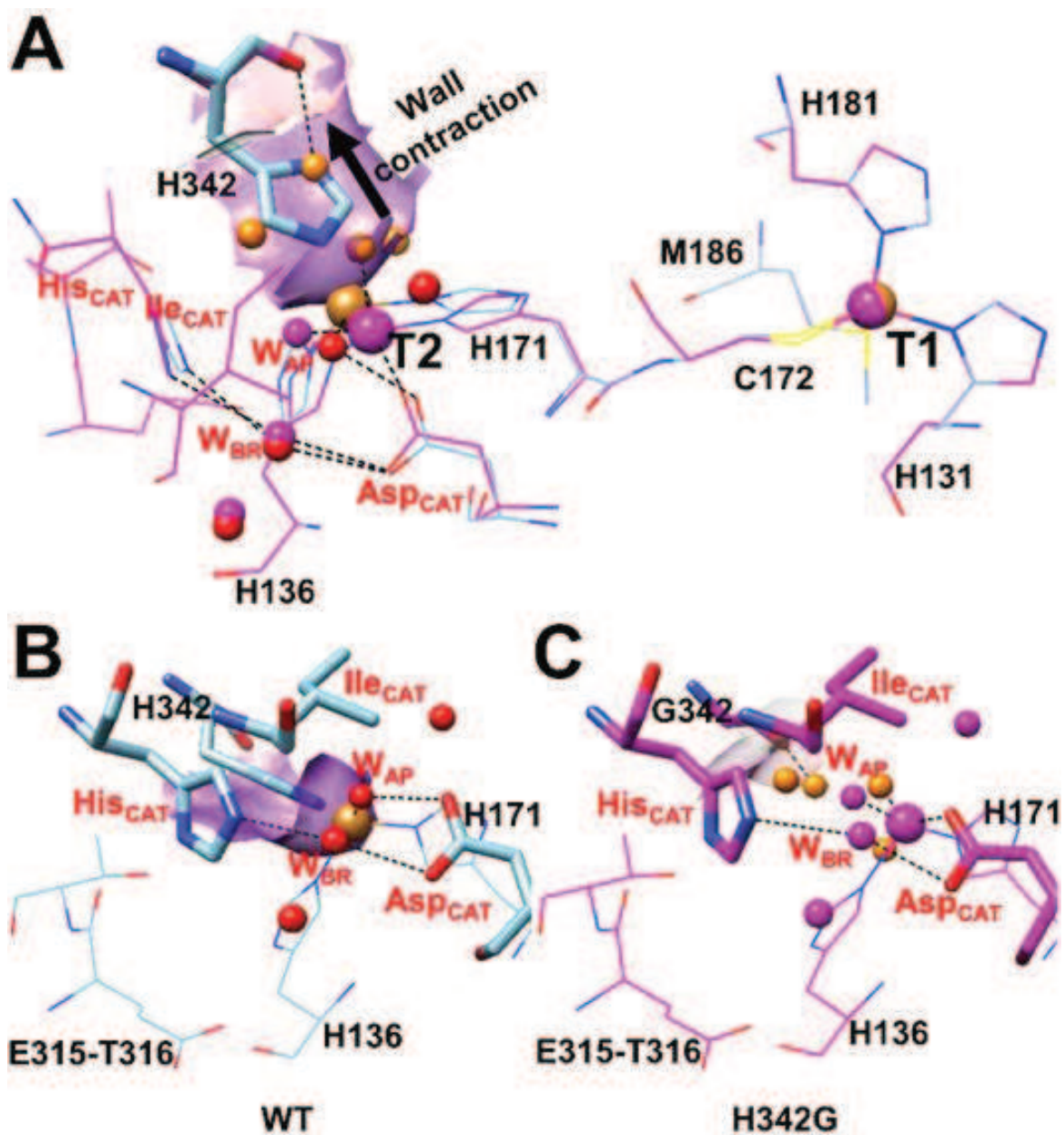


Figura 22. a) Superposición de estructuras computadas QM/MM de *SmNirK* (cian) y H342G (magenta) con vacío relleno con cuatro moléculas de agua (naranja). La comparación se realiza superponiendo los átomos C_{β} -His, C_{α} -His y C_{α} -Cys y el enlace de hidrógeno His- $N_{\delta 1}H \dots O=C$ -Cys del puente Cys172-His171. Se observa un desplazamiento significativo de T2Cu hacia ASP_{CAT} y W_{AP} , mientras que W_{BR} conserva su posición en H342G. b) Pared inferior del canal de sustrato en *SmNirK*. c) Pared inferior del canal de sustrato en H342G. Se observa un desplazamiento importante de la pared del fondo debido al vacío.

A diferencia de lo observado para T1Cu, los cambios estructurales en el sitio T2Cu inducidos por el vacío son importantes. La ausencia de la interacción de H342 con T2Cu provoca la reubicación del ion Cu^{2+} hacia el ASP_{CAT} ($\sim 0.5 \text{ \AA}$). El desplazamiento del cobre está acompañado por los residuos

His171 e His136, que forman parte de la pared inferior del canal de sustrato. Sorprendentemente, el oxígeno de la cadena lateral del Asp_{CAT} se acerca al T2Cu generando una nueva posición del T2Cu ($d_{\text{Cu-O}} = 2.00 \text{ \AA}$ frente a $d_{\text{Cu-O}} = 3.74 \text{ \AA}$ en *SmNirK*). Esto da lugar a un ligero acortamiento de la distancia T1-T2 con respecto a la de *SmNirK* ($d_{\text{Cu-Cu}}$ de 12.25 \AA y 12.68 \AA , respectivamente). La molécula de agua apical (W_{AP}) en T2Cu permanece unida al cobre, pero gira para formar enlaces de hidrógeno con los residuos Ile293 (Ile_{CAT}) e His291 (His_{CAT}). T2Cu termina con cuatro ligandos, His136, His171, una W_{AP} y el carboxilato de cadena lateral de Asp_{CAT}. En la segunda esfera de coordinación, His291 (His_{CAT}) y W_{BR} también se desplazan hacia la nueva posición de T2Cu (Figura 22a).

En T2Cu de 2W-H342G, como se observó para 0W-H342G, los dos ligandos His se mueven hacia Asp_{CAT} y el carboxilato de la cadena lateral del aspartato coordina el ión Cu^{2+} T2 ($d_{\text{Cu-O}_{\text{Asp}}} = 2.00 \text{ \AA}$). La presencia de moléculas de agua adicionales que llenan el hueco perturba la posición del W_{AP} que se mueve ligeramente en comparación con 0W-H342G, y se estabiliza con enlaces de puente hidrógeno con W_{BR} e Ile293. Una de las moléculas de agua añadidas (Ow) se une a T2Cu ($d_{\text{Cu-Ow}} = 2.12 \text{ \AA}$). La segunda Ow en el hueco está unida por puente hidrógeno tanto a la Ow coordinada a T2 como al grupo carbonilo de Gly342. Así, el ión Cu^{2+} T2 está pentacoordinado con los ligandos His171, His136, Asp134, W_{AP} y una de las moléculas de agua añadidas, como sugieren los resultados obtenidos por espectroscopía de EPR. Una conclusión similar se obtuvo para 4W-H342G (Figura 22a), un ion Cu^{2+} T2 pentacoordinado con distancias de enlace similares a las de 2W-H342G.

A partir de los resultados obtenidos en los cálculos computacionales se puede observar que los cambios estructurales inducidos por el hueco implican el desplazamiento de la pared inferior del SC hacia Asp_{CAT}, lo que produce un aumento significativo del canal del sustrato (Figura 22 a y c). La cadena lateral de Asp_{CAT} coordina al T2Cu. El sitio activo de H342G muestra números de coordinación cuatro o cinco dependiendo de la ausencia y presencia de moléculas de agua en el hueco, lo que explica el hecho de que el centro T2 permanezca como Cu^{2+} en esta variante de *SmNirK* (sección IV.1.3.1). La coordinación de T2Cu con un carboxilato de cadena lateral tiene un precedente experimental en una variante de NirK de *Alcaligenes xylosoxidans* en la que el Asp_{CAT} fue mutado a ácido glutámico (78). La variante estudiada por Ellis y col. evidenció que la mutación resultó en una forma inactiva de la enzima como resultado del enlace Cu-Glu ($d_{\text{Cu-GLU}} = 2.22 \text{ \AA}$) (78). Para H342G, el agrandamiento del SC, la coordinación de Asp_{CAT} a T2Cu y la posibilidad de tener el hueco con moléculas de agua parecen ser la causa de la baja eficiencia catalítica de H342G. Particularmente, esto último está en línea con los estudios de rayos X en una NirK de *Bradyrhizobium sp* ORS375 (*Br2DNir*), con baja eficiencia catalítica probablemente debido a una mayor hidratación del entorno del T2Cu (79, 80).

IV.2 Resultados E315A

IV.2.1 Propiedades moleculares

La caracterización molecular de E315A se realizó mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular. El resultado de SDS-PAGE mostró una banda correspondiente a una masa molecular de ~40 kDa (Figura 23), mientras que a través del análisis de los datos obtenidos por cromatografía de exclusión se obtuvo una masa molecular de ~120 kDa, indicando la presencia de un homotrímero. La cuantificación de cobre determinó que E315A contiene 2.7(3) átomos de Cu/subunidad, indicando que los sitios T1Cu y T2Cu se encuentran totalmente ocupados. No tenemos una explicación para este valor de contenido de cobre mayor que 2 Cu/subunidad, ya que las señales de EPR no indican la presencia de una tercera especie de Cu y la simulación indica una relación T1-T2 1:1, por lo que probablemente el valor se deba al error intrínseco que tienen todos los métodos de cuantificación de proteínas por métodos colorimétricos. Los resultados para la caracterización de esta variante se encuentran en línea con los reportados previamente para *SmNirK* (11), lo que permite inferir que la estructura cuaternaria de la enzima y el contenido de cobre en la variante no se encuentran afectados por la mutación realizada. En la Tabla 8 se muestran las características moleculares y los parámetros espectroscópicos para E315A comparados con los de *SmNirK*.

Tabla 8. Características estructurales y espectroscópicas (UV-vis y EPR) de *SmNirK* y E315A.

	<i>SmNirK</i>	E315A
Masa molecular de la subunidad (kDa)	~40	
Conformación estructural	trímero	
Átomos de Cu / subunidad	2.0	2.7
Espectro UV-vis	$\lambda(\text{nm})$ [ϵ ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]	
	393, 456 [3.3], 586 [2.9] 670-780	392, 456 [2.8], 586 [2.7] 670-780
Espectro EPR	g_{\parallel} , A_{\parallel} (G)	
T1Cu	2.190, 70	
T2Cu	2.315, 150	

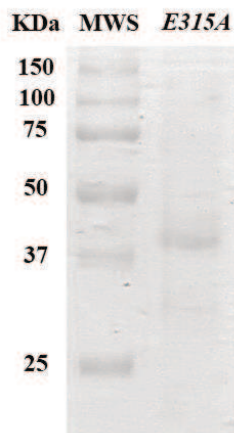


Figura 23. SDS-PAGE de E315A. Los marcadores de masa molecular se indican en kDa (BIO-RAD).

