UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

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

Rol de ligandos de segunda y tercera esfera de coordinación del sitio activo de cobre en las propiedades redox y catalíticas de la nitrito reductasa de *Sinorhizobium meliloti* 2011

Qca. Lorieth Alejandra Guevara Cuasapud

Director: Dr. Carlos Dante Brondino

Co-director: Dra. Maria Gabriela Rivas

Departamento de Física -FBCB-UNL-

-2025-

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Brondino, por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas bajo su dirección y permitirme hacer parte del Departamento de Física.

A la Dra. Gabriela Rivas, por sus enseñanzas, compromiso y guía en el trabajo además de su confianza, paciencia y generosidad en la vida. Al Dr. Pablo González, por su orientación y apoyo, incluso los días que hacía muchas preguntas. Al Dr. Félix Ferroni, no solo por sus enseñanzas sino por permitirme ser su amiga.

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

Al personal docente del Departamento de Física, por brindarme su colaboración y apoyo en mi formación como docente.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por ofrecerme el espacio de trabajo y los recursos necesarios para realizar esta investigación y por permitirme ser parte del cuerpo docente del departamento de Física. A la AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA y a CONICET, por las becas que recibí y que hicieron posible realizar mi doctorado. Gracias a las tres instituciones, sin su apoyo este sueño no hubiera sido posible.

También quiero agradecer a Vicky, Hile y Emi (las chicas del entrepiso), a Axel, Andre, Cintius, Puchi y todos los miembros de la familia Depto. Física, por brindarme su amistad y compañía compartiendo con charlas científicas o faranduleras cada día. A los compañeros de vida, tanto argentinos como colombianos, porque con esas juntadas me hicieron conocer un poco más su país y, al mismo tiempo, me ayudaron a no olvidar las cosas lindas del mío.

A Ximena, la brujis, siendo mi confidente y dándome apoyo desde lo lejos.

Gracias a todos ustedes, siempre estarán en mi corazón.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud eterna a mi familia, por dejarme ir tan lejos en busca de un sueño. Gracias por su apoyo incondicional y por darme el empujón de regreso cada vez que iba de visita. A pesar de la distancia, siempre sentí su presencia y cariño, y eso me dio fuerzas para seguir adelante. Este logro es tan suyo como mío, porque su amor, paciencia y comprensión han sido mi motor en los momentos más difíciles.

Aportes científicos

Parte del trabajo realizado en esta tesis ha sido incluido en los siguientes artículos:

- Replacement of the essential catalytic aspartate with serine leads to an active form of copper-containing nitrite reductase from the denitrifier *Sinorhizobium meliloti* 2011. Guevara Cuasapud LA, González PJ, Ferroni FM, Duré AB, Dalosto SD, Rivas MG, Brondino CD. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 1873(2) (**2025**) 141062.
- 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. Duré AB, Cristaldi JC, Guevara Cuasapud LA, Dalosto SD, Rivas MG, Ferroni FM, González PJ, Montich GG, Brondino CD. *J Inorg Biochem*, 241 (**2023**) 112155.

Índice de contenido

Agradecimientos *1*

Aportes científicos *2*

Símbolos y abreviaturas *6*

Resumen *8*

Abstract *11*

1. INTRODUCCIÓN 14

1.1. El ciclo biológico del nitrógeno 15

1.2. La vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno 17

1.3. ¿Cuál es el interés en estudiar las enzimas de la desnitrificación? 18

1.4. Propiedades moleculares y espectroscópicas de las Nitrito Reductasas de cobre 19

1.5. El mecanismo de reacción de las NirK 24

2. OBJETIVOS 29

2.1. Objetivo general 30

2.2. Objetivos específicos 30

3. MATERIALES Y MÉTODOS 31

3.1. Metodologías utilizadas para la obtención de las variantes de *Sm*NirK 32

3.2. Obtención y transformación de células competentes 34

3.3. Medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli* utilizados en el clonado y expresión de las proteínas 35

3.4. Producción de biomasa y expresión de proteínas recombinantes 36

3.4.1. Producción de SmNirK salvaje y D134S 36

3.4.2. Producción de K305M 36

3.4.3. Producción de SmPaz 37

3.4.4. Obtención del extracto soluble 37

3.5. Purificación de proteínas 38

3.5.1. Purificación de SmNirK salvaje y SmPaz 38

3.5.2. Purificación de D134S 38

3.5.3. Purificación de K305M 39

3.6. Caracterización bioquímica básica de la variante D134S 39

3.6.1. Determinación de la masa molecular aparente 39

3.6.2. Determinación de la concentración de proteínas 39

3.6.3. Determinación del contenido de cobre 40
3.7. Métodos espectroscópicos 40
3.7.1. Espectroscopia de absorción UV-vis 40
3.7.2. Espectroscopia de EPR 40
3.7.2.1. Simulación de espectros de EPR 40
3.8. Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por EPR 41
3.9. Ensayos de actividad enzimática de la variante D134S 41
3.9.1. Método cinético discontinuo 41
3.9.2. Método cinético continuo 42
3.10. Estudio de estabilidad de la variante D134S 42
3.11. Titulación potenciométrica de *Sm*NirK salvaje y variante D134S 43
3.12. Métodos computacionales 45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
4.1. Influencia de residuos de la segunda esfera de coordinación del T2 en las propiedades moleculares y espectroscópicas de la enzima. Variante D134S .. 47
4.1.1. Optimización de la producción y aislamiento de la variante 47
4.1.2. Propiedades moleculares 49
4.1.3. Estudio de la estabilidad de la variante D134S 50
4.1.3.1. Determinación de las concentraciones de proteína y fluoróforo óptimas 50
4.1.3.2. Influencia del pH en la estabilidad térmica 52
4.1.3.3. Estudio del efecto de aditivos en la estabilidad de la variante 53
4.1.4. Caracterización espectroscópica 54
4.1.4.1. Espectroscopia de absorción UV-vis 54
4.1.4.2. Espectroscopia de EPR 55
4.1.5. Evaluación de las propiedades cinéticas de la variante D134S 59
4.1.5.1. Determinación de los parámetros cinéticos K_m, V_m y k_{cat} 59
4.1.5.2. Efecto del pH en la actividad de la variante D134S 60
4.1.6. Efecto del pH en la velocidad de transferencia electrónica entre los centros T1 y T2 63
4.1.7. Estudio de los potenciales de reducción (E_m) de los centros T1 y T2 y su relación con la catálisis enzimática. 65
4.1.8. Estudio del entorno de coordinación del núcleo catalítico mediante cálculos computacionales 68

4.2. Influencia de residuos de la tercera esfera de coordinación del T2 en las propiedades moleculares y espectroscópicas de la enzima. Variante K305M . 72

4.2.1. Optimización de la expresión de la variante K305M en su forma soluble y activa 72

4.2.2. Purificación de la variante K305M. 80

4.2.3. Propiedades moleculares y espectroscópicas 81

5. CONCLUSIONES 84

Bibliografía 88

Símbolos y abreviaturas

ε: coeficiente de absortividad molar

λ: longitud de onda

Asp_{CAT}: Aspártico catalítico

BV: Benzil Viológeno

D134S: *Sm*NirK variante en la cual el residuo Asp en la posición 134 fue reemplazado por Ser.

DF: dadores fisiológicos

DO: densidad óptica

DSF: del acrónimo en inglés "*Differential Scanning Fluorimetry*"

E: potencial de reducción

E_m: potencial de reducción medio

E_{T1}: potencial formal de reducción del T1

E_{T2}: potencial formal de reducción del T2

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

g: Factor g

Glu_{CAT}: Ácido glutámico catalítico

His_{CAT}: Histidina catalítica

Ile_{CAT}: Isoleucina catalítica

K305M: *Sm*NirK variante en la cual el residuo Lys en la posición 305 fue reemplazado por Met.

k_{cat}: constante catalítica

K_M: constante de Michaelis-Menten

KPB: tampón de fosfato de potasio

MV: Metil Viológeno

Nir: Nitrito reductasa

*Ac*NirK*:* NirK de *Achromobacter cycloclastes*

*Af*NirK*:* NirK de *Alcaligenes faecalis*

*Axn*NirK*:* NirK de *Alcaligenes xylosoxidans*

*Bj*NirK: NirK de *Bradyrhizobium japonicum*

*Pa*NirK: NirK de *Pseudomonas aureofaciens*

*Pc*NirK*:* NirK de *Pseudomonas chlororaphis*

*Rs*NirK*:* NirK de *Rhodobacter spharoides*

*Sm*NirK: NirK de *Sinorhizobium meliloti* 2011

QM/MM: del acrónimo en inglés *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*, Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular.

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

Ser_{CAT}: Serina catalítica

SHE: eléctrodo estandar de hidrógeno

*Sm*Paz: Pseudoazurina de *Sinorhizobium meliloti* 2011

T1: centro de cobre Tipo 1

T2: centro de cobre Tipo 2

TC: Transferencia de Carga

TE: Transferencia Electrónica

T_m: Temperatura de desnaturalización

U.A.: Unidades de Absorbancia

UV-vis: Ultravioleta-visible

V_m: Velocidad máxima de consumo de substrato

W_{ap}: molécula de agua apical

W_{br}: molécula de agua puente que conecta los residuos His_{CAT} y Asp_{CAT}

Resumen

La desnitrificación es el proceso anaeróbico que involucra la reducción mediante bacterias del nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), y óxido nitroso (N_2O) a N_2. La nitrito reductasa (Nir) es una enzima clave en este proceso de desnitrificación. Las Nir catalizan la reducción del NO_2^- a NO, en una reacción que involucra el intercambio de un electrón acoplado a la transferencia de dos protones. Estas enzimas se encuentran en dos tipos diferentes, las Nir de cobre (NirK) y las Nir de hierro (NirS). En estas tesis se discuten distintos aspectos fisicoquímicos de las NirK, enzimas que presentan un elevado grado de homología en sus estructuras primarias.

Las NirK son homotrímeros con subunidades de ~40 kDa. Cada monómero está compuesto por dos dominios denominados I y II, que presentan a grandes rasgos características estructurales similares en todas las NirK. El dominio I contiene dos centros de cobre, uno de tipo 1 o azul (T1) y otro de tipo 2 o normal (T2). T1 actúa como centro de transferencia de electrones y T2 es el sitio catalítico de la enzima. El T1 está coordinado por dos histidinas, una cisteína y una metionina en una geometría tetraédrica distorsionada. El T2 está tetracoordinado por tres histidinas, una de las cuales pertenece al dominio II de una subunidad vecina y, en el estado *resting* de la enzima, por una molécula de agua (agua apical, W_{ap}) como cuarto ligando. Durante la catálisis el W_{ap} es reemplazada por una molécula de nitrito. La actividad catalítica de las NirK es dependiente del pH, es máxima entre pH 5.0 y pH 6.0, y mínima o no detectable a pH > 7.0. Los dos centros de Cu, que están separados por ~12.6 Å, están conectados por dos vías. La más corta es un puente Cys-His que actúa como camino de transferencia electrónica entre T1 y T2. La vía más larga se denomina *sensing loop*. La potencial función de este camino es la de desencadenar la entrega de electrones desde el T1 al T2 a través del puente Cys-His cuando el nitrito se encuentra unido al sitio activo. Además de los ligandos de la primera esfera de coordinación de los dos centros de cobre, se han identificado otros residuos situados en esferas de coordinación más externas del T2 que son catalíticamente relevantes. Uno de estos residuos con relevancia catalítica es un ácido aspártico denominado Asp_{CAT} (D134 numeración correspondiente a *Sm*NirK). La función del Asp_{CAT} es la de ayudar a fijar el nitrito al T2 y participar en el transporte de protones necesarios en la reacción de reducción. Si bien no existe mucha información sobre el rol de los ligandos de la tercera esfera de coordinación del T2, se presume que los mismos no cumplen un rol pasivo debido a la relevancia de los ligandos de la segunda esfera.

