

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE UNA FORMATO DESHIDROGENASA TOLERANTE A OXÍGENO

Stácul Alejandro

Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Biotecnología FBCB-UNL

Directora: Slaboch, María Victoria

Codirector: Gonzales, Pablo

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Formato Deshidrogenasa, Cinética enzimática, Purificación de proteínas.

INTRODUCCIÓN

Las Formato Deshidrogenasa (Fdh) (E.C: 1.17.1.9) son un grupo heterogéneo de enzimas que se encuentran en una amplia variedad de organismos. Estas cumplen papeles importantes que van desde el suministro de energía de microorganismos metilotróficos hasta la respuesta a estrés en plantas. Son oxidorreductasas que dependen de diferentes cofactores para llevar a cabo su función, y pueden clasificarse en 2 grandes grupos: i) NAD-Fdh, o Fdh independientes de metales, ii) Mo/W-Fdh, o Fdh dependientes de metales.

Las NAD-Fdh están presentes principalmente en levaduras y plantas superiores, pero también han sido aisladas a partir de bacterias. Estas enzimas solubles dependen únicamente de NAD(P)⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) y su sitio activo está conformado sólo por residuos de aminoácidos (Amao et al., 2018). Forman homodímeros, carecen de grupos prostéticos redox o iones metálicos, y no reaccionan con aceptores de electrones artificiales. Muestran afinidades relativamente bajas por el formato y no son inactivadas por el oxígeno.

En este sentido, se pretende estudiar la Fdh soluble y tolerante a O₂(g) de *Candida boidinii* (CboFdh), una NAD-Fdh compuesta por dos monómeros. Katja Schirwitz y colaboradores (2007) reportaron la estructura de estos monómeros en donde describen que cada uno consta de 15 hélices α y 13 hebras β que están dispuestas en dos dominios, denominados “dominio de unión a NAD⁺” y “dominio catalítico”, unidos por dos hélices largas y separados por una hendidura profunda donde se ubica el sitio activo. Otro surco, bastante menos profundo y más ancho, está en el lado opuesto de la molécula, integrando la zona de dimerización. Esto genera una conexión muy delgada entre los dos dominios, lo que permite que se comporte como bisagra y la posibilidad de que el dominio se mueva tras la unión del sustrato y el cofactor. (Schirwitz K. et al. 2007)

Título del proyecto: Propiedades Estructurales Y Fisicoquímicas De Metaloenzimas Y Compuestos De Coordinación Que Contienen Metales De Transición Paramagnéticos
Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2023

Organismo financiador: Fondo Para La Investigacion Científica Y Tecnológica (FONCYT)

Director/a: Brondino, Carlos Dante



OBJETIVOS

El objetivo a largo plazo del proyecto donde se enmarca esta actividad de formación extracurricular es desarrollar un catalizador electro-enzimático capaz de transformar CO₂ en ácido fórmico (HCOOH).

El objetivo general es aislar una formato deshidrogenasa estable y activa en atmósfera aeróbica, que pueda adsorberse a la superficie de un material conductor noble. Este material modificado funcionará como un bio-cátodo específico capaz de catalizar la reducción de CO₂ a ácido fórmico. Los objetivos específicos de esta actividad de formación extracurricular son: i) Expresar de forma heteróloga una Fdh ii) purificar la Fdh a través de técnicas de cromatografía líquida, iii) caracterizar la cinética de reacción [formato → CO₂], iv) Optimizar la reacción de reducción de CO₂.

METODOLOGÍA

Vector de expresión

El vector de expresión pET28c/CboFatoDHase que contiene el gen que codifica para la CboFdh fue proporcionado por el Dr. Matías Hartman del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral - UNL - CONICET. El mismo fue utilizado para expresar de forma recombinante la proteína CboFdh soluble.

Expresión de CboFdh recombinante en *E. coli*

Minipreparaciones plasmídicas de las construcciones pET28c/CboFatoDHase se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21.DE3 por la técnica de transformación química. La expresión de las proteínas recombinantes se realizó utilizando los protocolos de producción y purificación de TspFdh optimizados en trabajos anteriores (Elizalde, H.C, 2022).

Se realizó un pre-cultivo utilizando una colonia aislada de la transformación para inocular 10 ml medio LB fresco y estéril suplementado con kanamicina (50 µg/mL) e incubado a 37°C a 200 rpm durante 7 horas. Luego se utilizan 5 ml del cultivo para inocular 50 ml de medio LB a 37°C a 200 rpm durante toda la noche (over night, ON).