IV.2.2 Caracterización espectroscópica

IV.2.2.1 Espectroscopía de absorción UV-vis

En la Figura 24 se muestran los resultados de la caracterización espectroscópica por UV-vis de E315A. Se comparan los espectros de absorción de E315A y *SmNirK* (espectros violeta y negro respectivamente) a pH 6.0. Se observa, de manera similar a lo obtenido para la variante H342G, que el espectro de E315A se compone principalmente de dos bandas de absorción, ubicadas a 586 y 456 nm características de los espectros de las NirK verdes asociadas al centro T1Cu. La banda a 586 nm se atribuye a la transición de TC $(3p\pi)S(\text{Cys}) \rightarrow (d_x^2-y^2)Cu^{2+}$ mientras que la banda a 456 nm se atribuye a la transición de TC $(3p\sigma)S(\text{Cys}) \rightarrow (d_x^2-y^2)Cu^{2+}$. Además, puede apreciarse que el espectro de E315A presenta una banda de absorción más ancha centrada a los 670-780 nm, correspondiente a las transiciones d-d y una banda de absorción ubicada a los 393 nm asociada a la transición de TC que ocurre debido al enlace S(Met)-Cu. En la Tabla 8 se detallan las longitudes de onda (λ) y los coeficientes de extinción molar (ϵ) de las bandas de máxima absorción de *SmNirK* y E315A. Las posiciones de las bandas de absorción y la relación del coeficiente de extinción $\epsilon_{457}/\epsilon_{586} = 1.04$ de E315A son similares a las de *SmNirK* ($\epsilon_{457}/\epsilon_{587} = 1.13$), con lo que se puede inferir que el reemplazo del residuo de glutámico E315 por alanina no modifica significativamente la estructura del sitio T1Cu. Esto último tiene correspondencia con el hecho de que la modificación de un residuo que pertenece a la segunda esfera de coordinación del centro T2Cu no produce alteraciones significativas en el T1Cu.

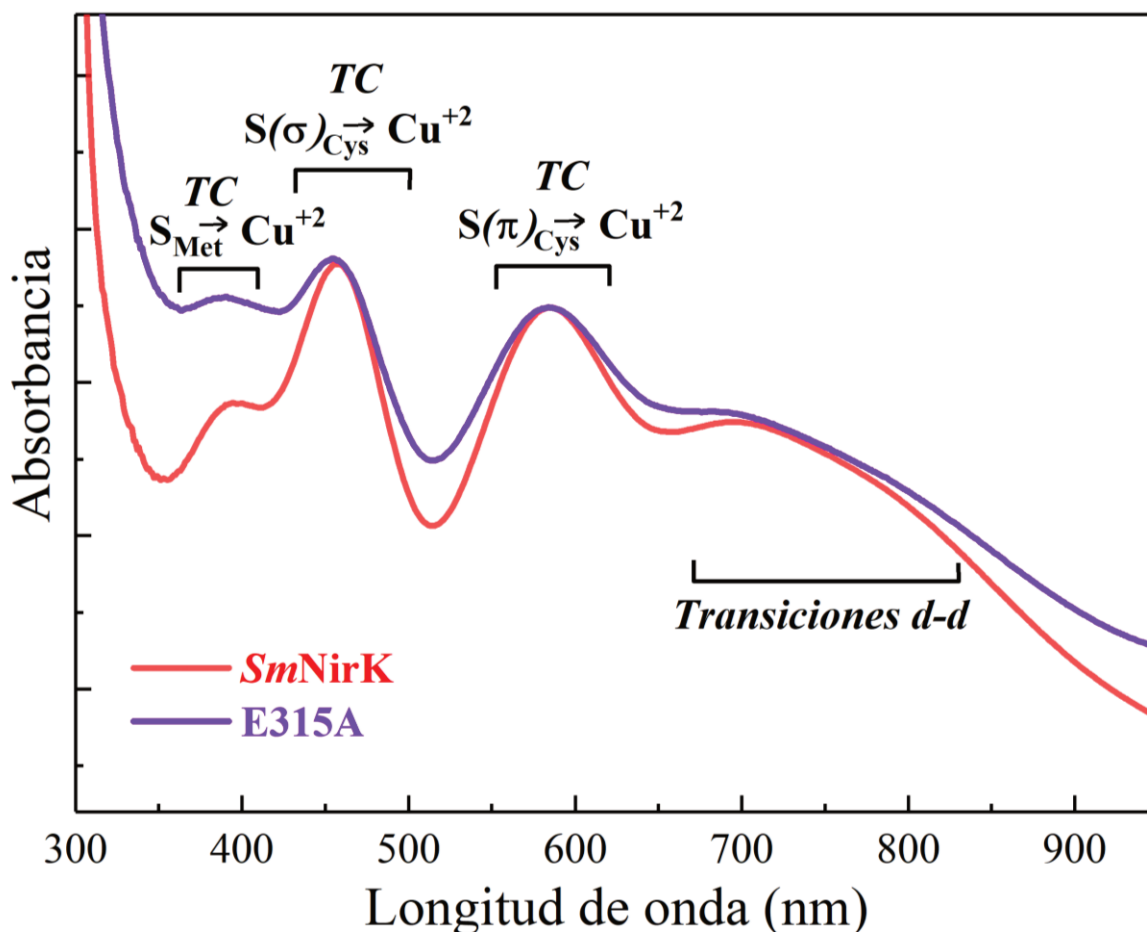


Figura 24. Espectros de absorción UV-vis de E315A (violeta) y *SmNirK* (rojo) a pH 6.0 en los que se encuentran indicadas las transiciones asignadas a cada banda de absorción (TC: transferencia de carga).

IV.2.2.2 Espectroscopía de EPR

En la Figura 25 se presentan los espectros en banda X de CW-EPR obtenidos a pH 6.0 para *SmNirK* y E315A, en sus formas *as-purified* (rojo y violeta respectivamente) junto con la simulación de *SmNirK as-purified* (espectro negro) asumiendo dos centros T2Cu y T1Cu independientes superpuestos. Para los espectros experimentales de *SmNirK* y E315A se observan dos componentes espectrales superpuestas correspondientes a T1Cu y T2Cu. Observamos que el espectro de EPR adquirido para E315A presentó señales para los sitios de cobre T1 y T2 de características y parámetros similares a los observados en la señal de *SmNirK*. La simulación espectral del sitio T1Cu para *SmNirK* arrojó $g_{\parallel} = 2.190$, $A_{\parallel} = 70$ G, mientras que para el T2Cu la simulación arrojó $g_{\parallel} = 2.315$ y $A_{\parallel} = 150$ G (Tabla 8).

A partir de esto se puede ver que el resultado obtenido para el T1Cu de E315A se encuentra en línea con lo descrito en el análisis por espectroscopía UV-vis, donde no se evidenciaron alteraciones estructurales significativas del T1Cu para esta variante respecto de *SmNirK*. Una conclusión similar se obtuvo para el T2Cu. En resumen, los resultados obtenidos tienen correspondencia con la mutación realizada, es decir, el reemplazo de un residuo (Glu315) que pertenece a la segunda esfera de coordinación del T2Cu no afecta la geometría de coordinación de los sitios de cobre T1 y T2.

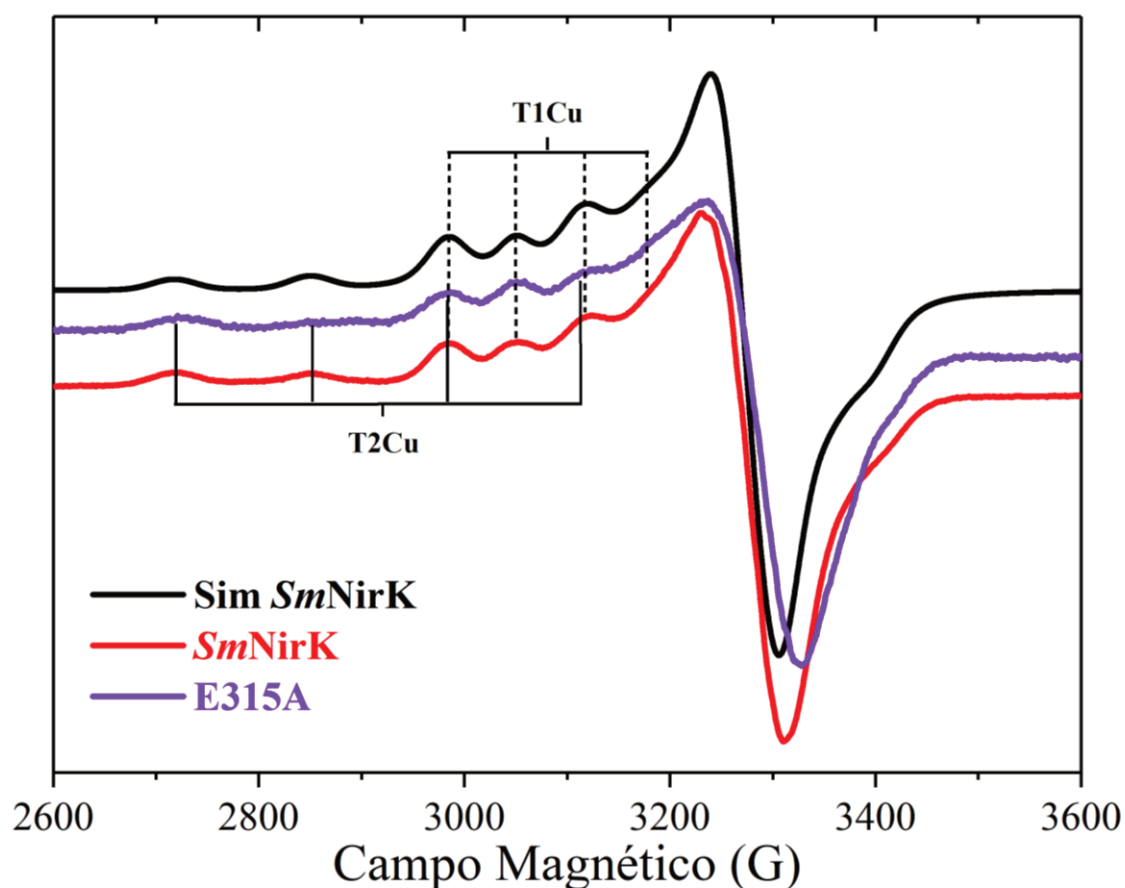


Figura 25. Espectros de EPR de *SmNirK* (rojo) y E315A (violeta). Condiciones experimentales: pH 6.0, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K. En negro se muestra el espectro correspondiente a la simulación de *SmNirK* pH 6.0.