El objetivo general de esta tesis es estudiar a nivel molecular el rol que cumplen ligandos de la segunda y tercera esfera de coordinación del sitio activo de la NirK de la rizobacteria *Sinorizobium meliloti* 2011 (*Sm*NirK) en la estabilidad estructural y en el mecanismo catalítico de la proteína. El trabajo realizado tiene una gran componente experimental y una menor teórica. El trabajo experimental consiste en i) construir variantes mediante mutación sitio dirigida que reemplacen el ligando Asp_{CAT} (Asp134) de la segunda esfera del T2 por Ser y la Lys305 de la tercera esfera por Met, ii) producir y purificar a grado electroforético las variantes obtenidas, iii) evaluar la estabilidad estructural de las variantes en función del pH y compararla con la enzima de tipo salvaje, iv) realizar la caracterización cinética de las variantes y la enzima de tipo salvaje en el rango de pH 5.4 a pH 7.0, v) evaluar mediante las espectroscopias de UV-vis y de EPR las propiedades electrónicas de los centros metálicos y vi) evaluar mediante titulaciones potenciométricas monitoreadas por espectroscopias UV-vis y EPR los potenciales de reducción de los centros metálicos. El trabajo teórico consiste en realizar cálculos computacionales del tipo QM/MM que permitan predecir los cambios estructurales inducidos por las mutaciones.

La mutación, producción y purificación de las variantes propuestas fue exitosa en los dos casos, aunque no exentos de ciertas dificultades experimentales en la K305M. Para las dos variantes, se optimizaron los protocolos de crecimiento y purificación, obteniéndose en ambos casos proteínas solubles, puras y activas. No obstante, para la K305M, hubo diferentes obstáculos que hicieron que este proceso sea más largo, lo que redundó en un rendimiento bajo con producciones no suficientes para realizar todos los estudios planteados.

Al igual que la enzima de tipo salvaje, la D134S es un homotrímero con el típico *pocket* catalítico de las NirK de dos dominios que contiene dos centros de cobre T1 y T2. El T1 es similar al de la enzima de tipo salvaje, pero las propiedades electrónicas y covalentes del T2 están alteradas por la mutación. La actividad enzimática de la D134S depende del pH, con un máximo a pH < 6.0, similar al de la enzima de tipo salvaje, pero con una velocidad de reacción aproximadamente 10 veces menor a pH 5.4. Esto indica que las NirK de dos dominios puede funcionar bien con el residuo Ser_{CAT} no cargado y que la actividad catalítica dependiente del pH no se debe a las propiedades ácido-base del Asp_{CAT}, como se postula para las NirK salvajes de dos dominios. Los estudios de EPR mostraron una disminución en $g_{\parallel}$ y un aumento en $A_{\parallel}$ de D134S. Esto indica cambios en las propiedades electrónicas y covalentes del T2 tras la mutación, lo que afecta su potencial de reducción y la diferencia E_{T1}-E_{T2}. Estos resultados muestran la importancia de los ligandos de la segunda esfera de coordinación del T2 en el control de parámetros

críticos en la catálisis. Los estudios computacionales sugieren la posibilidad de que Asp_{CAT} o Ser_{CAT} sean los disparadores que activan la transferencia de electrones T1→T2 al unirse el nitrito a T2 y revelan la importancia de la His_{CAT} para la actividad catalítica dependiente del pH de NirK.

La K305M muestra un arreglo homotrimérico con monómeros de ~40 kDa. La técnica de cromatografía de exclusión molecular indica que el homotrímero es poco estable, ya que muestra la coexistencia de dímeros y monómeros en solución. Mediante UV-vis se detectó la presencia de un centro de cobre con característica más cercanas a las de un T1 tipo azul, aunque con características muy peculiares debido al mayor ancho que presenta la banda de absorción en ~600 nm. La variante muestra actividad nitrito reductasa, lo que indica la existencia de un centro T2.

En conclusión, el estudio de las variantes D134S y K305M permitió obtener información valiosa sobre el rol de residuos de segunda y tercera esfera de coordinación del T2. En el caso de la Lys305, se pudo concluir que su rol está más relacionado con aspectos estructurales de la proteína, que lleva a modificaciones profundas del T1. Este no es el caso del Asp_{CAT}, que tiene una influencia crítica en el mecanismo catalítico de la enzima. Particularmente, es notable que un ligando de la segunda esfera de coordinación del T2 determine tan significativamente sus propiedades electrónicas, hecho que no tiene antecedentes notables en química de coordinación de moléculas pequeñas.

Abstract

Denitrification is the anaerobic process in which nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), nitric oxide (NO), and nitrous oxide (N_2O) are reduced to N_2 by bacteria. Nitrite reductase (Nir) is a key enzyme in this denitrification process. Nir catalyzes the reduction of NO_2^- to NO in a reaction that involves the exchange of one electron coupled with the transfer of two protons. These enzymes are found in two different types, copper Nir (NirK) and iron Nir (NirS). In this work, we discuss various physicochemical aspects of NirK, enzymes that show a high degree of homology in their primary structures.

NirK are homotrimers with subunits of ~40 kDa. Each monomer is composed of two domains, known as I and II, which have highly similar structural features in all NirK. Domain I contains two copper centers: one type 1 or blue (T1) and another type 2 or normal (T2). T1 acts as the electron transfer center and T2 is the catalytic site of the enzyme. T1 is coordinated to two histidines, one cysteine and one methionine in a distorted tetrahedral geometry. T2 is tetracoordinated by three histidines, one of which belongs to domain II of an adjacent subunit, and, in the resting state of the enzyme, by a fourth water ligand (apical water, W_{ap}). During catalysis, W_{ap} is replaced by a nitrite molecule. The catalytic activity of NirK is pH dependent, maximal between pH 5.0 and 6.0, and minimal or undetectable at pH > 7.0. The two Cu centers, separated by ~12.6 Å, are connected by two pathways. The shorter one is a Cys-His bridge that acts as an electron transfer pathway between T1 and T2. The longer pathway is known as the sensing loop. The potential function of this pathway is to trigger electron transfer from T1 to T2 via the Cys-His bridge when nitrite is bound to the active site. In addition to the ligands in the first coordination sphere of the two copper centers, other residues located in coordination spheres further away from T2 have been identified as catalytically relevant. One of these is an aspartic acid called Asp_{CAT} (the D134 numbering corresponds to *Sm*NirK). The function of Asp_{CAT} is to help bind nitrite to T2 and to participate in the transport of protons needed for the reduction reaction. Although there is not much information on the role of the ligands of the third coordination sphere of T2, it is assumed that they do not play a passive role due to the relevance of the ligands of the second sphere.

The overall objective of this work is to study, at the molecular level, the role of ligands of the second and third coordination spheres of the active site of NirK of the rhizobacterium *Sinorizobium meliloti* 2011 (*Sm*NirK) in the structural stability and catalytic mechanism of the protein. The work performed has a large experimental and a smaller theoretical component. The experimental work consists of i) construct variants by site-directed

mutagenesis, replacing the Asp_{CAT} ligand of the second coordination sphere of T2 by Ser and the Lys305 of the third sphere by Met, ii) prepare and purify the obtained variants to electrophoretic grade, iii) evaluate the structural stability of the variants as a function of pH and compare it with the wild-type enzyme, iv) perform kinetic characterization of the variants and the wild-type enzyme in the pH range 5.4 to 7.0, v) evaluate of the electronic properties of the metal centers by UV-vis and EPR spectroscopies, and vi) evaluate the reduction potentials of the metal centers by potentiometric titrations monitored by UV-vis and EPR spectroscopies. The theoretical work consists in performing QM/MM type calculations to predict the structural changes induced by the mutations. The mutation, production and purification of the proposed variants was successful in both cases, although with several experimental difficulties in K305M. For both variants, the growth and purification protocols were optimized, obtaining soluble, pure and active proteins in both cases. However, for K305M, there were different obstacles that made this process longer, which resulted in a low yield with insufficient production to carry out all the studies proposed.

Like the wild-type enzyme, D134S is a homotrimer with the typical two-domain NirK catalytic pocket containing two copper centers: T1 and T2. T1 is similar to that of the wild-type enzyme, but the electronic and covalent properties of T2 are modified by the mutation. The enzymatic activity of D134S is pH-dependent, with a maximum at pH < 6.0, similar to that of the wild-type enzyme, but with an approximately 10-fold lower reaction rate at pH 5.4. This indicates that the two-domain NirK can function well with the uncharged Ser_{CAT} residue and that the pH-dependent catalytic activity is not due to the acid-base properties of Asp_{CAT}, as postulated for wild-type two-domain NirKs. EPR studies showed a decrease in $g_{\parallel}$ and an increase in $A_{\parallel}$ of D134S. This indicates changes in the electronic and covalent properties of T2 after mutation, which affects its reduction potential and E_{T1}-E_{T2} difference. These results show the importance of ligands in the second coordination sphere of T2 in controlling critical parameters in catalysis. Computational studies suggest the possibility that Asp_{CAT} or Ser_{CAT} are the triggers that activate electron transfer T1→T2 upon nitrite binding to T2 and reveal the importance of His_{CAT} for the pH-dependent catalytic activity of NirK.

K305M shows a homotrimeric arrangement with ~40 kDa monomers. Molecular exclusion chromatography indicates that the homotrimer is not very stable, as it shows the coexistence of dimers and monomers in solution. UV-vis detected the presence of a copper center with characteristics closer to those of a blue type T1, although with very peculiar characteristics due to a wider absorption band at ~600 nm. The variant shows nitrite reductase activity, indicating the presence of a T2 center.

In conclusion, the study of the D134S and K305M variants provided valuable information on the role of second and third coordination sphere residues of T2. In the case of Lys305, it could be concluded that its role is more related to structural aspects of the protein, leading to deep modifications of T1. This is not the case for Asp_{CAT}, which has a critical influence on the catalytic mechanism of the enzyme. In particular, it is remarkable that a ligand of the second coordination sphere of T2 so significantly determines its electronic properties, a fact that has no remarkable antecedents in small molecule coordination chemistry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ciclo biológico del nitrógeno

El nitrógeno es muy importante para todos los organismos vivos ya que es un componente esencial en biomoléculas como las proteínas y el ADN. Además, este elemento forma parte de la adenosina trifosfato (ATP), la cual es la molécula portadora de energía en todos los seres vivos. Si bien el nitrógeno está presente en gran cantidad en la atmósfera como gas (N_2), los seres vivos no pueden utilizarlo directamente. Para que pueda ser incorporado por estos debe ser transformado en compuestos que puedan ser absorbibles y aprovechables como el amoníaco (NH_3). Este proceso conocido como fijación lo realizan ciertos microorganismos como bacterias, arqueas y algunos hongos especializados, que convierten el nitrógeno gaseoso en amoníaco, permitiendo así su utilización por las plantas (1).

El nitrógeno experimenta otras transformaciones a través de procesos enzimáticos que son esenciales para el mantenimiento de la dinámica de este elemento en el medio ambiente y la fertilidad del suelo. Entre estos procesos se encuentran (1) la amonificación, un proceso disimilatorio en el que los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno se descomponen y liberan amoníaco (NH_3) o amonio (NH_4^+), (2) la nitrificación, en la que el amoníaco o el ion amonio es oxidado a nitrito (NO_2^-) y posteriormente a nitrato (NO_3^-), (3) la desnitrificación, que implica la reducción del nitrito (NO_2^-) a formas gaseosas de nitrógeno como el óxido nítrico (NO), el óxido nitroso (N_2O) y el N_2, (4) y anammox, que es un proceso realizado por bacterias quimiolitoautotróficas donde ciertas bacterias anaeróbicas utilizan amoníaco (NH_3) y nitrito (NO_2^-) para producir N_2. Ambos compuestos son convertidos mediante reacciones redox en hidroxilamina (NH_2OH), luego en hidrazina (N_2H_4) y finalmente en N_2. La acción concertada de estos procesos constituye los que se denomina ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 1), el cual es fundamental para mantener una concentración aproximadamente constante de todas las especies de nitrógeno en la atmósfera y en los suelos. Los componentes del ciclo del nitrógeno son utilizados como aceptores de electrones por diversas bacterias, arqueas y eucariotas.