Para la expresión de la proteína se utilizaron Erlenmeyers de 1 L y 2 L con 200 ml y 400 ml de medio LB estéril (20% del volumen del Erlenmeyer) suplementado con kanamicina (50 µg/mL). El pre-cultivo se utilizó para inocular los Erlenmeyers (2% del volumen de medio) y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica aproximadamente de 0.4-0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica necesaria, se indujo la expresión de la proteína con el agregado 0.5 mM de IPTG. El cultivo se incubó durante 18-20 horas a 200 rpm a 30°C para asegurar el correcto plegamiento y solubilidad de las proteínas. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 5000 xg, 4°C, durante 15 minutos. El pellet se resuspendió en buffer de baja fuerza iónica (5 mM KPB pH 7,3) para favorecer su ruptura. Se utilizaron 2 mL de solución tampón por cada gramo de células, y se agregó 1 mM PMSF para inhibir la acción de proteasas. Se sonicó realizando 10 ciclos de 2 minuto (2" de pulso – 2" de pausa) a 40% de amplitud, en baño de hielo.

El pellet fue descartado y la fracción soluble, compuesta por citoplasma y periplasma celular, que contiene la enzima de interés (CboFdh) se conservó a 4°C durante no más de 24 horas hasta su purificación.

Purificación de la enzima

El extracto soluble conteniendo la enzima de interés obtenido según lo descrito anteriormente, fue inyectado en una columna de intercambio aniónico (DEAE Sepharosa FF, GE-Healthcare) que fue previamente equilibrada con una solución tampón 5 mM KPB pH 7,3. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 0.3 M de NaCl en 20 mM tampón fosfato de potasio pH 7,3 (Buffer B), en 10 volúmenes de columna. Según los picos de absorbancia a 280 nm, las fracciones eluidas se unificaron según su pureza. Luego fueron concentrados por ultrafiltración en un sistema Amicon.

Para detectar la sobreexpresión de la proteína de interés se usó electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (He, F. (2011)). La CboFdh tiene un tamaño de 82 kDa aproximadamente compuesta por dos monómeros de 41 kDa.

Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos cinéticos continuos de estado estacionario se realizaron para determinar los parámetros cinéticos de la CboFdh. La actividad formato deshidrogenasa (reacción directa) se evaluó utilizando la capacidad de la enzima de catalizar la reducción de NAD^+ a NADH en presencia de formato. Se monitoreó la aparición de NADH (ϵ_{NADH} , 340nm = 6220 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a 340 nm utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos Cary 8454 UV-Vis (Agilent Technologies). La reacción fue iniciada con la adición de cantidades variables de formato de sodio a diferentes concentraciones de NAD^+ . La mezcla de reacción (volumen final de 1 mL) contenía además 100 mM KPB pH 7,3 y 36 $\mu\text{g/mL}$ de CboFdh. El ensayo se realizó en condiciones aeróbicas bajo agitación constante. Se utilizó la pendiente de la variación de absorbancia en el tiempo para calcular las velocidades iniciales de reacción (v_0).

Además, se usaron las condiciones de reacción de velocidad máxima para la reacción directa y se determinaron las velocidades iniciales de reacción en un rango de temperaturas de 4 a 50 °C y de pH de 5,5 a 9. El análisis se realizó mediante gráficas de Arrhenius y Eyring (Eyring, H. (1935); Cornish-Bowden, A. (1995)).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

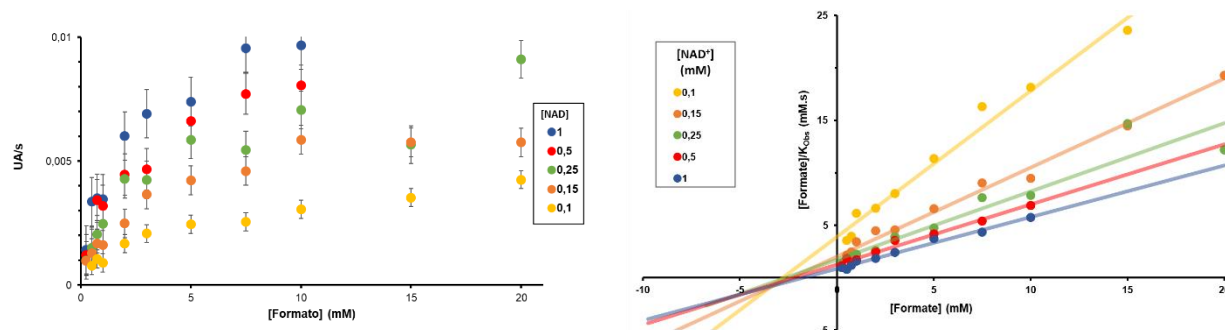
Se realizaron cultivos a media escala lográndose producir CboFdh activa, en cantidades necesarias para realizar los ensayos de cinética enzimática deseados y con una pureza aceptable.