IV.2.3 Catálisis enzimática y transferencia electrónica

Mediante ensayo cinético continuo empleando *SmPaz* como dador fisiológico de electrones, se caracterizó la cinética de la variante E315A. En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos

junto con los valores de los parámetros cinéticos. Para E315A se obtuvo un valor de $k_{\text{Cat}} = 20(2) \text{ s}^{-1}$ que se encuentra en línea con el observado para *SmNirK* ($k_{\text{Cat SmNirK}} = 26(4) \text{ s}^{-1}$), mientras que el valor de $K_m = 60(20) \mu\text{M}$ para E315A es tres veces mayor al obtenido para la enzima en su forma *wild type* ($K_{m \text{ SmNirK}} = 19(4) \mu\text{M}$) bajo las mismas condiciones de ensayo. Si bien la comparación de los valores de k_{Cat} de E315A y *SmNirK* evidencian que la mutación no afecta la actividad específica de la enzima, las relaciones k_{Cat}/K_m de 1.4 y 0.3 para *SmNirK* y E315A respectivamente, sugieren que la afinidad por el sustrato se ve afectada. Más adelante se mostrará como el potencial del T2Cu se ve modificado por el reemplazo del residuo 315, dando lugar a una diferencia de potenciales que favorece la TE T1 \rightarrow T2. El incremento en el valor del K_m para E315A está en línea con una TE que promueve reducción del sitio T2Cu, ya que el cobre del T2Cu en un estado de oxidación Cu^{+1} dificulta la unión de una molécula con carga negativa como el nitrito.

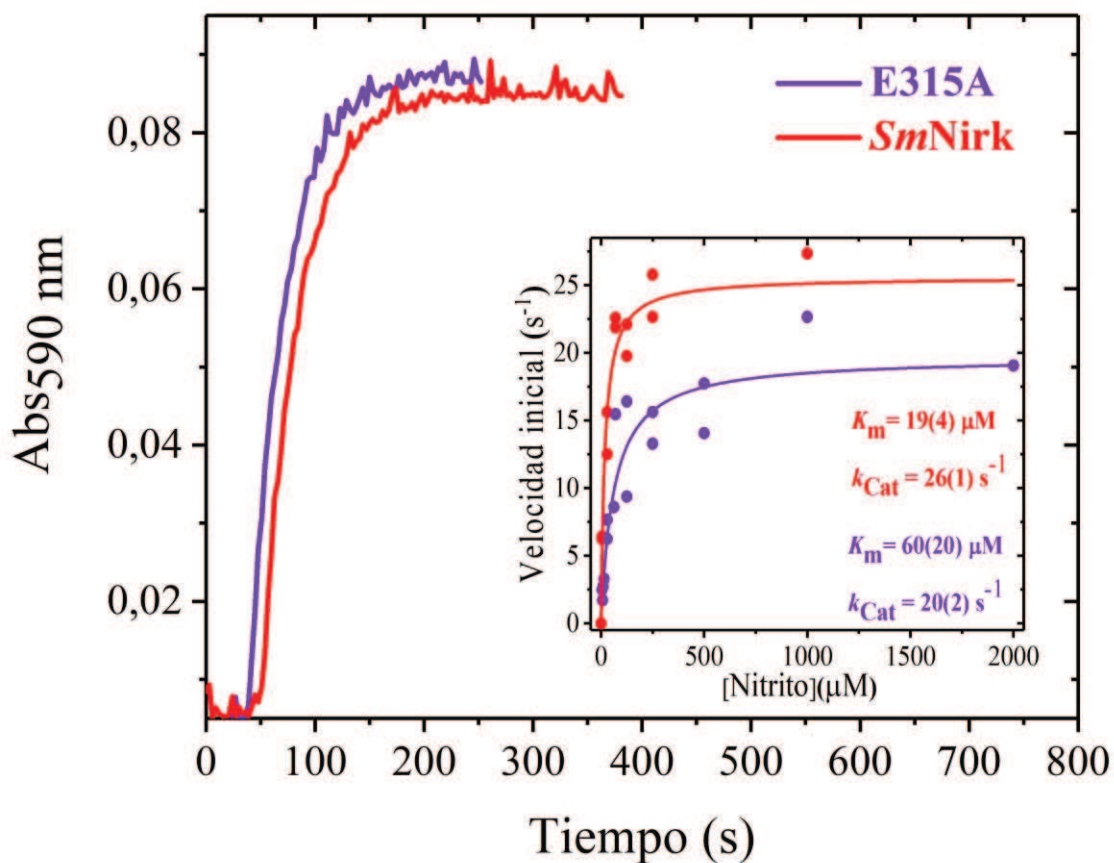


Figura 26. Evolución temporal de la oxidación de *SmPaz* (reducción de nitrito) catalizada por *SmNirK* (rojo) y la variante E315A (violeta) para una concentración de nitrito de 1000 μM . Recuadro: Gráficos de Michaelis-Menten en función de la concentración de nitrito.

Por otra parte, con la finalidad de analizar el camino de transferencia electrónica T1 → T2 de la variante E315A, se realizó un ensayo de reducción con ditionito de sodio y reoxidación con nitrito de sodio bajo condiciones de anaerobiosis. Esta experiencia se monitoreó por EPR y en la Figura 27 se muestran los espectros obtenidos. El espectro violeta corresponde a la forma *as-purified* de E315A. En gris se muestra el espectro adquirido luego de la reacción con ditionito, en el que se observa una reducción completa de los centros T1Cu y T2Cu de la proteína. Seguidamente a la reducción se realizó la adición de nitrito (espectro negro), donde se observa la restauración completa de toda la señal observada en la forma *as-purified*. A partir de esta evidencia experimental se puede concluir que el camino de transferencia electrónica T1 → T2 se encuentra intacto. Este resultado se encuentra en línea con lo descrito para *SmNirK* donde, luego de reaccionar con nitrito la enzima previamente reducida se produjo la reoxidación de ambos centros de Cu (11). También se nota que la reoxidación con nitrito produce una señal del T1 más intensa que la del T2, lo que sugiere que la mutación aumentó el potencial del centro T2Cu respecto del centro T1Cu ($E^{0'}_{T2 E315A} > E^{0'}_{T1 E315A}$).

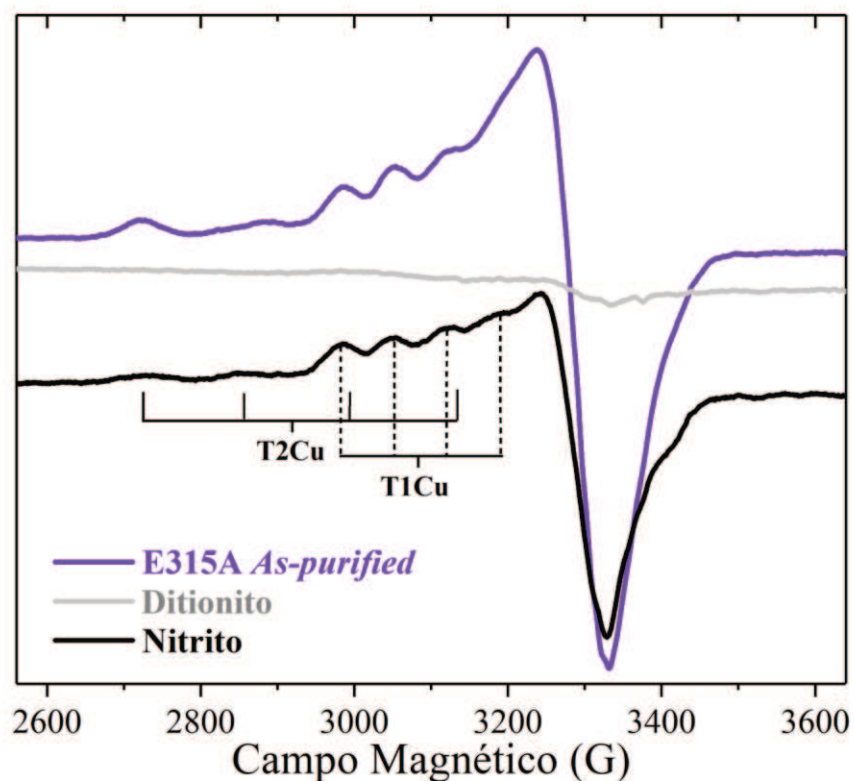


Figura 27. Espectros de EPR de E315A *as-purified* (violeta), E315A + ditionito de sodio (gris), reacción de E315A con nitrito luego de la reducción con ditionito (negro). Condiciones experimentales: pH 6.0, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

IV.2.4 Reducción con ascorbato monitoreada por EPR y UV-Vis

Para estudiar el potencial de reducción del centro T2Cu en E315A se realizó un ensayo de reducción con ascorbato monitoreado por EPR. En paralelo a esto, se planificaron titulaciones potenciométricas monitoreadas por EPR usando como agente reductor ditionito de sodio y distintos mediadores electroquímicos. El problema con que nos encontramos fue que, la combinación de estos compuestos, la proteína en estudio y la agitación constante suave que se requiere para estabilizar el potencial de la solución, produjo la precipitación de la proteína. Por este motivo solo pudimos hacer los estudios que se describen en esta sección. En primer lugar, se realizó una experiencia con la enzima en su forma *wild type*. Se reaccionó a *SmNirK* bajo condiciones de anaerobiosis y de manera sucesiva con ascorbato en una relación de concentraciones 1: 15 y 1:30. En la Figura 28 se muestran los espectros adquiridos en esta experiencia, en rojo se muestra el espectro de la enzima en su forma *as-purified* y en gris y negro se muestran los espectros adquiridos luego de dos adiciones del agente reductor (1:15 y 1:30, respectivamente). En esta experiencia se puede observar que para *SmNirK* con el agregado de ascorbato se obtiene una señal de EPR donde el T1Cu está completamente reducido, mientras que el T2Cu permanece parcialmente en forma oxidada (espectros gris y negro). Este resultado está en línea con lo reportado previamente por Ferroni y colaboradores, donde se determinaron los potenciales de reducción para T1Cu y T2Cu de *SmNirK* (224 mV y 108 mV, respectivamente) (38).