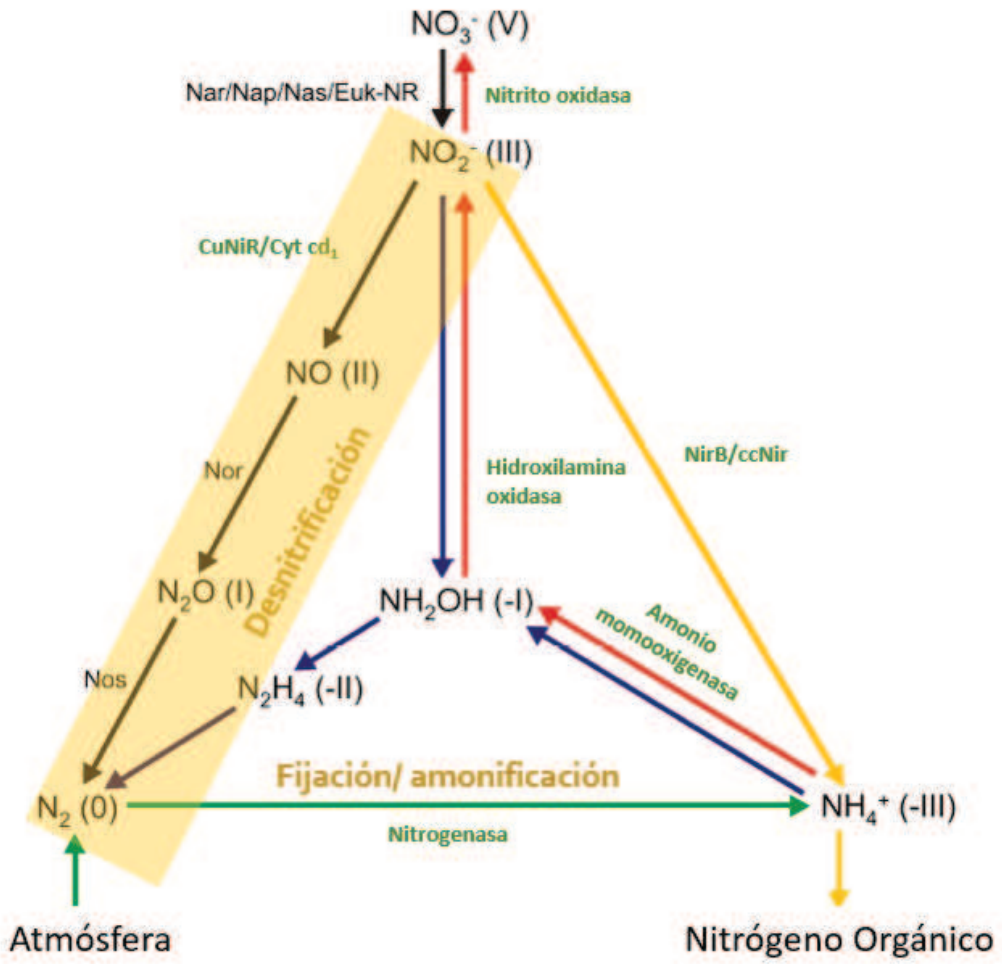


Figura 1. *Esquema simplificado del ciclo del nitrógeno realizado por bacterias*. Se incluyen las enzimas responsables de catalizar los diferentes pasos. La desnitrificación se indica con flechas marrones, la amonificación asimilatoria y disimilatoria con flechas amarillas, la fijación de N_2 con flecha verde, la nitrificación con flechas rojas y anammox con flechas azules. Figura modificada de González *et al.* (5).

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno es un proceso biofisicoquímico dinámico en el cual el nitrógeno experimenta cambios en sus estados de oxidación (de +5 a -3), lo que asegura la circulación y disponibilidad de este elemento esencial para la vida en el planeta Tierra. Este ciclo se regula por una compleja interacción entre la actividad de los microorganismos, la composición del suelo, las condiciones ambientales (como la disponibilidad de oxígeno) y la intervención humana, especialmente a través de la agricultura y el uso de fertilizantes nitrogenados (1–3). En la agricultura y el tratamiento de aguas residuales, el metabolismo del nitrógeno por microorganismos constituye un tema sumamente relevante relacionado con cuestiones económicas, emisiones de gases de efecto invernadero y salud pública.

1.2. La vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno

Como se mencionó previamente, la desnitrificación es el proceso anaeróbico que involucra la reducción del nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), y óxido nitroso (N_2O) a N_2. Este proceso se lleva a cabo principalmente por los sistemas enzimáticos presentes en bacterias que tienen la capacidad de utilizar compuestos nitrogenados en lugar de oxígeno molecular como aceptores finales de electrones para almacenar energía (4,6). La vía desnitrificante implica una cadena de reacciones enzimáticas que involucran distintos tipos de metaloenzimas presentes en bacterias desnitrificantes (Figura 2).

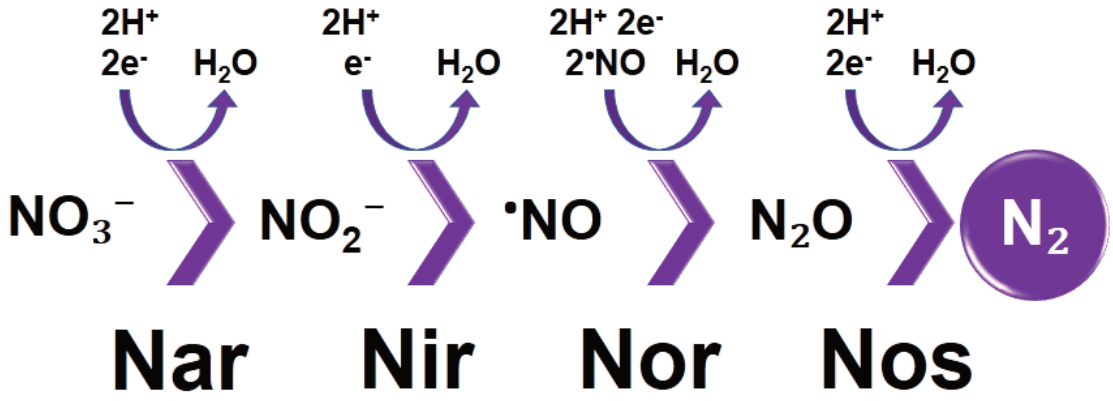


Figura 2. *Pasos enzimáticos secuenciales que conforman la vía desnitrificante en los que se indica la reacción redox de cada enzima*. Nar: nitrato reductasa, Nir: nitrito reductasa, Nor: óxido nítrico reductasa y Nos: óxido nitroso reductasa. Figura modificada de Merkle *et al.* (7).

El primer paso de la desnitrificación implica la reducción de nitrato a nitrito y es catalizado por la nitrato reductasa (Nar) una enzima heterotrimérica (NarGHI) asociada a membrana que contiene en su estructura un centro mononuclear de molibdeno, centros FeS y hemos tipo *b*. El segundo paso, reducción de nitrito a óxido nítrico, es catalizado por la nitrito reductasa (Nir). Esta enzima se puede presentar en dos tipos diferentes, las Nir de cobre (NirK) o las Nir de hierro (NirS). Una descripción más profunda de las propiedades cinéticas, espectroscópicas y estructurales de esta enzima será incluida en una sección posterior. La óxido nítrico reductasa (Nor) es responsable de catalizar la conversión de óxido nítrico a óxido nitroso. Existen dos tipos de Nor, cNor y qNor, siendo la más extensivamente estudiada la cNor. La cNor es una proteína transmembrana compuesta por dos subunidades, NorB y NorC. La subunidad menor, NorC, contiene un hemo *c*, que acepta electrones de un donante de electrones externo. NorB, contiene tres centros de hierro: dos hemos tipo *b* y un hierro no hemo (FeB). El hemo tipo *b* de bajo espín media la transferencia de electrones desde el hemo *c* en la subunidad NorC al centro catalítico binuclear que consiste en otro hemo tipo *b* (hemo b3) y FeB (8). Finalmente, la última de las cuatro enzimas necesarias para la

desnitrificación completa es la óxido nitroso reductasa (Nos), una enzima que cataliza la reducción de óxido nitroso a N_2. La enzima funcional, NosZ, es un homodímero con dos centros de Cu por monómero. Cada uno de los sitios catalíticos son de tipo CuZ y contienen cuatro átomos de Cu, ligados por siete residuos de histidina y un puente formado por átomo de azufre (9–11). La figura 2 muestra la reacción que cataliza cada una de estas enzimas.

1.3. ¿Cuál es el interés en estudiar las enzimas de la desnitrificación?

Las actividades antropogénicas provocaron un efecto profundo sobre la cantidad de nitrógeno biodisponible, siendo el uso de fertilizantes industriales a base de nitrógeno el principal causante de este problema. En la actualidad aproximadamente la mitad de la población depende de alimentos cuya producción implica el uso de estos fertilizantes. Un dato impactante es que el uso de fertilizantes en el cultivo de leguminosas prácticamente duplicó el aporte de nitrógeno a los ecosistemas terrestres y marinos. Para predecir las consecuencias de este aporte, es esencial entender los mecanismos fundamentales que están detrás de las transformaciones del nitrógeno por microorganismos (12,13).

El interés en estudiar las enzimas de la vía desnitrificante, así como las involucradas en las otras ramas del ciclo del nitrógeno, fue iniciado desde una perspectiva básica. Sin embargo, este tipo de investigaciones originó mayor interés en la comunidad científica debido al uso extensivo de las bacterias desnitrificantes como bioinoculantes en agricultura. Actualmente, resulta evidente que el uso de bioinoculantes formulados a partir de estas bacterias consiguió mejorar la disponibilidad de nitrógeno por las plantas, pero como efecto colateral produjo la exacerbación de la vía desnitrificante, lo que lleva a la acumulación en los suelos de compuestos como el nitrato e incrementa la liberación a la atmósfera de compuestos nitrogenados gaseosos. El nitrato es uno de los principales contaminantes de las aguas subterráneas y superficiales, y el óxido nitroso (N_2O) es el tercer gas en importancia que produce efecto invernadero. Además, este gas contribuye a la destrucción de la capa de ozono estratosférico, mientras que el óxido nítrico participa en la formación de ozono troposférico, un contaminante que afecta la salud humana y la calidad del aire (4,6,14–16). En resumen, estudiar estos procesos a nivel molecular tiene relevancia no solo en investigación básica, sino también en problemáticas relacionadas con medioambiente y salud humana.

1.4. Propiedades moleculares y espectroscópicas de las Nitrito Reductasas de cobre

Las nitrito reductasas catalizan el segundo paso del proceso de desnitrificación. Estas enzimas se dividen en dos grupos principales: enzimas que contienen un grupo hemo en su sitio activo (NirS, codificadas por el gen *nirS*) y enzimas que contienen cobre (NirK, codificadas por el gen *nirK*). En esta tesis discutiremos distintos aspectos fisicoquímicos de las NirK, enzimas desnitrificantes que presentan un elevado grado de homología en sus estructuras primarias (entre 70 y 80 %) (10) (Figura 3).