Luego del estudio de la cinética de reacción se logró determinar los parámetros cinéticos presentados en la Tabla 1, e identificar el mecanismo de reacción variando las concentraciones finales de los reactivos. Según los resultados obtenidos podemos señalar que la CboFdh posee un mecanismo secuencial (Figura 1)

Tabla 1: Valores obtenidos a partir de las gráficas de Hanes-Woolf.

Reacción	Kcat (s^{-1})	K_m^{NAD} (mM)	K_m^{Formato} (mM)	K_i^{NAD} (mM)	K_i^{Formato} (mM)
$\text{H}_2\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$	2,4	0,18	1,8	0,28	3,31

Figura1: *Izquierda:* Curvas de v_0 versus $[Formato-Na]$ para las diferentes concentraciones de NAD^+ .
Derecha: Gráficas de Hanes-Woolf para la cinética de oxidación de formato de CboFdh.



Del estudio del efecto isotópico, comportamiento de la enzima con H-formato y D-formato como sustrato, se obtuvieron V_i menores para este último en las condiciones de reacción de velocidad máxima. Tras analizar el comportamiento de la enzima y estos sustratos a diferentes pH, observamos que la diferencia de V_i se mantiene en el rango de 6,5 a 9. Sin embargo a pH bajos la V_i con H-formato decrece con el pH igualándose a la V_i de D-formato a pH 5,5.

Posteriormente se estudió la dependencia de la actividad enzimática con la temperatura, se exploró el rango de temperatura de 4°C a 50°C, tanto para H-Formato como para D-Formato a pH 7 y a pH 5,5. Usando las formas linealizadas de las gráficas de Arrhenius se determinaron las E_a de las reacciones y los factores pre-exponenciales; y gráficas de Eyring para determinar los parámetros termodinámicos $\Delta H^\ddagger$ y $\Delta S^\ddagger$ (Tabla 2). El estudio el efecto isotópico (KIE) a temperatura variable mostró que el comportamiento de la CboFdh se puede predecir con el modelo clásico, obedeciendo al modelo de oscilador armónico. Indicando que el efecto “hydrogen-tunneling” no es apreciable.

Tabla 2: Resumen de parámetros cinéticos obtenidos para reacciones con H-Formato y D-Formato

pH	Sustrato	E_a ($\frac{KJ}{mol}$)	A	$\Delta H^\ddagger$ ($\frac{KJ}{mol}$)	$\Delta S^\ddagger$ ($\frac{J}{mol K}$)
7	H-formato	46,6	1,98E+08	44,9	-91,7
	D-formato	48,5	2,09E+08	44,7	-98,5
5,5	H-formato	63,6	7,27E+10	62,7	-40,0
	D-formato	51,8	2,52E+08	48,5	-95,1

En el futuro se podrá realizar estudios sobre la reacción reversa, en donde se podrá observar el comportamiento de los sustratos y los parámetros cinéticos en estas condiciones.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Amao, Y.**, 2018. Formate dehydrogenase for CO₂ utilization and its application. *Journal of CO₂ Utilization*, 26, 623-641.
- Cornish-Bowden, A.**, 1995. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, revised edition. *Analytical Biochemistry*, 231, 275-275.
- Elizalde, H. C.**, 2022. Producción de ácido fórmico como combustible alternativo: caracterización cinética de la formato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ de *Thiobacillus* sp. (Tesis de licenciatura en biotecnología, Universidad Nacional del Litoral).
- Eyring, H.**, 1935. The activated complex in chemical reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2), 107-115.
- He, F.**, 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol* Bio101: e80
- Schirwitz K., et al.**, 2007. High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*.