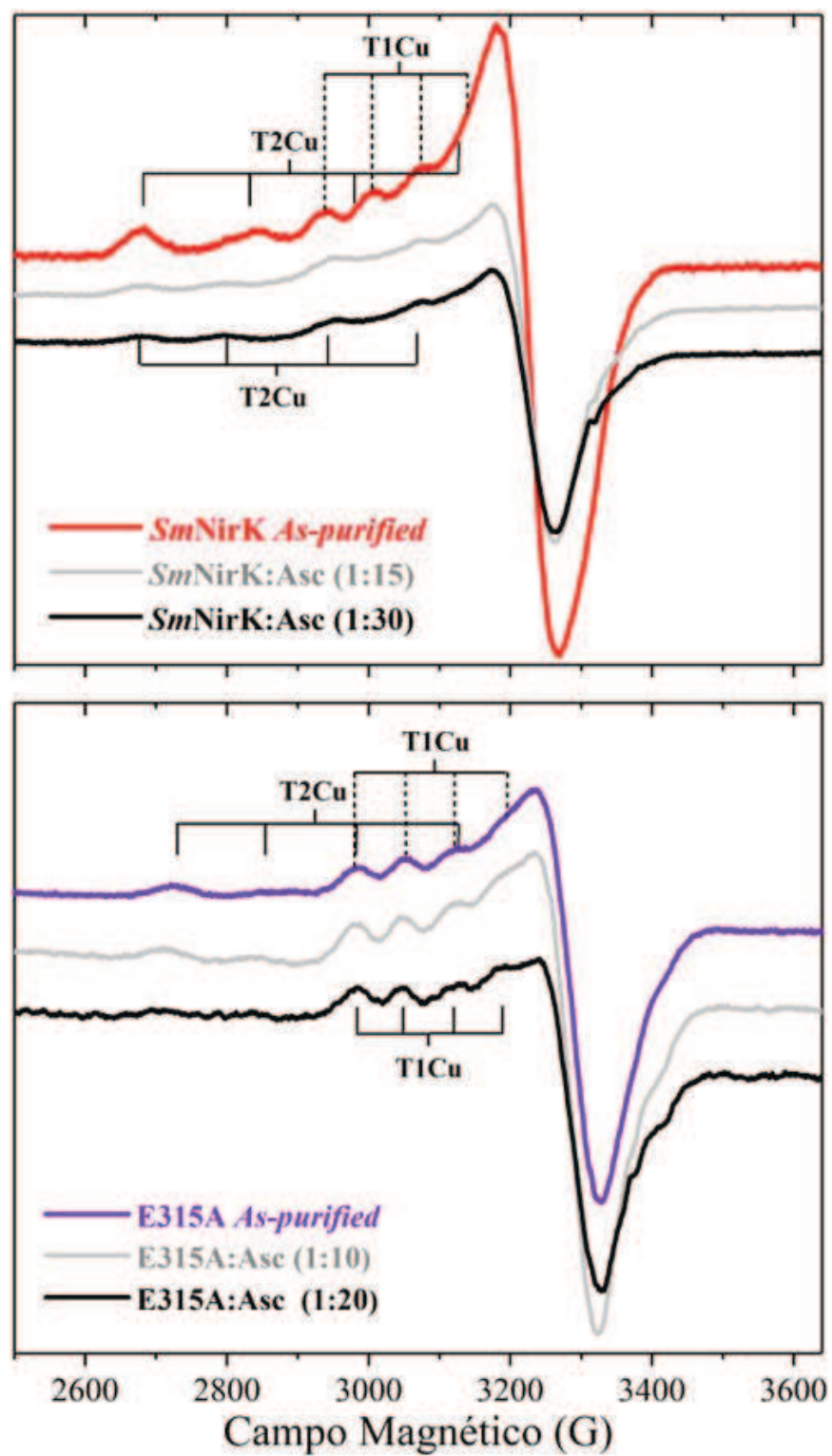


Figura 28. Espectros de EPR de SmNirK *as-purified* (rojo) y E315A *as-purified* (violeta). Espectros de EPR de la enzima luego de los sucesivos agregados de ascorbato de sodio (gris y negro respectivamente). Condiciones experimentales: pH 6.0, frecuencia microonda: 9.45 GHz, campo de modulación: 100 KHz, amplitud de modulación: 2 Gpp, potencia microonda: 2 mW y temperatura 120 K.

En la Figura 28 se muestran también los espectros adquiridos luego de la reducción de E315A con ascorbato en una relación de concentración 1:10 y 1:20, en violeta se muestra el espectro de la enzima en su forma *as-purified* y en gris y negro se muestran los espectros adquiridos luego de las sucesivas adiciones del agente reductor (1:10 y 1:20, respectivamente). Es importante destacar que la experiencia se realizó hasta una relación de concentración de 1:20 dado que la proteína precipitaba frente a concentraciones mayores de agente reductor. Para E315A se puede observar que con el agregado sucesivo de ascorbato se obtiene una señal de EPR donde se evidencia una reducción parcial de los centros T1Cu y T2Cu, con una reducción mayor para el T2. Este resultado muestra que se produjo una modificación en el potencial de reducción de los dos centros de cobre en los que se verifica que $E^{0'}_{T1\ E315A} < E^{0'}_{T2\ E315A}$. Este resultado está en claro contraste con lo observado en la *SmNirK wild type*, que presenta $E^{0'}_{T1\ SmNirK} > E^{0'}_{T2\ SmNirK}$. Se puede concluir entonces que el valor del potencial del centro T2Cu de E315A, si bien presenta un valor próximo al del T1Cu, tiene un valor que favorece la TE intraproteína. Se observa en la experiencia, que la reducción del centro T2Cu va acompañada de la reducción parcial del centro T1Cu, este resultado indica que el potencial de reducción del centro T2Cu de E315A presenta un valor mayor o similar al potencial del centro T1Cu. Confirmándose así que el reemplazo del residuo Glu315 por alanina produce una modificación en el potencial del sitio activo de la enzima que da lugar a una diferencia de potenciales T1-T2 que favorece la TE T1→T2.

Por otra parte, con la finalidad de analizar el potencial del centro T1Cu de E315A, se realizó un ensayo de reducción con ascorbato monitoreado por espectroscopía de UV-Vis para *SmNirK* y E315A. Se reaccionó la proteína bajo condiciones de anaerobiosis y de manera sucesiva con agente reductor en una relación de concentración 1:15 y 1:30. La experiencia se realizó hasta una relación de concentración de 1:30 dado que la proteína precipitaba frente a concentraciones mayores del agente reductor. En la Figura 29 se muestran los espectros adquiridos en esta experiencia. En violeta se muestra el espectro de E315A, en su forma *as-purified* y en gris y negro se muestran los espectros adquiridos luego de dos adiciones de ascorbato (1:15 y 1:30 respectivamente). De manera contraria a lo reportado previamente para *SmNirK* (11), vemos que E315A no presenta reducción completa del centro T1Cu frente al agregado de ascorbato. La diferencia entre E315A y *SmNirK* en el comportamiento frente al agente reductor podría considerarse como una evidencia preliminar, que indicaría que el potencial de reducción del T1Cu de E315A presenta una modificación respecto de *SmNirK*: el valor $E^{0'}_{T1}$ disminuyó respecto de su valor en *SmNirK* ($E^{0'}_{T1\ E315A} < E^{0'}_{T1\ SmNirK}$). Por tanto, se puede concluir que el $E^{0'}_{T1\ E315A}$ es menor que $E^{0'}_{T2\ E315A}$, en claro contraste con lo observado en la enzima en su forma *wild type* en la que $E^{0'}_{T1\ SmNirK} > E^{0'}_{T2\ SmNirK}$. Se sigue trabajando para resolver el

problema experimental de la titulación potenciométrica y de esta manera obtener resultados más completos.

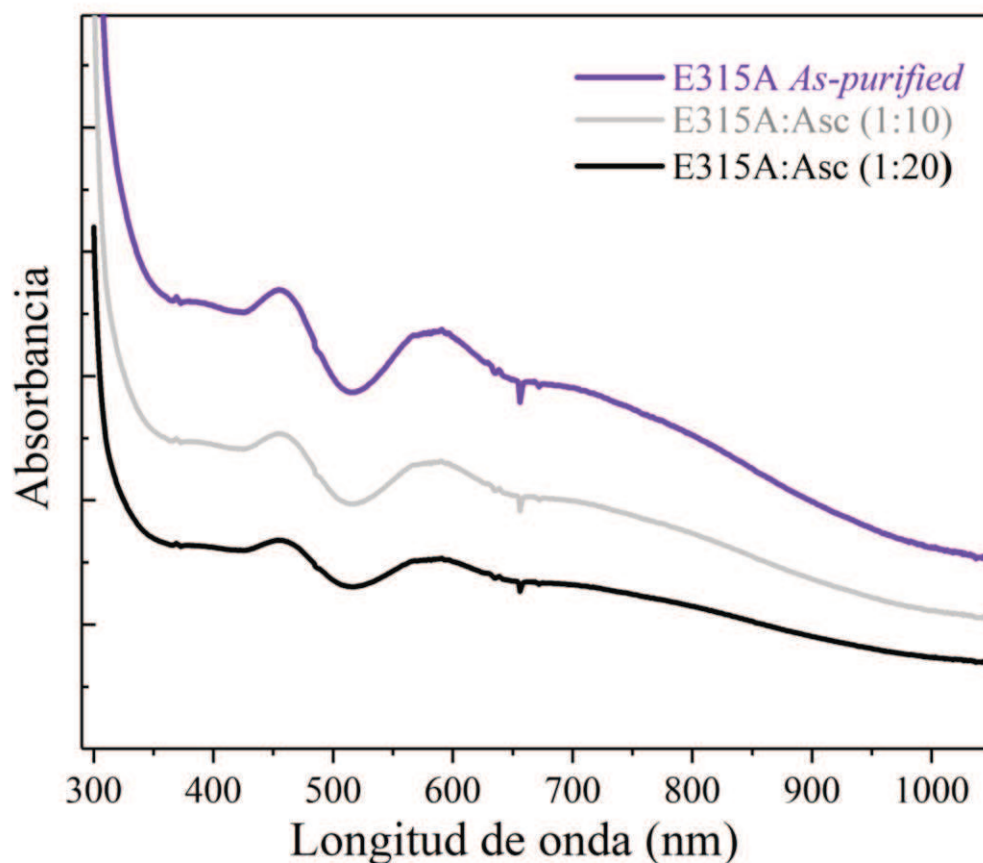


Figura 29. Espectros de absorción UV-vis de E315A *as-purified* (violeta), E315A + ascorbato en una relación de concentración 1:15 y 1:30 (gris y negro respectivamente), a pH6.0.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, el reemplazo de un residuo con un grupo carboxilato en la estructura de triada Glu315-His136-T2Cu tiene un efecto directo sobre potencial del centro metálico atribuible a dicho carboxilato. Como se esperaba, los resultados obtenidos para E315A muestran que la mutación produce una modificación en el potencial de reducción del centro T2Cu. Si bien la modificación en el potencial favorece la TE $T1 \rightarrow T2$, se probó que este cambio no es significativo para la cinética de la enzima, ya que el valor de k_{cat} para E315A es similar al obtenido para *SmNirK*. Aunque el reemplazo del Glu315 por una alanina da lugar una diferencia de potenciales que favorece la TE, vemos en el incremento del valor de K_m que la mutación afectaría la accesibilidad del sustrato al sitio activo. Esto último se corresponde con el hecho de que T2Cu en un estado reducido, dificulta la unión de una molécula con carga negativa como el nitrito. Lo que sí es

sorprendente en estos resultados es como la modificación de un residuo que pertenece a la segunda esfera de coordinación del T2Cu influencia el gradiente de potencial, el cual indudablemente es en la variante más favorable a la TE $T1 \rightarrow T2$. Este punto será analizado mediante cálculos QM/MM presentados a continuación.