Se han reportado las estructuras cristalinas de varias NirK. La mayoría de ellas son homotrímeros con subunidades de ~40 kDa. Cada monómero está compuesto por dos dominios denominados I y II, que presentan a grandes rasgos características estructurales similares en todas las NirK (17–25). A lo largo de la tesis estas NirK serán identificadas como NirK de dos dominios para diferenciarlas de las NirK de tres dominios que se explicarán brevemente al final de esta sección. El dominio I contiene dos centros de cobre: uno de tipo 1 o azul y otro de tipo 2 o normal, los cuales serán identificados a lo largo del texto como T1 y T2, respectivamente. Los centros de cobre T1 y T2 funcionan como sitio de transferencia de electrones y sitio activo, respectivamente (Figura 4). En el T1 el Cu está coordinado con dos histidinas, una cisteína y una metionina en una geometría tetraédrica distorsionada. En el T2 el Cu está tetracoordinado por tres histidinas, una de las cuales pertenece al dominio II de una subunidad vecina y, en el estado *resting* de la enzima, por una molécula de agua como cuarto ligando (agua apical, W_{ap}). Los dos centros de Cu, que están separados por ~12,6 Å, están conectados por dos vías. La más corta es un puente Cys-His que actúa como camino de transferencia electrónica entre T1 y T2 (17,18,26). La vía más larga se denomina *sensing loop*. La potencial función de este camino es la de desencadenar la entrega de electrones desde el T1 al T2 a través del puente Cys-His cuando el nitrito se encuentra unido al sitio activo (27). Además de los ligandos de la primera esfera de coordinación de los dos centros de cobre, se han identificado otros residuos situados en esferas de coordinación más externas del T2 que son catalíticamente relevantes. Estos residuos serán identificados con el subíndice CAT para independizarnos de la numeración asignada en las distintas estructuras reportadas. Tres de estos residuos, Asp_{CAT}, His_{CAT} e Ile_{CAT}, son identificados en la Figura 4. El rol de estos residuos en la catálisis, el cual ha sido demostrado mediante el estudio de variantes de NirK obtenidas mediante mutagénesis sitio dirigida (21,28–30), será analizado a lo largo del texto en los casos que sea necesario. Un resumen de las propiedades moleculares y espectroscópicas de NirK de dos dominios es presentado en la tabla 1.

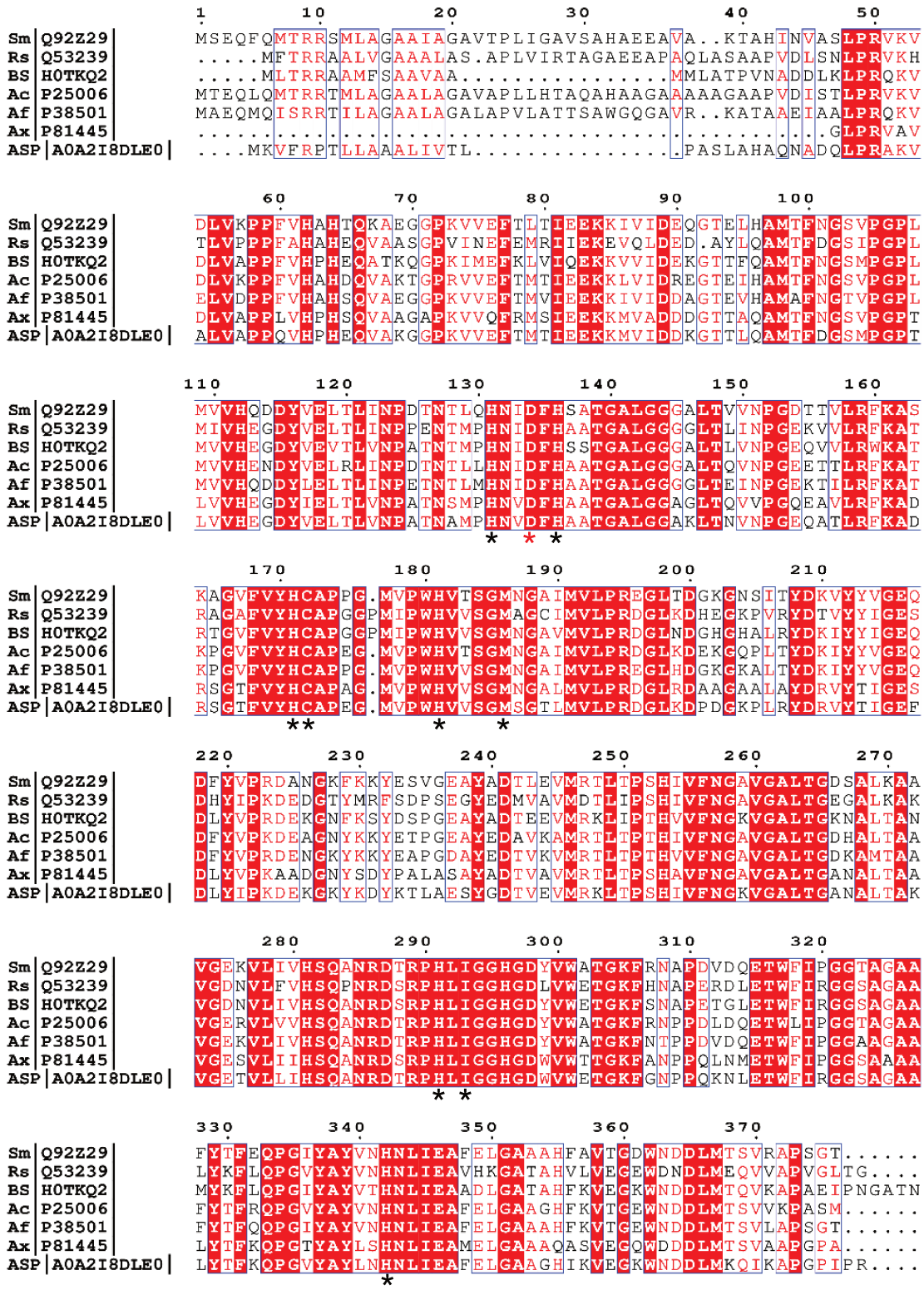


Figura 3. *Alineación de secuencias de enzimas NirK de dos dominios.* Los residuos involucrados en la catálisis de la reducción de nitrito están indicados con asteriscos (*). Código de colores: aminoácido blanco sobre fondo rojo, identidad estricta; aminoácido rojo, similitud; marco azul, similitud entre grupos. NirK de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (Sm|Q92Z29|), *Rhodobacter sphaeroides* (Rs|Q53239|), *Bradyrhizobium sp.* STM 3843 (BS|H0TKQ2|), *Achromobacter cycloclastes* (Ac|P25006|), *Alcaligenes faecalis* (Af|P38501|), *Alcaligenes xylosoxydans* (Ax|P81445|) y *Achromobacter sp.* AONIH1 (ASP|A0A2I8DLE0|).

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

Microorganismo	*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU1051	*Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015	*Bradyrhizobium japonicum*	*Pseudomonas aureofaciens*	*Rhodobacter spharoides 2.4.3*	*Achromobacter Cycloclastes IAM1013*	*Alcaligenes faecalis* S-6	*Sinorhizobium meliloti* 2011
NirK	*Axg*NirK	*Axn*NirK	*Bj*NirK	*Pa*NirK	*Rs*NirK	*Ac*NirK	*Af*NirK	*Sm*NirK
Código PBD	1NDT	2XWZ	8R8S, 8S0W	-	1ZV2	2NRD	2AFN	7P2F
Masa molecular de subunidad (kDa); conformación molecular	36; trímero	36.5; trímero	40, trímero	40	~46; trímero	36; trímero	37; trímero	42.5; trímero
λ (nm) de absorbancia en UV-vis	470, 603, 785	460, 593, 770	592, 458	474, 595, 780	390, 457, 589, 700, 810	400, 460, 589, 690	460, 590, 700	456, 586
Parámetros EPR g//, A// (mT) T1: T2:	2.22, 6.9 2.32,12.8	2.29, 6.4 2.41, 12.5	-	2.21, 6.36	2.19, 6.7 2.34, 12.5	2.19, 7.3 2.33, 13	2.19, 6.6	2.190, 5,8 2.304, 14
Potenciales formal de reducción E_0' vs NHE (mV), ~pH 7 T1, T2	+280 +250	+240 +230	+302	-	+247 +200	+240 +250	+260	+224 +108
Dadores electrónicos	Cyt 551	Axn Az I-II	-	*Pa*Az	-	*Ac*Paz	*Af*Paz	*Sm*Paz
pH de actividad máxima	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado	6	5.2	5.9	~5
Referencias	(18,31–34)	(35–39)	(40)	(41,42)	(43,44)	(31,45,46)	(20,47–50)	(51,52)

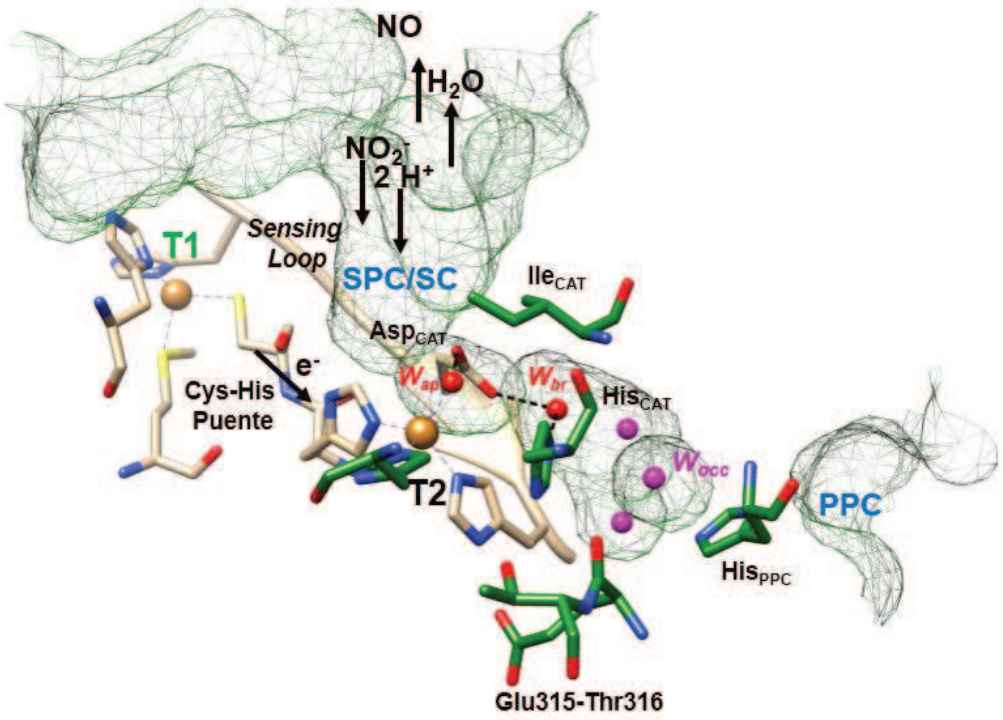


Figura 4. *Unidad funcional de la nitrito reductasa de dos dominios de tipo salvaje que contiene cobre de Sinorhizobium meliloti 2011 (SmNirK) (PDB ID: 7P2F) que identifica los residuos de dos monómeros adyacentes con diferentes colores.* SC, PPC y SPC son canal de sustrato, canal primario de protones y canal secundario de protones, respectivamente (del inglés: *substrate channel, primary proton channel y secondary proton channel)*.

De acuerdo a su color, las NirK se clasifican en verdes, azules o verde-azuladas (53). El color de las proteínas está determinado por las propiedades electrónicas del T1. La figura 5 (Panel A) muestra los espectros UV-vis de una proteína verde y otra verde-azulada con características espectroscópicas muy próximas a una azul. El T2 no tiene señal en el rango de longitudes de onda del UV-vis. En los espectros se indican las bandas de absorción características que identifican a cada proteína y el origen de cada una de las transiciones. En ciertas proteínas mononucleares de cobre, se pueden hallar centros T1 de un azul intenso. Los espectros UV-vis de estos centros muestran una fuerte banda de absorción a 600 nm (ε = 3-6 mM^{-1} cm^{-1}) (54,55).

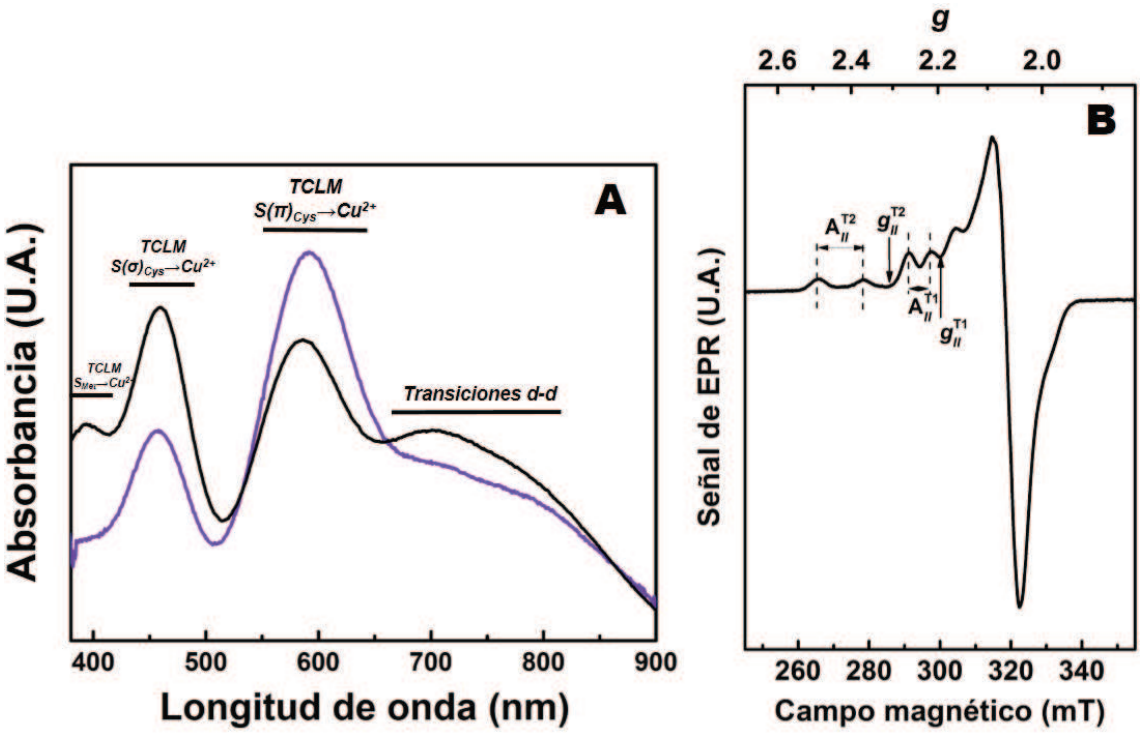


Figura 5. *Características espectroscópicas de dos tipos de NirK: verde y verde-azulada.* Panel A: Espectros UV-vis del sitio T1 de las enzimas *NirK de Bradyrizobium japonicum (Bj*NirK*, línea violeta) y Sinhorizobium meliloti* 2011 *(Sm*NirK, línea negra). Panel B: Espectro EPR obtenido de la enzima *Sm*NirK.

El hecho de que las NirK presenten dos sitios de cobre estructuralmente distintos hizo que la técnica de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del acrónimo en inglés) haya sido central en la caracterización de estas proteínas. La ventaja de EPR frente a UV-vis es que permite detectar los dos centros de cobre simultáneamente cuando los iones Cu se encuentran como Cu (II) (S=1/2, I=3/2). Un espectro de EPR típico obtenido en la *Sm*NirK se muestra en la figura 5 (Panel B), en el que se identifican los parámetros característicos asociados con los dos centros de cobre (51,56). El espectro de EPR del T1 y T2 muestra simetría axial o muy próxima a axial, lo que determina que los espectros pueden ser caracterizados mediante los parámetros $g_{//}$ y $g_{\perp}$ y $A_{//}$ (Figura 5). Si bien esta nomenclatura es solo válida para espectros con simetría axial, la misma también será utilizada en general para aquellos casos en que esta simetría no sea estrictamente axial. Como se observa en la figura, el espectro tiene valores de g característicos, pero la diferencia más notable es en el valor de $A_{//}$, el cual es mucho menor en el T1 debido al enlace Cu-S_{Cys} (57). Las dos técnicas, UV-vis y EPR serán extensivamente utilizadas en este trabajo.

Como se describió al comienzo de esta sección, la mayoría de las NirK presentes en la naturaleza corresponden a las NirK de dos dominios. Un grupo significativamente menor y también menos caracterizado corresponde a ciertas NirK que, además de los dominios

I y II, contienen un tercer dominio. Este tercer dominio contiene un cofactor redox extra que puede ser un sitio de Cu tipo 1, o un citocromo (22,58–60). En relación a los dominios I y II, las NirK de dos dominios no muestran en general diferencias significativas con las de tres dominios. No obstante, un aspecto puntual a nivel molecular es que la NirK de tres dominios de *Thermus scotoductus* SA-01 (*Ts*NirK) presenta en el dominio I un residuo de serina (Ser_{CAT}) en lugar del Asp_{CAT} (61). Este aspecto, que será explicado más detalladamente en la sección siguiente, fue uno de los problemas más importantes que originó esta tesis.

1.5. El mecanismo de reacción de las NirK

La reacción catalizada por las NirK implica la reducción del nitrito mediante la transferencia de un electrón acoplada a la de dos protones de acuerdo con la ecuación:

$$NO_2^- + 2H^+ + e^- \rightarrow NO_{(g)} + H_2O \qquad \textbf{(Ecuación 1)}$$

El electrón necesario para la reducción es provisto por un dador fisiológico (DF) que interactúa transitoriamente con la enzima. Los dadores fisiológicos de las NirK son pequeñas proteínas de cobre o citocromos c que transfieren un electrón al T1 y este al T2 con el nitrito unido de acuerdo al esquema DF→T1→T2 (Figura 6).

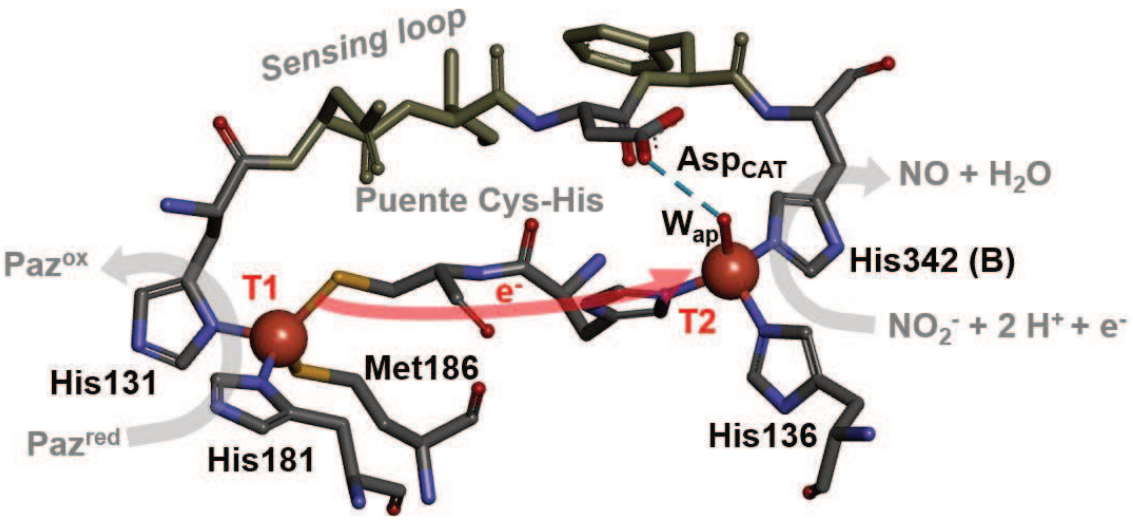


Figura 6. *Estructura simplificada del núcleo catalítico (T1-T2) de la SmNirK (PDB* 7P2F*) donde se esquematiza la reacción que cataliza.* El DF de electrones de la *Sm*NirK es una proteína mononuclear de cobre T1 conocida como Pseudoazurina (*Sm*Paz). En la figura se incluyen los centros de cobre T1 y T2 y la porción de la cadena polipeptídica involucrada en la transferencia electrónica T1-T2 (puente Cys-His). La flecha roja indica la dirección del flujo de electrones.

El mecanismo aceptado de reducción del nitrito comienza con la salida de la molécula de agua apical (W_{ap}) y la unión del nitrito al sitio de cobre en una conformación κ^2O,O'

(7,62,63). El nitrito ingresa al sitio activo a través del denominado canal de sustrato (SC, *substrate channel*), mientras que los protones consumidos por la reacción lo hacen a través de los canales de protones denominados PPC (*primary proton channel*) y SPC (*secondary proton channel*) (Figura 4). Este proceso ocurre de una manera más eficiente con el T2 en su forma oxidada, aunque la unión del nitrito puede ocurrir también con T2 en el estado Cu (I) (26,64,65). La unión del nitrito al T2 es lo que dispara la reacción de transferencia electrónica entre los centros T1→T2 a través del puente Cys-His mediante un mecanismo hipotético regulado por el *sensing loop*. El *sensing loop* es una secuencia específica dentro de la enzima que desempeña un papel crucial en la detección y unión del sustrato. Se postula que este polipéptido está involucrado en el reconocimiento y posicionamiento del sustrato en el proceso de reducción catalítica. La interacción entre el *sensing loop* y el sustrato es esencial para la actividad y eficiencia de la enzima. No obstante, hasta la fecha no existen evidencias experimentales sobre el mecanismo de acción del *sensing loop* y de qué manera este camino químico le comunicaría al T1 que el nitrito está unido al T2. La relevancia del Asp_{CAT}, un residuo que forma parte del *sensing loop*, en la catálisis está ampliamente demostrada mediante estudios de mutaciones sitio dirigida complementadas con estudios cinéticos, espectroscópicos y estructurales (28,29,33). Por ejemplo, la sustitución del Asp_{CAT} con alanina, ácido glutámico o asparagina resultó en variantes con una actividad muy baja (< 2 % con respecto a la actividad de la enzima de tipo salvaje). Estos estudios confirmaron además la importancia del Asp_{CAT} en la fijación del nitrito al T2 y sugirieron además un rol central en el transporte de los protones involucrados en la reacción (33). En este punto, es importante notar que el ligando Asp_{CAT} pertenece a la segunda esfera de coordinación del T2, lo que demuestra que este tipo de residuos juegan un rol muy significativo en el mecanismo catalítico de las NirK. De esta manera, es razonable hipotetizar que el cambio estructural obligado que sufre el Asp_{CAT} cuando la molécula de W_{ap} es reemplazada por el nitrito sea el medio electrónico que dispare la TE entre T1→T2. Como se mencionó previamente, existen suficientes evidencias experimentales sobre el rol del Asp_{CAT} en la catálisis. Si bien con resultados no concluyentes, está ampliamente aceptado que el Asp_{CAT} cumple un doble rol, por un lado, ayudando en el posicionamiento del nitrito en el T2 para su reducción y por otro, en ser el intermediario en el transporte de los protones involucrados en la reacción. También, el hecho de que este residuo está conservado en todas las NirK de dos dominos fue decisivo para inferir su relevancia catalítica. No obstante, como parte de la línea de investigación de NirKs desarrollada en nuestro grupo, se caracterizó una NirK de tres dominios en el que se encuentra un residuo de serina (Ser_{CAT}) en lugar del Asp_{CAT}. Este hecho originó numerosos interrogantes fundamentalmente, dado que la Ser_{CAT} contiene un grupo polar

no ionizable en su cadena lateral, y en principio, no podría estar involucrado en el transporte de protones. Este hallazgo llevó a formular uno de los interrogantes más importante de esta tesis: ¿puede un residuo polar no ionizable suplir la función del Asp_{CAT} en una NirK de dos dominios? Como se describió previamente, el Asp_{CAT} es un ligando de la segunda esfera de coordinación del T2 que, además de ayudar en la fijación del nitrito y en el transporte de protones, también participaría en el hipotético mecanismo propuesto para el *sensing loop*. Todos estos aspectos refuerzan además que los ligandos de la segunda esfera de coordinación del T2 no cumplen un rol secundario en el mecanismo catalítico, y abrieron interrogantes sobre cuál es el rol de los ligandos de esferas de coordinación más externas.