IV.2.5 Modelado estructural QM/MM de E315A

Con el reemplazo del residuo de ácido glutámico (Glu315) de la segunda esfera de coordinación del T2Cu (Figura 30) por una alanina se genera la pérdida del grupo $-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ donde CO_2^- es el grupo carboxilato de la cadena lateral del Glu315. Este cambio implica la pérdida de la carga negativa asociada al carboxilato y la pérdida del enlace puente hidrógeno entre el $\text{N}_{\delta 1}$ del imidazol His136 y uno de los O del carboxilato de Glu315. Mientras que el enlace puente hidrógeno entre el $\text{N}_{\delta 1}$ del imidazol His_{CAT} y el O del carbonilo de Glu315 se mantiene. Para predecir los cambios estructurales inducidos por esta pérdida, se realizaron cálculos computacionales con la metodología QM/MM. De forma similar a como se realizó para la variante H342G (sección IV.1.7), se compararon los resultados obtenidos para E315A con la estructura computacional de *SmNirK*.

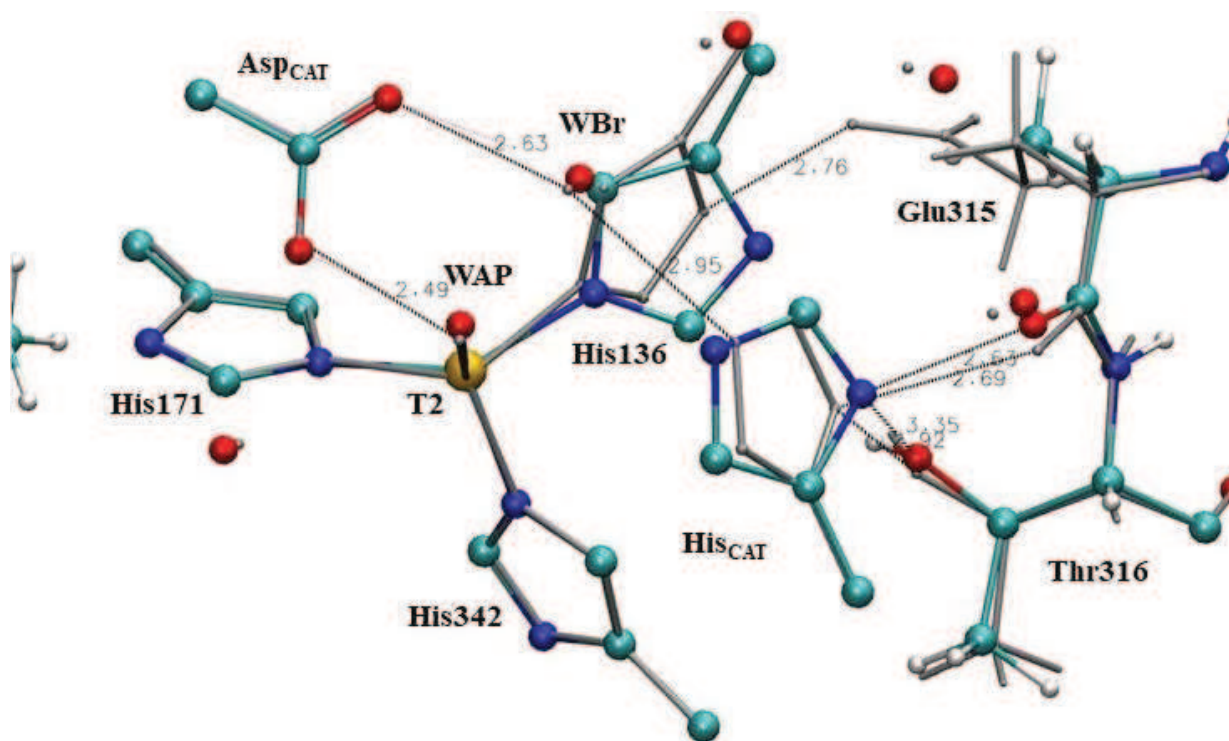


Figura 30. Superposición de estructuras computadas QM/MM de *SmNirK* (gris) y E315A (en colores azul, celeste y rojo para los átomos de N, C y O respectivamente).

Los cálculos QM/MM muestran que la vía de TE Cys-His para E315A es estructuralmente similar a la de *SmNirK*. Y para el caso del centro T1Cu también se encontró una geometría de coordinación similar a *SmNirK*, con 2N de His131 e His181 y 2S de los ligandos Cys172 y Met186. Estos resultados para T1Cu están en línea con la conclusión obtenida en la caracterización espectroscópica por UV-vis y EPR (secciones IV.2.2.1 y IV.2.2.2), donde no se observaron diferencias significativas respecto de *SmNirK*.

En la Figura 31 se muestran parte de las estructuras obtenidas computacionalmente del centro T2Cu para E315A y *SmNirK* superpuestas. En esta figura se puede observar, que si bien la variante realizada no presenta cambios estructurales significativos para dos de los residuos coordinantes del sitio T2 (His171 y H342), los cambios estructurales en el centro T2 inducido por la pérdida del enlace puente hidrógeno Glu315--His136 provocan la rotación del anillo imidazol de His136. En *SmNirK* las interacciones que estabilizan la His136 son el enlace de coordinación con T2Cu, la interacción por enlaces π - π que tiene con la His_{CAT} y el enlace puente hidrógeno Glu315--His136. En E315A el reemplazo de Glu315 por una alanina tiene como consecuencia la pérdida del enlace Glu315--His136, lo que produce una desestabilización en His136 y conduce a la rotación y deslocalización de ~ 1 Å de su anillo imidazol en un ángulo de $\sim 36^\circ$. His_{CAT} rota 25° con eje de rotación C _{β} -C _{γ} .

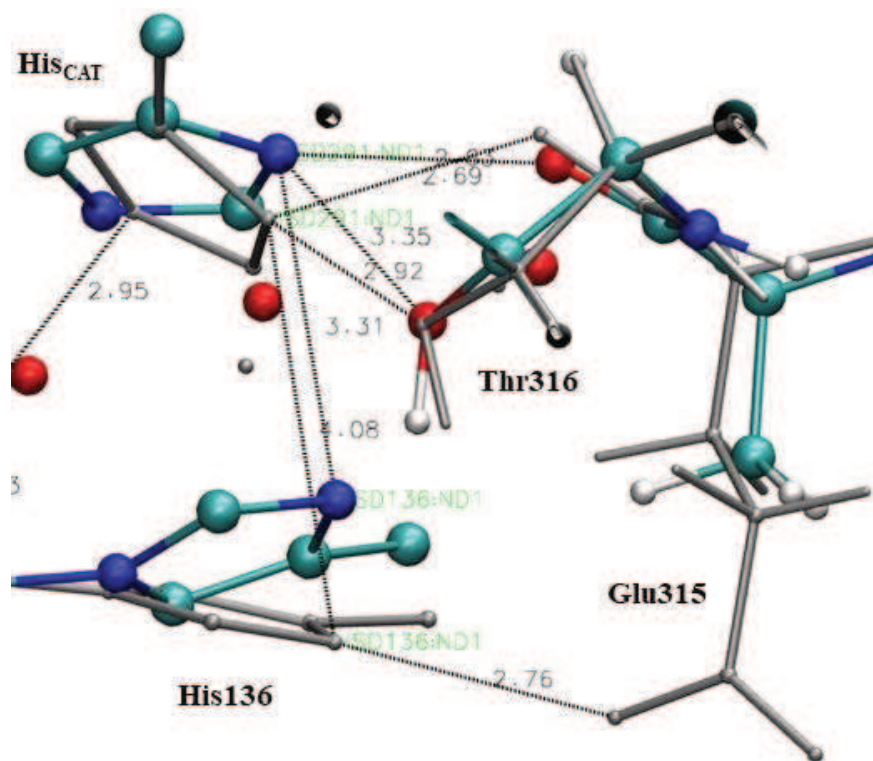


Figura 31. Superposición de estructuras computadas QM/MM de *SmNirK* (gris) y E315A (en colores azul, celeste y rojo para los átomos de N, C y O respectivamente).

El movimiento de H136 induce una rotación del anillo imidazol de His_{CAT}, lo cual es de esperar dado que ambos residuos interactúan por interacciones del tipo π - π . En la Figura 31 se muestran las variaciones que experimentan His_{CAT} y His136, por ejemplo, en cambios en la distancia entre los anillos imidazol, como consecuencia de este efecto inducido ($d_{\text{His136-HisCAT}} = 3.31 \text{ \AA}$ frente a $d_{\text{His136-HisCAT}} = 4.08 \text{ \AA}$ en *SmNirK*). Es evidente que la desestabilización experimentada por His136 debido a la pérdida del enlace puente hidrógeno con Glu315 es compensada por la mayor interacción π - π entre los anillos imidazólicos de His136 y His_{CAT}.

Otros cambios estructurales debido a la rotación del imidazol de His_{CAT} son a nivel de los puentes H que este residuo tiene con el hidroxilo de la cadena lateral de treonina 316 ($d_{\text{N}\delta\text{1-OH}} = 3.35 \text{ \AA}$ frente a $d_{\text{N}\delta\text{1-OH}} = 2.92 \text{ \AA}$ en *SmNirK*) y el carbonilo de la alanina ($d_{\text{N}\delta\text{1-CO}} = 2.63 \text{ \AA}$ frente a $d_{\text{N}\delta\text{1-CO}} = 2.69 \text{ \AA}$ en *SmNirK*) (Figura 31). El aumento que se obtuvo para la distancia de enlace entre el N _{δ 1} del imidazol y el OH de Thr316 indicarían que se desfavorece esta interacción en E315A.

Por otra parte, se observó que la posición del Asp_{CAT} no presentó modificación respecto de *SmNirK*. Las interacciones por enlace puente H entre Asp_{CAT}, W_{Br} e His_{CAT} no se ven significativamente afectada por la rotación de His_{CAT} (Figura 30) así también como su localización que es fundamental para la actividad catalítica. La molécula del agua apical (W_{AP}) en T2Cu permanece unida al cobre y la distancia del enlace puente hidrógeno que forma con el Asp_{CAT} es igual a la observada en *SmNirK* (Figura 30). Esto implicaría que la pérdida del enlace H entre His136 y el Glu315 no sería relevante para la función del *sensing loop*, lo cual está en línea con los estudios catalíticos presentados en sección IV.2.3.