La TE intraproteína T1-T2 que ocurre en el mecanismo catalítico de las NirK es otro de los procesos fisicoquímicos mejor caracterizados experimentalmente, aunque no del todo entendido. Este proceso involucra dos centros de cobre separados por ~12.6 Å y se realiza a través del puente Cys-His, constituyendo lo que se denomina un proceso de TE mediado por un camino químico a través de distancias largas (17,18,26). La velocidad de TE (k) entre dos centros redox denominados dador (D) y aceptor (A) está determinada por la ecuación de Marcus (66–70).

$$k_{ET} = \frac{4\pi^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} H_{DA}^2 e^{\frac{(\Delta G^0+\lambda)^2}{4\lambda k_B T}} \qquad \textbf{(Ecuación 2)}$$

Donde h, k_B y T tienen el significado usual. ΔG^o es el gradiente termodinámico que determina la dirección del flujo de electrones. En el caso de la NirK $\Delta G^o = E_{T1}-E_{T2}$, donde E significa potencial de reducción y T1 y T2 son el D y A, respectivamente. Un gradiente favorable se obtendría con $E_{T1} < E_{T2}$. H^2_{DA} es la matriz de acoplamiento electrónico. Su valor está relacionado con la naturaleza del camino químico que une T1 y T2 y la distancia entre los centros, a mayor distancia menor H^2_{DA}. λ es la energía de reorganización.

Si bien está ampliamente comprobada la participación del puente Cys-His en la TE entre T1→T2 (63), estudios espectroelectroquímicos en las NirK mejor caracterizadas verificaron mediante mediciones experimentales que, en la mayoría de los casos, $E_{T1} > E_{T2}$ (no existen casos con $E_{T1} < E_{T2}$ y muy pocos presentan $E_{T1} \sim E_{T2}$) (71,72). Por lo tanto, la TE intraproteína es termodinámicamente desfavorable ya que se debería realizar en contra de un gradiente de potencial. En consecuencia, en lo que respecta a la dirección del flujo de electrones, la ocurrencia del proceso sería prácticamente improbable. En virtud de estos resultados, se hipotetizó que la unión del nitrito al T2 durante la catálisis es el factor que revertiría el proceso a la situación favorable $E_{T1} <$

E_{T2} (36,52). La evidencia experimental que sugiere más fuertemente esta posibilidad son estudios de EPR realizados en la NirK de *Pseudomonas chlororaphis* (*PcNirK*) (71), que mostraron que la reoxidación con nitrito de la NirK previamente reducida con ditionito revirtió el orden de los potenciales de reducción ($E_{T2} > E_{T1}$) en la situación final de equilibrio. Si bien estos resultados dan cierta plausibilidad a la hipótesis planteada, no existe una evidencia experimental en condiciones dinámicas que la justifique, ya que la medición de los potenciales de reducción de los centros T1 y T2 en condiciones catalíticas es fácticamente imposible de realizar. Nuestra aproximación a este problema en la tesis, que surgieron como continuación de una tesis anterior en el grupo (73), será la de evaluar potenciales de reducción de una variante de NirK en la que se verifica que la enzima en el estado *resting* presenta $E_{T1} < E_{T2}$.

Como se discutió previamente, los ligandos de la segunda esfera de coordinación del T2 cumplen un rol muy relevante tanto en el aspecto estructural como en la catálisis. Surge entonces la pregunta de ¿hasta qué esfera de coordinación pueden los residuos influir en las propiedades de la enzima? Hasta el momento, prácticamente no hay trabajos reportados que específicamente estudien el rol que cumplen los residuos de esferas de coordinación más externas a la segunda del T2, ni que evalúen si existe alguna relación de estos con el mecanismo catalítico. Esto probablemente se deba a que se supone que solo cumplen un rol de soporte en el andamio estructural de la proteína. Esta suposición está de alguna manera en contradicción con resultados previos de nuestro grupo, los cuales mostraron que un ligando como el Glu_{CAT} (E315), pese a su distancia relativamente larga al T2 (Figura 7), tiene una gran influencia en las propiedades redox del sitio activo (73). Estos resultados nos llevaron a cuestionar si los residuos pertenecientes a la tercera esfera de coordinación tienen algún tipo de influencia en la catálisis o si solo cumplen un rol estructural. Con respecto a este punto, se planteó como objetivo realizar una mutación puntual en la Lys305 (Glu_{CAT}, Figura 7) para luego evaluar si este cambio afecta las propiedades estructurales, espectroscópicas y cinéticas de esta enzima.

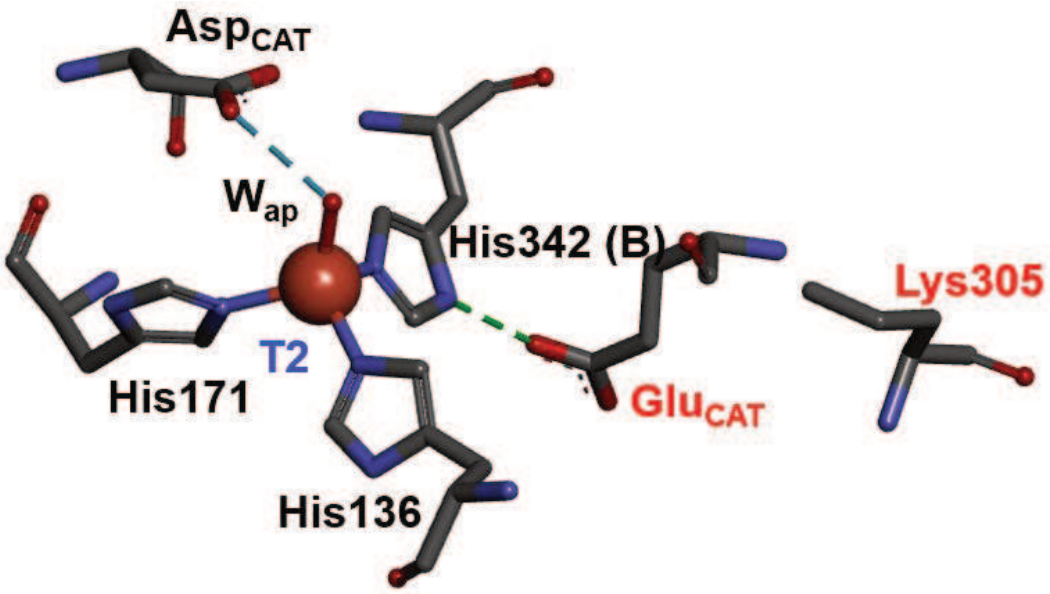


Figura 7. *Estructura del centro catalítico T2 de la SmNirK* (PDB 7P2F) incluyendo residuos de segunda y tercera esfera de coordinación del T2.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar a nivel molecular el rol que cumplen en la estabilidad estructural y en el mecanismo catalítico de la proteína los ligandos de la segunda y tercera esfera de coordinación del sitio activo de la enzima nitrito reductasa de cobre de la rizobacteria *Sinorizobium meliloti* 2011 (*Sm*NirK). El motivo de estudiar proteínas de rizobacterias está relacionado con su extensivo uso de este microorganismo como bioinoculante en agricultura y porque están fuertemente implicadas en la producción de gases de efecto invernadero.

2.2. Objetivos específicos

1. Generar mutaciones puntuales en el plásmido de expresión de la *Sm*NirK en los que se reemplace el aspártico en la posición 134 (Asp_{CAT}) por serina y la lisina 305 por metionina, mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida.
2. Producir y purificar a grado electroforético estas variantes de *Sm*NirK. En este objetivo también se incluye la producción y purificación de la enzima de tipo salvaje y su dador fisiológico de electrones mediante protocolos ya establecidos en el grupo para realizar estudios comparativos.
3. Evaluar como el pH afecta la estabilidad estructural de las variantes obtenidas en comparación con la enzima de tipo salvaje.
4. Caracterizar cinéticamente la enzima de tipo salvaje y las variantes para evaluar como la mutación modifica las propiedades catalíticas de la enzima de tipo salvaje *Sm*NirK.
5. Realizar la caracterización cinética de las variantes en el rango de pH 5.4 a pH 7.0 y comparar con la enzima de tipo salvaje para evaluar la influencia del pH en las propiedades catalíticas de las variantes.
6. Evaluar mediante las espectroscopias de UV-vis y de EPR las propiedades electrónicas de los centros metálicos en las variantes obtenidas.
7. Evaluar mediante titulaciones potenciométricas monitoreadas por espectroscopias UV-vis y EPR los potenciales de reducción de los centros metálicos y su influencia en la transferencia electrónica intraproteína.
8. Realizar cálculos computacionales del tipo QM/MM (del inglés *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) que permitan predecir los cambios estructurales inducidos por las mutaciones y las posibles consecuencias en el mecanismo catalítico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo de tesis se utilizaron técnicas estandarizadas en el laboratorio y, cuando fue necesario, se implementaron las adaptaciones pertinentes para lograr cumplir los objetivos planteados. Los resultados presentados fueron obtenidos de estudios realizados con las proteínas *Sm*Paz, *Sm*NirK en la forma salvaje y variantes (D134S y K305M).

3.1. Metodologías utilizadas para la obtención de las variantes de *Sm*NirK

La técnica de mutagénesis sitio dirigida fue empleada para preparar los vectores p22SK_D134S y p22SK_K305M, utilizados posteriormente para producir las variantes D134S y K305M, respectivamente. La mutagénesis sitio dirigida es una técnica precisa que permite introducir mutaciones puntuales en una secuencia de ADN. Los oligonucleótidos se hibridan a las cadenas simples del vector y las mutaciones deseadas se incorporan durante la elongación del ADN. El producto de PCR se trata con la enzima de restricción DpnI que reconoce y degrada el ADN de doble cadena que contiene bases metiladas características del ADN no mutado. El producto final es una muestra enriquecida con el vector que contiene la mutación.

Los reactivos y programas utilizados para las reacciones de amplificación en la preparación de los vectores p22SK_D134S y K305M fueron los mismos. La mezcla para amplificación se preparó usando 20 ng del vector p22SK (51), 10 pmol de cada cebador (Tabla 2), 2.5 unidades de ADN polimerasa TransTaq® HiFi (TransGen Biotech Co.), 1X de tampón de reacción II TransTaq® HiFi (TransGen Biotech Co.), 0.2 mM de dNTPs (Genbiotech) y 1X de GC Enhancer (TransGen Biotech Co.), en un volumen final de 50 µL.

El programa de PCR utilizado incluyó un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 30 s a 64 °C (hibridación), 7 min a 72 °C (elongación) y, finalmente, un ciclo a 72°C durante 5 min (elongación final).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en la mutagénesis sitio dirigida.

Variante	Secuencia (5'-3')	Oligonucleótido/Orientación
D134S	GCAGCACAATATCAGCTTCCACTCGG	*D134S-Fwd/Forward*
	CCGAGTGGAAGCTGATATTGTGCTGC	*D134S-Rev/Reverse*
K305M	GGCTACCGGCATGTTCCGCAATGC	*K305M-Fwd/Forward*
	GCATTGCGGAACATGCCGGTAGCC	*K305M-Rev/Reverse*

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit Puro Clean Up (PBL, Argentina) y eluido con 30 µL del tampón recomendado por el fabricante. La digestión del ADN no mutado se realizó incubando 10 µL del producto de PCR purificado con 5 unidades de DpnI, 1X tampón B y 2 µg de albúmina sérica bovina (kit de Promega) en un volumen final de 20 µL durante 2 h a 37 ºC. Posteriormente, un volumen de 7 µL de la reacción de digestión se usó para transformar células de *E. coli* DH5α supercompetentes.

Un total de 5 colonias individuales, por cada variante, se cultivó por separado en medio Luria-Bertani (LB), el ADN plasmídico de cada una de ellas se aisló utilizando el kit Puro Plásmido Miniprep (PBL, Argentina) y la secuencia se confirmó mediante secuenciación de ADN (Macrogene, https://dna.macrogen.com/). Los programas BLASTp (74) y ClustalW (75) fueron utilizados para el análisis y alineación de las secuencias. A partir de este procedimiento se obtuvieron los vectores de expresión: p22SK_D134S y p22SK_K305M.

En la tabla 3 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 3. Notación de los vectores de expresión usados para la producción de proteínas recombinantes.

Vector de expresión	Proteína codificante	*Locus tag*	Tamaño del inserto (pb)
p22SK (44)	Enzima de tipo salvaje	*SMa*1250	1131
p22SK-D134S	D134S	-	
p22SK-K305M	K305M	-	
p22SPaz (45)	*Sm*Paz	*SMa*1243	444

Para la amplificación y conservación de los plásmidos de las variantes y salvaje se utilizó la cepa de *E. coli* Top10 F' cuyo genotipo se detalla en la tabla 4. Además, en esta tabla se describe, además, el genotipo de la cepa BL21(DE3) utilizada para la expresión de las proteínas recombinantes. Aunque se utilizaron además otras cepas para optimizar la expresión de proteínas, el genotipo de las mismas no se incluyó en la tabla ya que finalmente no fueron utilizadas en la producción de las proteínas. El plásmido utilizado para el clonado y la expresión de las proteínas fue pET-22b(+) (Novagen). El mismo confiere resistencia a ampicilina al organismo transformado y permitió sobre expresar las proteínas recombinantes en forma soluble y activa.

Tabla 4. Características y usos de las cepas de E. coli utilizadas.

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

3.2. Obtención y transformación de células competentes

Para la preparación de células competentes, en primer lugar, se preparó el preinóculo dejando un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB inoculado con una colonia de células *E. coli* a 37 ºC y a 200 rpm en un agitador orbital durante toda la noche. Luego, 0.5 mL de preinóculo fueron utilizados para inocular 50 mL de medio SOB. El cultivo se dejó en agitación (200 rpm) a 37 ° hasta una DO_{600nm} (densidad óptica medida a 600 nm) de aproximadamente 0.4 a 0.6 U.A. Las células fueron posteriormente incubadas en hielo durante 10 min y centrifugadas a 4000 × g por 5 min a 4 ºC. El medio de cultivo se descartó y el pellet de células se resuspendió en 15 mL de tampón CMG (50 mM $CaCl_2$ + 50 mM $MgCl_2$) e incubó en hielo por 15 min. Las células se recolectaron mediante centrifugación en las mismas condiciones anteriores y se resuspendieron nuevamente en 3.6 mL de tampón CMG. La suspensión celular se incubó durante 5 min en hielo, se agregaron 126 µL de dimetilsulfóxido estéril (DMSO) y se incubaron 5 minutos más en hielo. La solución de CMG fue incubada en hielo previamente a su utilización. Se agregó nuevamente DMSO repitiendo el paso de incubación en hielo. Finalmente, se agregó 15 % de glicerol y la suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 200 µL en tubos eppendorfs que se almacenaron a -80 ºC hasta su uso.

La transformación de las células competentes se realizó incubando una de las alícuotas con 4 ng de ADN plasmídico en hielo durante aproximadamente una hora. Luego se efectuó un shock térmico incubando durante 40 segundos a 42 °C y posteriormente durante 3 min en hielo. El paso posterior incluyó la recuperación de las células para lo cual se adicionaron 100 µL de medio LB y se dejaron incubando durante 45 min a 37 °C. Finalmente, las células se plaquearon en medio LB-agar sólido suplementado con el antibiótico correspondiente y las placas se dejaron en estufa a 37 °C durante toda la noche de manera de obtener colonias aisladas.

Todo el proceso de preparación y transformación de células competentes se realizó en condiciones de esterilidad.

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

En la tabla 5 se detalla la composición de los dos medios de cultivo utilizados para el crecimiento de células, expresión de proteínas recombinantes en mayor escala y 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 bacteriológico en placas de Petri.

Tabla 5. Composición de los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de microorganismos.

Medio	Reactivos	Concentración (g/L)
LB	Peptona	10
	Extracto de levadura	5
	NaCl	5
	Agar bacteriológico (para medio sólido)	15
Salino-mínimo [76,77]	Na_2HPO_4	9
	KH_2PO_4	5
	NH_4Cl	5
	K_2HPO_4	19
	K_2SO_4	2.4
	$MgCl_2$[1]	1.12
	Glucosa[2]	10
	Solución de metales[3]	1X

Para un volumen de 1 L de medio se agregaron:
[1] 10 mL de una solución 100X $MgCl_2$ (0.112 g/mL).
[2] 20 mL de una solución 50X Glucosa (0.5 g/mL).
[3] 1 mL de una solución 1000X metales: 50 mM $FeCl_3$, 20 mM $CaCl_2$, 10 mM $MnCl_2$. 10 mM $ZnSO_4$, 2 mM $CoCl_2$, 2 mM $CuCl_2$, 2 mM $NiCl_2$, 2 mM Na_2MoO_4, 2 mM Na_2SeO_3, 2 mM H_3BO_3.

En el caso de la producción de la variante K305M el medio se suplementó con 20 mM glicerol, 500 mM NaCl y 300 µM $CuSO_4$.

3.4. Producción de biomasa y expresión de proteínas recombinantes

Para optimizar los protocolos de producción de biomasa y proteína, se probaron diferentes condiciones de trabajo en pequeña escala (100 mL). En estos ensayos preliminares se evaluaron distintas cepas de expresión de *E. coli* y suplementos (glicerol y $CuSO_4$ para K305M) e inductores (IPTG), así como también tiempo y temperatura de cultivo e inducción. Para la expresión de las diferentes proteínas se transformaron células *E. coli* BL21(DE3) con cada una de los vectores de expresión (Tabla 3). Los crecimientos se realizaron siempre en condiciones aeróbicas y se iniciaron a partir de la inoculación del medio de cultivo con un 2 % de preinóculo preparado como se indica en la sección 3.4.1. Todos los crecimientos se realizaron en presencia de los antibióticos correspondientes y se monitoreó el crecimiento celular midiendo la DO_{600nm}.

A continuación, se presentan los protocolos de cultivo celular y de expresión que permitieron obtener las proteínas solubles y en mayor cantidad.

3.4.1. Producción de *Sm*NirK salvaje y D134S

Inicialmente, células *E. coli* BL21(DE3) fueron transformadas con los vectores p22SK y p22SK_D134S, respectivamente. El preinóculo se preparó inoculando medio de cultivo LB con una sola colonia aislada e incubando durante toda la noche en un agitador orbital a 200 rpm y 37 ºC. El preinóculo se utilizó para inocular medio LB y las células se cultivaron a 200 rpm y 37 ºC. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} entre 0.4 y 0.6 se indujo la expresión de la proteína usando 0.05 mM IPTG durante 16 h (DO_{final}: entre 4.5 y 5.0), en agitación a 200 rpm y 25 °C. Se utilizaron erlenmeyers de 1 y 2 L con un volumen de medio de cultivo equivalente al 20 % de su volumen total y un agitador orbital con temperatura controlada. Tanto para la preparación del preinóculo como para la producción de biomasa se agregó ampicilina en una concentración final de 100 µg/mL.

3.4.2. Producción de K305M

Para la producción de esta variante se adoptó un protocolo que incluyó un paso de producción de biomasa en medio LB modificado seguido de un paso de expresión de proteína en medio salino-mínimo (76,77) adaptado (Tabla 5). Los detalles de este protocolo se describen a continuación.

El preinóculo se preparó siguiendo el protocolo indicado en la sección anterior con un medio de cultivo LB suplementado con 500 mM NaCl y 20 mM glicerol. La producción de biomasa se realizó inoculando el mismo medio de cultivo (LB modificado) utilizado para el preinóculo aunque suplementado con 100 µM $CuSO_4$. El crecimiento se realizó durante 6 h a 37 ºC en agitador orbital a 180 rpm alcanzándose una DO_{600nm} entre 0.8-1.0. La etapa de expresión de la variante se realizó mediante la recolección de las

células (centrifugación a 4500 × g durante 15 minutos utilizando una centrífuga Sorvall RC6+ (ThermusScientific)) y posterior resuspensión en medio salino-mínimo suplementado con 20 mM glicerol, 500 mM NaCl, 300 µM $CuSO_4$ y 0.5 mM de IPTG. Las condiciones de cultivo de esta etapa incluyeron un periodo de crecimiento 14-16 h a 25 °C y 100 rpm (DO_{final}: entre 3.0 y 4.0). Tanto para el caso de producción de biomasa como expresión de proteína el volumen del medio de cultivo representó el 10 % del volumen del erlenmeyer.

3.4.3. Producción de *Sm*Paz

El crecimiento de las células BL21(DE3) transformadas con p22SPaz se realizó en medio LB a 200 rpm y 37 ºC hasta DO_{600nm} de ~0.6 U.A. A partir de ese momento, se inició la inducción de la expresión de la proteína utilizando 0.25 mM de IPTG durante 4 h a temperatura ambiente, asegurando así la producción de proteínas en su forma soluble. Al inducir se suplementó el medio con 0.6 mM $CuSO_4$.

3.4.4. Obtención del extracto soluble

Una vez finalizadas las etapas de producción de biomasa y proteína, se procedió a la recolección de las células mediante centrifugación a 5000 × g durante 20 min y 4 ºC utilizando una centrífuga Sorvall RC6+ (ThermusScientific). Para eliminar el medio de cultivo remanente en el pellet, el mismo se resuspendió en tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.6 (suplementado con 20 mM glicerol en el caso de K305M), se centrifugó 20 min a 5000 × g y finalmente se resuspendió en el mismo tampón en una proporción de 1 g de células cada 3 mL tampón. La suspensión celular obtenida fue sometida a tres ciclos de congelamiento (-20 °C) y descongelamiento. Luego se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Roche, 1 mM) como inhibidor de proteasas y DNasa (GenBiotech, 10 µg/mL de suspensión celular). Posteriormente se aplicaron ciclos de 1 min a 40 % de amplitud utilizando un sonicador Vibra CellTM VC 750. El proceso de sonicado se realizó hasta lograr clarificar la suspensión celular. Durante todo este proceso las células se mantuvieron en baño de hielo para evitar la desnaturalización de proteínas. El extracto crudo así obtenido se centrifugó a 10000 × g durante 60 min. Posteriormente el sobrenadante (extracto soluble) se dializó en membrana de diálisis (MWCO: 3.5 kDa, Spectral/Por®) contra una solución conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 400 µM $CuSO_4$ a 4 ºC. Para el caso de la variante K305M se agregó además 20 mM glicerol. El tiempo de diálisis varió de acuerdo con la proteína estudiada, siendo de 16 h para la *Sm*Paz, *Sm*NirK de tipo salvaje y K305M y de 40 h para D134S (56). La diálisis de *Sm*Paz se hizo contra tampón 10 mM fosfato de potasio (KPB) pH 6.5 y 300 µM $CuSO_4$.