IV.2.6 Modificación de los potenciales de reducción T1 y T2 por la mutación: una hipótesis preliminar

Con la finalidad de tener un mayor entendimiento de los efectos a nivel molecular que originan los cambios observados experimentalmente en el gradiente de potencial T1-T2 de E315A respecto de *SmNirK* se realizó un análisis computacional. La razón de ello fue consecuencia directa de que no existe a priori ninguna razón estructural a nivel de los centros metálicos que implique estos cambios importantes en el gradiente de potencial eléctrico. Como se discutió arriba, los entornos de coordinación a nivel de la primera esfera no cambian significativamente, lo cual fue demostrado por UV-vis y EPR y cálculos computacionales. Debido a esto, y dado que la mutación realizada implicaba la pérdida de la carga negativa a nivel del Glu315, efectuamos cálculos computacionales para evaluar el campo eléctrico en dos puntos diferentes de la estructura de la proteína próximos a los centros metálicos (Figura 32). Los cálculos realizados permitieron concluir que la pérdida de la carga negativa del Glu315 determina que el campo eléctrico disminuye a ~30% del valor con respecto al de la forma

wild type en puntos cercanos al T2, mientras el cambio no es significativo en el punto más cercano al T1. Si bien no podemos aseverar a partir de este único ejemplo experimental, que el campo eléctrico en torno del sitio metálico es la causa de cambios tan drásticos en los valores de los potenciales de reducción de E315A, es evidentemente un fenómeno a tener en cuenta. Una respuesta definitiva a ello se obtendría mediante la construcción de variantes que permitan mapear como varían los potenciales de reducción de los centros metálicos en función del campo eléctrico dentro de la proteína, lo cual es motivo de trabajos experimentales futuros dentro del grupo.

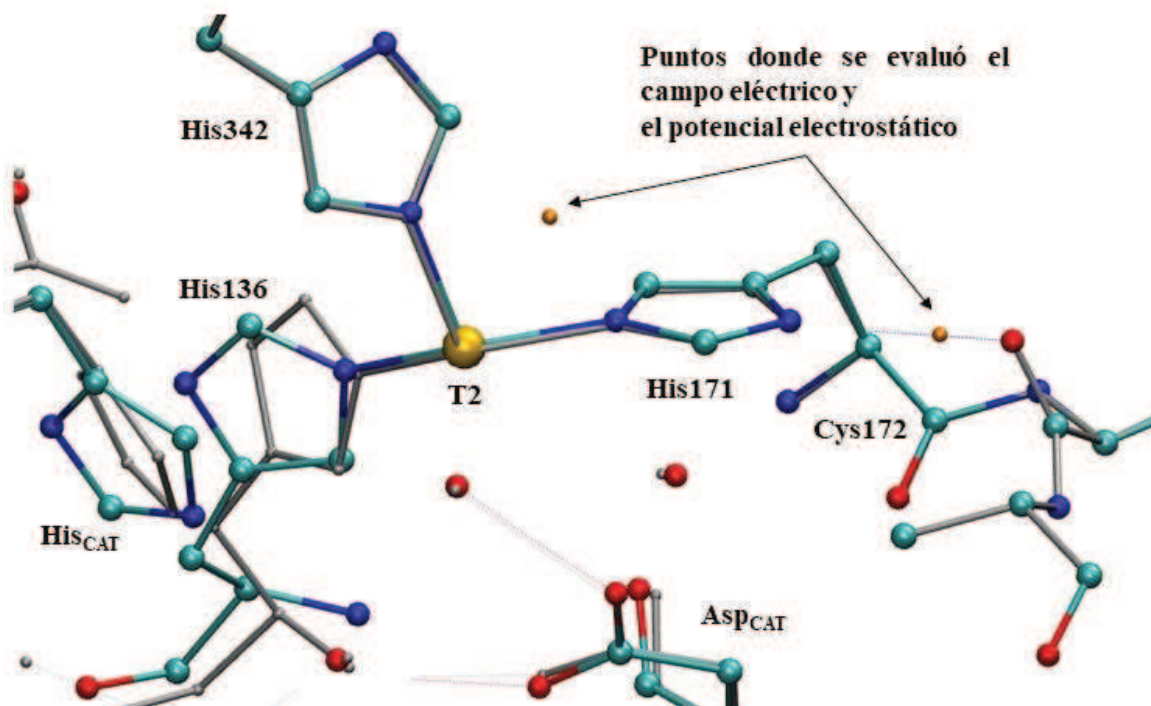


Figura 32. Superposición de estructuras computadas QM/MM de *SmNirK* (gris) y E315A (en colores azul, celeste y rojo para los átomos de N, C y O respectivamente). En naranja se indican los puntos donde se calculó el potencial y el campo eléctrico.

V. Conclusiones

Objetivo I. Producir y purificar variantes de *SmNirK* que modifiquen el entorno de coordinación del sitio activo de la enzima (T2Cu) manteniendo inalterado el centro de transferencia electrónica (T1Cu).

Se logró obtener mediante mutagénesis sitio dirigida dos variantes de *SmNirK*, en las cuales se modificó el entorno de coordinación del sitio activo de la enzima. En la variante H342G se reemplazó la histidina coordinante al T2Cu que pertenece a la subunidad adyacente y en la variante E315A se reemplazó el glutámico perteneciente a la segunda esfera de coordinación del T2Cu. Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron producidas de manera recombinante con los genes aislados de *Sinorhizobium meliloti* 2011, y las mismas fueron purificadas mediante cromatografía.

La caracterización por espectroscopía de UV-Vis para H342G y E315A mostró resultados en línea con los reportados previamente para *SmNirK* (11). Los espectros UV-vis en ambas variantes presentaron bandas de absorción con intensidades similares en las posiciones características de la enzima en su forma *wild type*. Se observó que las relaciones de los coeficientes de extinción $\epsilon_{456}/\epsilon_{586}$ para H342G y E315A son similares a la relación obtenida para *SmNirK* (secciones IV.1.3.1 y IV.2.2.1). Asimismo, la caracterización mediante espectroscopia de EPR de las dos variantes (secciones IV.1.3.2 y IV.2.2.2) también mostro señales y parámetros para el T1Cu, en línea con los reportados previamente para *SmNirK* (11). Por otra parte, el análisis realizado mediante cálculos computacionales (secciones IV.1.7 y IV.2.5) permitió confirmar que las variantes muestran una geometría de coordinación, en línea con la geometría de coordinación del T1Cu previamente reportada para *SmNirK* (30). A partir de esto se puede concluir que las mutaciones puntuales realizadas, que involucran residuos pertenecientes al entorno de coordinación del sitio activo (H342) y a la segunda esfera de coordinación del T2Cu (E315), no tienen consecuencia sobre el centro de transferencia electrónica, ya que este sitio se mantuvo inalterado frente al reemplazo de los residuos H342 y E315.

Objetivo II. Evaluar las propiedades moleculares y caracterizar mediante espectroscopía el sitio activo de H342G y E315A.

Se observó que las dos variantes presentan características moleculares similares a las previamente reportadas para *SmNirK* (11). Los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión para H342G y E315A (secciones IV.1.1 y IV.2.1), permitieron concluir que ambas enzimas se expresan como homotrímero. Mientras que los valores obtenidos en la determinación del contenido de cobre (secciones IV.1.1 y IV.2.1) indicaron que los sitios T1 y T2 se encuentran totalmente ocupados en H342G y E315A. Por lo tanto, se puede concluir que la estructura cuaternaria y la capacidad de incorporar cobre, no se modifica tras las mutaciones puntuales realizadas.

Para el T2Cu de E315A no se evidenciaron diferencias significativas en la señal y los parámetros de EPR (sección IV.2.2.2), respecto de los reportados para *SmNirK* (11). Por el contrario, para el sitio T2 de H342G *as purified* se observó una combinación de resonancias en la señal de EPR. Por un lado, el análisis realizado considerando solo las resonancias más intensas (sección IV.1.3.2) arrojó parámetros de EPR que difieren de los obtenidos para *SmNirK*. Además, cuando H342G fue reducida con ascorbato la señal T2 EPR presentó resonancias individuales bien definidas con valores de g_{\parallel} y $A_{\parallel/Cu}$, ligeramente diferentes a las del H342G *as-purified* (sección IV.1.3.2). Si bien, la presencia de resonancias adicionales en el g_{\parallel} del T2Cu sugieren un centro de cobre con un espectro característico del acoplamiento T1-T2 por intercambio ($H = -J S_{T1} \cdot S_{T2}$) y el análisis que considera este acoplamiento por intercambio es la mejor aproximación entre experimento y simulación, es necesario realizar experimentos de EPR a diferentes frecuencias de microondas para llegar a una conclusión definitiva sobre si la presencia de una señal no definida se debe a las interacciones magnéticas T1-T2 que desaparecen con la reducción total del T1Cu. Por otra parte, se observó también para H342G reducida en la región g_{\perp} del espectro una estructura hiperfina atribuible a la interacción hiperfina del espín del electrón del cobre (II) ($S=1/2$) con dos N-núcleos equivalentes ($I=1$) (sección IV.1.3.2). A partir de la caracterización por espectroscopía de EPR, es posible concluir que la geometría de coordinación del sitio activo de la enzima se encuentra significativamente modificada por el reemplazo del residuo H342 coordinante a dicho sitio, mientras que el reemplazo del residuo E315 de la segunda esfera de coordinación no genera ninguna alteración sobre la geometría del mismo.

Objetivo III. Evaluar la función catalítica de las variantes H342G y E315A mediante ensayos cinéticos empleando el dador electrónico fisiológico *SmPaz* y dadores artificiales.

El ensayo cinético empleando el dador electrónico fisiológico *SmPaz* para E315A evidenció un valor de k_{Cat} en línea con el obtenido para *SmNirK*, mientras que el valor de K_m para E315A es significativamente mayor respecto de *SmNirK* (sección IV.2.3). El mismo ensayo para H342G arrojó un valor de K_{Cat} significativamente menor respecto de *SmNirK*, mientras que el valor de K_m está en línea con *SmNirK* (sección IV.1.2). A partir de esto se puede concluir que en E315A la actividad específica de la enzima no se ve afectada frente a el remplazo de E315, mientras que en H342G la actividad se encuentran significativamente disminuida, aunque la ausencia de un residuo coordinante al sitio activo (H342) no suprime el ciclo catalítico de la enzima. Asimismo, la comparación de las relaciones k_{Cat}/K_m entre *SmNirK* y las variantes permite concluir que la afinidad por el sustrato se ve afectada en E315A y H342G.

A diferencia de *SmNirK*, H342G no presentó actividad catalítica en el ensayo cinético empleando metil viológeno (MV) como dador electrónico artificial. H342G presentó menor estabilidad en los ensayos donde se empleó ditionito de sodio. Por lo tanto, no detectar actividad en H342G cuando se emplea MV como dador electrónico podría deberse a una combinación de una baja actividad enzimática intrínseca y a la inestabilidad de esta frente a la concentración de ditionito de sodio empleada en el ensayo.

Objetivo IV. Evaluar el camino de transferencia electrónica en H342G y E315A.

Los ensayos de reducción con ditionito de sodio y reoxidación con nitrito monitoreados mediante espectroscopia de EPR mostraron, que al igual que en *SmNirK* (11), H342G y E315A presentan una reducción completa de los centros de cobre T1 y T2 frente al agente reductor, mientras que la reacción con el sustrato muestra una reoxidación del T2Cu acoplada a la reoxidación del T1Cu en ambas variantes (secciones IV.1.5 y IV.2.3). Este resultado, junto con el análisis de los cálculos computacionales (secciones IV.1.7 y IV.2.5), donde se observó que el puente Cys172-His171 no presenta modificaciones significativas en las variantes respecto de *SmNirK*, permiten concluir que las mutaciones efectuadas no alteran la ruta de transferencia electrónica de la enzima.

Objetivo V. Evaluar la interacción del sustrato con el sitio activo en H342G y E315A.

Mediante espectroscopia de EPR no se observó ninguna modificación en la señal de T2 cuando se adicionó el nitrito a H342G reducida con ascorbato (sección IV.1.4). Este comportamiento inalterado en la señal de T2Cu que difiere significativamente del resultado reportado previamente para *SmNirK* (11) junto la comparación de las relaciones k_{Cat}/K_m (sección IV.1.2), indican que H342 es relevante en la interacción del sustrato con el sitio activo. Esta conclusión está en concordancia con el análisis de los cálculos QM/MM (sección IV.1.7) donde se observó que el hueco generado por la mutación de H342, induce cambios estructurales que conducen a obtener un sitio T2 con mayor número de coordinación, donde la posibilidad de tener el hueco con moléculas de agua puede considerarse la causa de la baja eficiencia catalítica de H342G.

Para E315A se observó que el reemplazo del E315 dio lugar a una diferencia de potenciales que favorece la transferencia electrónica (TE) $T1 \rightarrow T2$ (sección IV.2.4). Esta TE que promueve la reducción del sitio T2Cu, es decir se favorece un estado de oxidación Cu^{+1} que representa una dificultad para la unión de una molécula con carga negativa como el nitrito. En línea con esto la relación k_{Cat}/K_m para E315A disminuyó respecto de *SmNirK* (sección IV.2.3). Por lo tanto, se puede concluir que la modificación del residuo E315 perturba la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima.

Objetivo VI. Evaluar el rol funcional y estructural del ligando His342 en la *SmNirK*.

Las propiedades moleculares junto con los ensayos de estabilidad térmica (secciones IV.1.1 y IV.1.6) mostraron que la estructura cuaternaria de la proteína no se ve afectada a la temperatura y pH donde la enzima realiza la catálisis. Si bien los cálculos QM/MM (sección IV.1.7) evidencian que el hueco generado por el reemplazo del H342 induce cambios estructurales que dan lugar a un sitio T2 con mayor número de coordinación, la influencia de la ausencia de la cadena lateral del residuo H342 (C β -imidazol) no afecta la disposición general de la estructura de la enzima.

El reemplazo de H342 dio lugar a un T2Cu con números de coordinación cuatro o cinco dependiendo de la ausencia y presencia de moléculas de agua en el hueco (sección IV.1.7). Un sitio activo más expuesto al solvente es también otro factor esencial en la catálisis, donde una molécula de agua adicional cerca de W_{BR} y W_{AP} conduce a una forma enzimática con menos eficiencia (79, 80). A partir del análisis de los cambios estructurales se puede concluir que la actividad de la enzima se ve afectada cuando se realiza el reemplazo de H342 por el residuo glicina. Donde, el agrandamiento del canal de sustrato, la coordinación de T2Cu a Asp_{CAT} y la posibilidad de tener el hueco con moléculas de agua, pueden considerarse la causa de la baja eficiencia catalítica de H342G. Por lo que H342 representa un componente estructural esencial para obtener un sitio T2Cu con la estructura y geometría adecuadas para la catálisis.

Objetivo VII. Evaluar el efecto de la His342, ligando de la primera esfera de coordinación del T2Cu en la *SmNirK*, sobre el potencial de reducción de los centros de cobre T1 y T2.

Para H342G mediante espectroscopía de EPR se observó que, frente a la adición de ascorbato en exceso, el centro T1Cu se reduce completamente, tal como sucede en *SmNirK*. Mientras que el centro T2Cu en H342G presenta una reducción parcial similar a la observada en *SmNirK* (sección IV.1.3.2). Por otra parte, mediante espectroscopía de UV-vis y EPR (sección IV.1.5), de manera similar a lo observado en *SmNirK* los centros T1Cu y T2Cu de H342G se reducen completamente frente a la adición de ditionito de sodio en exceso. Estos resultados indican que H342 no tiene un efecto significativo sobre los valores de potencial de reducción de los centros de cobre y por lo tanto, sobre el gradiente de potencial T1-T2, ya que el comportamiento redox de los centros de cobre de H342G frente a los oxidantes y reductores es similar al de *SmNirK*.

Objetivo VIII. Evaluar el efecto del Glu315, ligando de la segunda esfera de coordinación del T2Cu en la *SmNirK*, sobre el potencial de reducción del T2Cu y su relación con la transferencia electrónica T1Cu→T2Cu.

El ensayo de reducción con ascorbato monitoreado por EPR (sección IV.2.4) evidencia que el reemplazo del residuo Glu315 produjo una modificación en el potencial de reducción de los dos centros de cobre para E315A, donde $E^{0'}_{T1E315A} < E^{0'}_{T2E315A}$, en oposición a lo observado en *SmNirK* ($E^{0'}_{T1SmNirK} > E^{0'}_{T2SmNirK}$). El potencial del centro T2Cu para E315A presenta un valor mayor o similar al potencial del centro T1Cu. Esto permite confirmar que la mutación produce una modificación en el potencial del sitio activo de la enzima que da lugar a una diferencia de potenciales T1-T2 que favorece la TE T1→T2. Por otra parte, el ensayo monitoreado por UV-Vis para E315A no evidenció reducción del centro T1Cu frente al agregado de ascorbato (sección IV.2.4), indicando de manera preliminar que el potencial del T1Cu para E315A disminuyó respecto de *SmNirK* ($E^{0'}_{T1E315A} < E^{0'}_{T1SmNirK}$). Por otra parte, si bien el análisis por QM/MM y los resultados obtenidos mediante UV-vis y EPR no revelaron una razón estructural a nivel de los centros metálicos que implique el cambio observado en el gradiente de potencial eléctrico, el cálculo computacional para evaluar el campo eléctrico en dos puntos diferentes de la estructura de la proteína próximos a los centros metálicos (sección IV.2.6) permitió concluir que la pérdida de la carga negativa del Glu315 determina que el campo eléctrico disminuye significativamente respecto *SmNirK* en puntos cercanos al T2Cu, mientras que el cambio no es significativo en el punto más cercano al T1Cu. Si bien estos cálculos no mostraron una modificación significativa en el punto cercano al T1Cu, los resultados observados mediante EPR y UV-vis (sección IV.2.4) permiten concluir que el $E^{0'}_{T1E315A}$ es menor que $E^{0'}_{T2E315A}$, en contraste con lo observado en *SmNirK*, ($E^{0'}_{T1SmNirK} > E^{0'}_{T2SmNirK}$) indicando que el residuo Glu315 tiene un efecto sobre el potencial de reducción del sitio activo de la enzima.

VI. *Bibliografía*

1. Köln HB, Ferguson SJ, Newton WE. Preface. In: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE, editors. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. xiii-xvii.
2. Moura I, Maia LB, Pauleta SR, Moura JJ. A Bird's Eye View of Denitrification in Relation to the Nitrogen Cycle. In: Moura I, Moura JJ, Pauleta SR, Maia LB, editors. *Metalloenzymes in denitrification: applications and environmental impacts*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2016. p. 1-10.
3. Ferguson SJ. Nitrogen cycle enzymology. *Curr Opin Chem Biol*. 1998;2(2):182-93.
4. Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(4):533-616.
5. Tavares P, Pereira AS, Moura JJ, Moura I. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem*. 2006;100(12):2087-100.
6. Zahran HH. Enhancement of Rhizobia–Legumes Symbioses and Nitrogen Fixation for Crops Productivity Improvement. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J, editors. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 227-54.
7. Gruber N, Galloway JN. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*. 2008;451(7176):293-6.
8. Averill BA. Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem Rev*. 1996;96(7):2951-64.
9. Nojiri M. Chapter 5. Structure and Function of Copper Nitrite Reductase. In: Moura I, Moura JJ, Pauleta SR, Maia LB, editors. *Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2017. p. 91-113.
10. Godden JW, Turley S, Teller DC, Adman ET, Liu MY, Payne WJ, et al. The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science*. 1991;253(5018):438-42.
11. Ferroni FM, Guerrero SA, Rizzi AC, Brondino CD. 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*. 2012;114:8-14.

12. Kukimoto M, Nishiyama M, Murphy ME, Turley S, Adman ET, Horinouchi S, et al. 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*. 1994;33(17):5246-52.
13. Wijma HJ, Boulanger MJ, Molon A, Fittipaldi M, Huber M, Murphy ME, et al. Reconstitution of the type-1 active site of the H145G/A variants of nitrite reductase by ligand insertion. *Biochemistry*. 2003;42(14):4075-83.
14. Kakutani T, Watanabe H, Arima K, Beppu T. Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J Biochem*. 1981;89(2):453-61.
15. Stirpe A, Guzzi R, Wijma H, Verbeet MP, Canters GW, Sportelli L. Calorimetric and spectroscopic investigations of the thermal denaturation of wild type nitrite reductase. *BBA-Proteins Proteom*. 2005;1752(1):47-55.
16. Cristaldi JC, Ferroni FM, Duré AB, Ramírez CS, Dalosto SD, Rizzi AC, et al. Heterologous production and functional characterization of *Bradyrhizobium japonicum* copper-containing nitrite reductase and its physiological redox partner cytochrome c(550). *Metallomics*. 2020;12(12):2084-97.
17. Olesen K, Veselov A, Zhao Y, Wang Y, Danner B, Scholes CP, et al. Spectroscopic, kinetic, and electrochemical characterization of heterologously expressed wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Biochemistry*. 1998;37(17):6086-94.
18. Zhao Y, Lukoyanov DA, Toropov YV, Wu K, Shapleigh JP, Scholes CP. 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*. 2002;41(23):7464-74.
19. Cristaldi JC. Clonado, expresión, caracterización molecular y fisicoquímica de enzimas involucradas en la etapa de desnitrificación del ciclo del nitrógeno. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad Nacional del Litoral; 2019. <http://hdl.handle.net/11185/1214>.
20. Suzuki S, Kataoka K, Yamaguchi K. Metal coordination and mechanism of multicopper nitrite reductase. *Acc Chem Res*. 2000;33(10):728-35.

21. Dodd FE, Van Beeumen J, Eady RR, Hasnain SS. 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.* 1998;282(2):369-82.
22. LaCroix LB, Shadle SE, Wang Y, Averill BA, Hedman B, Hodgson KO, et al. 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.* 1996;118(33):7755-68.
23. Solomon EI, Szilagyi RK, DeBeer George S, Basumallick L. Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins. *Chem Rev.* 2004;104(2):419-58.
24. Suzuki S, Yamaguchi K, Kataoka K, Kobayashi K, Tagawa S, Kohzuma T, et al. Spectroscopic characterization and intramolecular electron transfer processes of native and type 2 Cu-depleted nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem.* 1997;2(2):265-74.
25. Solomon EI. Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites. *Inorg Chem.* 2006;45(20):8012-25.
26. Basumallick L, Szilagyi RK, Zhao Y, Shapleigh JP, Scholes CP, Solomon EI. 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.* 2003;125(48):14784-92.
27. Hadt RG, Gorelsky SI, Solomon EI. Anisotropic covalency contributions to superexchange pathways in type one copper active sites. *J Am Chem Soc.* 2014;136(42):15034-45.
28. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev.* 1996;96(7):2239-314.
29. González PJ, Rivas MG, Ferroni FM, Rizzi AC, Brondino CD. Electron transfer pathways and spin–spin interactions in Mo-and Cu-containing oxidoreductases. *Coordin Chem Rev.* 2021;449:214202.
30. Ramírez CS, Tolmie C, Opperman DJ, González PJ, Rivas MG, Brondino CD, et al. Copper nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011: Crystal structure and interaction with the physiological versus a nonmetabolically related cupredoxin-like mediator. *Protein Sci.* 2021;30(11):2310-23.

31. Stirpe A, Sportelli L, Wijma H, Verbeet MP, Guzzi R. Thermal stability effects of removing the type-2 copper ligand His306 at the interface of nitrite reductase subunits. *Eur Biophys J.* 2007;36(7):805-13.
32. Hough MA, Ellis MJ, Antonyuk S, Strange RW, Sawers G, Eady RR, et al. High resolution structural studies of mutants provide insights into catalysis and electron transfer processes in copper nitrite reductase. *J Mol Biol.* 2005;350(2):300-9.
33. Ellis MJ, Antonyuk SV, Strange RW, Sawers G, Eady RR, Hasnain SS. Observation of an unprecedented Cu Bis-His site: crystal structure of the H129V mutant of nitrite reductase. *Inorg Chem.* 2004;43(24):7591-3.
34. Cristaldi JC, Gómez MC, González PJ, Ferroni FM, Dalosto SD, Rizzi AC, et al. Study of the Cys-His bridge electron transfer pathway in a copper-containing nitrite reductase by site-directed mutagenesis, spectroscopic, and computational methods. *BBA - Gen Subjects.* 2018;1862(3):752-60.
35. Pinho D, Besson S, Brondino CD, de Castro B, Moura I. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135. *Eur J Biochem.* 2004;271(12):2361-9.
36. Veselov A, Olesen K, Sienkiewicz A, Shapleigh JP, Scholes CP. 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.* 1998;37(17):6095-105.
37. Prudêncio M, Eady RR, Sawers G. 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.* 2001;353(Pt 2):259-66.
38. Ferroni FM, Marangon J, Neuman NI, Cristaldi JC, Brambilla SM, Guerrero SA, et al. 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.* 2014;19(6):913-21.
39. Solomon EI, Heppner DE, Johnston EM, Ginsbach JW, Cirera J, Qayyum M, et al. Copper active sites in biology. *Chem Rev.* 2014;114(7):3659-853.
40. Jacobson F, Pistorius A, Farkas D, De Grip W, Hansson O, Sjölin L, et al. pH dependence of copper geometry, reduction potential, and nitrite affinity in nitrite reductase. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6347-55.

41. Fukuda Y, Tse KM, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, et al. Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(11):2928-33.
42. Hough MA, Antonyuk SV, Strange RW, Eady RR, Hasnain SS. Crystallography with online optical and X-ray absorption spectroscopies demonstrates an ordered mechanism in copper nitrite reductase. *J Mol Biol*. 2008;378(2):353-61.
43. Antonyuk SV, Hough MA. Monitoring and validating active site redox states in protein crystals. *BBA - Proteins Proteom* 2011;1814(6):778-84.
44. Kataoka K, Furusawa H, Takagi K, Yamaguchi K, Suzuki S. Functional analysis of conserved aspartate and histidine residues located around the type 2 copper site of copper-containing nitrite reductase. *J Biochem*. 2000;127(2):345-50.
45. Boulanger MJ, Kukimoto M, Nishiyama M, Horinouchi S, Murphy ME. Catalytic roles for two water bridged residues (Asp-98 and His-255) in the active site of copper-containing nitrite reductase. *J Biol Chem*. 2000;275(31):23957-64.
46. Boulanger MJ, Murphy ME. 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*. 2001;40(31):9132-41.
47. Wijma HJ, Jeuken LJ, Verbeet MP, Armstrong FA, Canters GW. A random-sequential mechanism for nitrite binding and active site reduction in copper-containing nitrite reductase. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16340-6.
48. Wijma HJ, Jeuken LJ, Verbeet MP, Armstrong FA, Canters GW. Protein film voltammetry of copper-containing nitrite reductase reveals reversible inactivation. *J Am Chem Soc*. 2007;129(27):8557-65.
49. Kobayashi K, Tagawa S, Deligeer, Suzuki S. The pH-dependent changes of intramolecular electron transfer on copper-containing nitrite reductase. *J Biochem*. 1999;126(2):408-12.
50. Leferink NG, Han C, Antonyuk SV, Heyes DJ, Rigby SE, Hough MA, et al. Proton-coupled electron transfer in the catalytic cycle of *Alcaligenes xylosoxidans* copper-dependent nitrite reductase. *Biochemistry*. 2011;50(19):4121-31.

51. Brenner S, Heyes DJ, Hay S, Hough MA, Eady RR, Hasnain SS, et al. Demonstration of proton-coupled electron transfer in the copper-containing nitrite reductases. *J Biol Chem.* 2009;284(38):25973-83.
52. Strange RW, Murphy LM, Dodd FE, Abraham ZH, Eady RR, Smith BE, et al. Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase. *J Mol Biol.* 1999;287(5):1001-9.
53. Li Y, Hodak M, Bernholc J. Enzymatic mechanism of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry.* 2015;54(5):1233-42.
54. Goodin DB, McRee DE. The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry.* 1993;32(13):3313-24.
55. Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, Hwang JK. How do serine proteases really work? *Biochemistry.* 1989;28(9):3629-37.
56. Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED. Protein metal-binding sites. *Curr Opin Biotechnol.* 1992;3(4):378-87.
57. Christianson DW, Alexander RS. Carboxylate-histidine-zinc interactions in protein structure and function. *J Am Chem Soc.* 1989;111(16):6412-9.
58. Finzel BC, Poulos TL, Kraut J. Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem.* 1984;259(21):13027-36.
59. Erman JE, Vitello LB. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *BBA - Protein Struct M* 2002;1597(2):193-220.
60. Valentine JS, Sheridan RP, Allen LC, Kahn PC. Coupling between oxidation state and hydrogen bond conformation in heme proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(3):1009-13.
61. Varadarajan R, Zewert TE, Gray HB, Boxer SG. Effects of buried ionizable amino acids on the reduction potential of recombinant myoglobin. *Science.* 1989;243(4887):69-72.
62. Varadarajan R, Lambright DG, Boxer SG. Electrostatic interactions in wild-type and mutant recombinant human myoglobins. *Biochemistry.* 1989;28(9):3771-81.
63. Rodgers KK, Sligar SG. Surface electrostatics, reduction potentials, and the internal dielectric constant of proteins. *J Am Chem Soc.* 1991;113(24):9419-21.

64. Studier FW. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. In: Chen Y, editor. *Structural Genomics Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ USA: Humana Press; 2014. p. 17-32.
65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
66. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
67. Pauleta SR, Guerlesquin F, Goodhew CF, Devreese B, Van Beeumen J, Pereira AS, et al. *Paracoccus pantotrophus pseudoazurin* is an electron donor to cytochrome c peroxidase. *Biochemistry*. 2004;43(35):11214-25.
68. Hanna PM, Tamilarasan R, McMillin DR. Cu(I) analysis of blue copper proteins. *Biochem J*. 1988;256(3):1001-4.
69. Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J Magn Reson*. 2006;178(1):42-55.
70. Huynh K, Partch CL. *Current Protocols in Protein Science* [Internet]: John Wiley and Sons; 2015 Available from: <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>.
71. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Jul 1; 32(suppl_2):[W665-W7 pp.]. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>.
72. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. *Gaussian 09, Revision C1* Gaussian, Inc, Wallingford CT2009.
73. Chai JD, Head-Gordon M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys Chem Chem Phys*. 2008;10(44):6615-20.
74. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc*. 1995;117(19):5179-97.
75. Fry IV, Cammack R, Hucklesby DP, Hewitt EJ. Kinetics of leaf nitrite reductase with Methyl Viologen and ferredoxin under controlled redox conditions. *Biochem J*. 1982;205(1):235-8.

76. Bockman TM, Kochi JK. Isolation and oxidation-reduction of methylviologen cation radicals. Novel disproportionation in charge-transfer salts by x-ray crystallography. *J Org Chem.* 1990;55(13):4127-35.
77. Peisach J, Blumberg WE. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1974;165(2):691-708.
78. Ellis MJ, Dodd FE, Sawers G, Eady RR, Hasnain SS. Atomic resolution structures of native copper nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* and the active site mutant Asp92Glu. *J Mol Biol.* 2003;328(2):429-38.
79. Rose SL, Baba S, Okumura H, Antonyuk SV, Sasaki D, Hedison TM, et al. Single crystal spectroscopy and multiple structures from one crystal (MSOX) define catalysis in copper nitrite reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2022 Jul 26; 119(30):[e2205664119 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.2205664119>.
80. Rose SL, Antonyuk SV, Sasaki D, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, et al. An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic-resolution and damage-free structures. *Sci Adv* [Internet]. 2021 Jan; 7(1):[eabd8523 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd8523>.