3.5. Purificación de proteínas

Todos los protocolos de purificación se realizaron mediante cromatografía líquida a 4 °C y pH 7.6, excepto indicado. El seguimiento de las proteínas y la evaluación del grado de pureza en las fracciones se llevaron a cabo mediante espectroscopia de absorción UV-vis y geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) de 12 o 15 % según la masa molecular de la proteína analizada.

3.5.1. Purificación de *Sm*NirK salvaje y *Sm*Paz

La purificación de la enzima *Sm*NirK salvaje y *Sm*Paz se realizó según los protocolos previamente publicados (51,52) incorporando un primer paso de purificación que incluyó una resina de intercambio aniónico débil (DE52 Whatman®) equilibrada con tampón 10 mM Tris-HCl y eluida con tampón 10 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl. La mayor parte de ambas proteínas eluyeron completamente en el lavado y no fue requerido gradiente salino. Este paso dio como resultado muestras con menor contenido lipídico lo cual aumenta la vida media de resinas menos robustas utilizadas en los siguientes pasos.

3.5.2. Purificación de D134S

La purificación de la enzima D134S se realizó mediante tres pasos cromatográficos. El primer paso incluyó una resina de intercambio aniónico débil (DE52, Whatman®) equilibrada con 10 mM Tris-HCl. Es importante mencionar que solo una pequeña porción de las proteínas interaccionó con la resina y que la mayor parte eluyó durante los pasos de inyección y lavado. La elución de la fracción que interacciona con la resina puede ser eluida con el tampón de equilibrado y 750 mM NaCl, sin embargo la misma no fue utilizada en los estudios presentados en este trabajo. La fracción que no interaccionó, fue inyectada en otra resina de intercambio aniónico débil (DEAE Sepharose Fast Flow, Cytiva). Se realizó un paso de lavado con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado para eliminar las proteínas que no interaccionaron con la resina y un gradiente lineal con 6 volúmenes de columna utilizando como tampón de elución 10 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl. Pudo observarse que la proteína comenzó a desplazarse cuando el gradiente alcanzó aproximadamente el 30 % del tampón de elución. Las fracciones que contenían la enzima se juntaron y la muestra obtenida se concentró en *diaflow* (Amicon, Millipore) provisto con una membrana de *cutoff* 5 kDa. Como último paso de purificación se utilizó una resina de exclusión por tamaño (Superdex 200 HR 10/30, Cytiva) equilibrada con 50 mM KPB y 150 mM NaCl. Las fracciones puras se agruparon, se dializaron contra tampón 10 mM Tris-HCl, se concentraron utilizando un *diaflow* y/o una unidad Centricon® (10.000 NMWL). Las proteínas puras se almacenaron a -80 ºC hasta su uso.

3.5.3. Purificación de K305M

La purificación de la variante K305M implicó dos pasos cromatográficos. Primeramente se utilizó una resina de intercambio iónico (DEAE Sepharose Fast Flow) equilibrada con tampón 10 mM Tris-HCl y 20 mM glicerol. Posterior a la inyección del extracto soluble se realizó un paso de lavado con tres volúmenes de columna con tampón de equilibrado y luego se realizó la elución con un gradiente lineal en 10 volúmenes de columna con tampón 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl y 20 mM glicerol. La variante K305M comenzó a desplazarse cuando el gradiente alcanzó aproximadamente el 20 % del tampón de elución. Las fracciones que contenían la enzima se concentraron en *diaflow* provisto con una membrana de *cutoff* 5 kDa. Como segundo paso se utilizó una cromatografía de filtración en gel (Superdex 75) equilibrada con tampón 50 mM KPB, 150 mM NaCl y 20 mM glicerol eluida isocráticamente. Finalmente, se hizo un pool con las fracciones puras, se dializó contra tampón 10 mM Tris-HCl y 20 mM glicerol y se concentró utilizando un *diaflow* y/o una unidad Centricon® (10.000 NMWL).

3.6. Caracterización bioquímica básica de la variante D134S

3.6.1. Determinación de la masa molecular aparente

La masa molecular de las proteínas fue determinada por cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 HR 10/30 (Cytiva) conectada a un AKTA Basic (GE Healthcare), equilibrada con 50 mM KPB y 150 mM NaCl (pH 7.6) a un caudal de 0.5 mL/min con detección a 280 nm. Se inyectó un volumen de 50 µL de D134S/K305M o estándares que representaban aproximadamente un 2 % del volumen de la columna. Los estándares utilizados fueron: catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), ribonucleasa A (13,7 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) de Cytiva.

Se utilizó SDS-PAGE según el método de Laemmli (78) para determinar la masa molecular aproximada de las subunidades de proteína. Las muestras se trataron con tampón de muestra 4X (40 % glicerol, 8 % p/v SDS, 2.8 M β-mercaptoetanol, 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 mM azul de bromofenol y agua destilada), se incubaron durante 10 min a 70 ºC y se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12 %. Los marcadores de masa molecular fueron adquiridos en Biorad (Precision plus protein all blue standards).

3.6.2. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteína se realizó usando los métodos colorimétricos Lowry/Biuret y Ácido Bicinconínico-BCA (Sigma) con albúmina sérica

bovina como estándar (BSA) (0-0.5 mg/mL) (79). La determinación se realizó siempre con un error menor al 10 %.

3.6.3. Determinación del contenido de cobre

La cuantificación de cobre se determinó por el método de 2,2'-Biquinolina, basado en la formación de un complejo entre Cu (I) y 2,2'-biquinolina en medio de ácido acético, utilizando una curva de calibrado realizada con una solución de $CuCl_2 \cdot H_2O$ como estándar (80,81) (rango de concentración 100-500 µM) midiendo a 562 nm.

3.7. Métodos espectroscópicos

3.7.1. Espectroscopia de absorción UV-vis

La espectroscopia 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_{600nm}.

Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente con un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu. Los espectros de absorción UV-vis de las muestras se realizaron en un rango de longitudes de onda de 200 a 1100 nm.

3.7.2. Espectroscopia de EPR

Las mediciones de EPR se realizaron en banda X (~9.5 GHz) en un espectrómetro Bruker EMX Plus equipado con una cavidad de alta sensibilidad (HSW10819 model) y un criostato de flujo de nitrógeno Bruker. Todas las muestras fueron preparadas en un tampón compuesto por MES, CAPS y Tris-HCl (tampón Mix, 30 mM cada uno) a pH requerido. Las muestras de proteína fueron preparadas a una concentración entre 200-300 µM. Los espectros fueron adquiridos en condiciones no saturantes con un campo de modulación de 100 kHz, una amplitud de modulación de 2 G y una potencia microonda de 2 mW a la temperatura de 120 K.

3.7.2.1. Simulación de espectros de EPR

La caja de herramientas EasySpin basada en MATLAB® (82) fue utilizada para realizar las simulaciones de los espectros asumiendo el Hamiltoniano de espín:

$$\widehat{H} = \mu_B \, \vec{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \vec{S} + \vec{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \vec{S} \qquad \textbf{(Ecuación 3)}$$

Donde el primer y segundo término son las interacciones Zeeman e hiperfina, respectivamente, μ_B, es el magnetón de Bohr, $\vec{B}$ es campo magnético externo aplicado,

$\vec{S}$ e $\vec{I}$ son el espín electrónico y nuclear del Cu^{2+} (S=1/2 I=3/2), respectivamente, **g** y **A** son matrices de dimensión 3×3.

En algunos casos los espectros son el resultado de la superposición de las señales de EPR de distintos centros metálicos. En estas situaciones las componentes espectrales fueron simuladas individualmente y normalizadas mediante doble integración. Este procedimiento permitió calcular la proporción de cada componente espectral en el espectro resultante.

3.8. Ensayos de reducción controlada y reacción con sustrato monitoreadas por EPR

La reducción controlada y consiguiente reacción con sustrato monitoreada por EPR se realizó bajo atmósfera de argón. Para los ensayos de EPR se utilizaron 200 µL de muestra concentrada a ~200 µM (proteína monomérica) en tampón Mix (pH 7.0 o pH 10.0) y las soluciones de reductores (ácido ascórbico y ditionito de sodio) y sustrato se prepararon en 100 mM Tris-HCl (pH 7.6). Se utilizaron soluciones de ácido ascórbico, ditionito de sodio y nitrito de sodio en un rango de concentraciones de 120 a 250 mM según requerimiento. De forma de asegurar las condiciones de anaerobiosis, la adición de reductores y sustrato a las soluciones de proteínas fue realizada utilizando jeringas *gas-tight* Hamilton y homogeneizando suavemente. La reducción de las enzimas se realizó mediante la adición sucesiva de ditionito sódico hasta que desapareció la banda T1 UV-vis a 457 nm o las señales T1 y T2 EPR. Seguidamente, las muestras se reaccionaron con un exceso de nitrito sódico (relación nitrito:ditionito de 5:1). Una vez terminado este proceso, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas hasta su medición.

3.9. Ensayos de actividad enzimática de la variante D134S

3.9.1. Método cinético discontinuo

La actividad enzimática en las fracciones provenientes de la purificación fue evaluada utilizando metil viológeno (MV) como dador electrónico artificial. Para el ensayo se preparó una pre-mezcla con tampón 500 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.8 mg/mL metil viológeno y 1 mM $NaNO_2$ en un volumen final de 150 µL. Posteriormente, se agregaron 50 µL de solución conteniendo enzima y 50 µL de 0.8 % p/v ditionito, y se incubó 20 min a 37 °C. Luego se agitó en vortex para oxidar el MV reducido y detener reacción. A continuación, se agregaron 250 µL de 1 % (p/v) sulfanilamida preparada en 3 M HCl, la solución se

homogeneizó y por último se agregaron 250 µL de 10 % (p/v) N-naftil-etilendiamina (NEDA). Se agitó en vortex y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (83,84). Este método permitió comprobar que las variantes eran catalíticamente activa.

3.9.2. Método cinético continuo

Se utilizó el método continuo de estado estacionario descripto previamente en la referencia (52) para realizar ensayos de actividad enzimática utilizando *Sm*Paz como donante de electrones. La oxidación de *Sm*Paz reducida se monitoreó mediante espectroscopia UV-vis a 597 nm utilizando un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu. Las reacciones se realizaron en tampón Mix (intervalo de pH 5.4 a pH 7.0) en presencia de la enzima y nitrito en un volumen final de 1050 uL.

En primer lugar, se preparó una mezcla de reacción conteniendo 25 nM enzima, concentraciones variables de nitrito (entre 1 mM y 0.05 mM) y 20 µM *Sm*Paz. Posteriormente, la *Sm*Paz se redujo completamente con una solución de ditionito de sodio (0.01 g/mL preparada en 100 mM Tris-HCl pH 7.6) y finalmente se inició la reacción cinética mediante la adición de una solución de nitrito (preparada en 10 mM Tris-HCl, pH 7.6) con jeringa *gas-tight* Hamilton (52). Todas las soluciones de reactivos fueron burbujeadas con argón antes de su uso para minimizar la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción.

Los valores de k_{cat} y K_m se calcularon a partir de las gráficas de Michaelis-Menten variando la concentración de nitrito (0-1000 µM) o donante de electrones (6-40 µM). Los ensayos se realizaron por triplicado y en cada experimento se incluyeron controles sin enzima agregada.

3.10. Estudio de estabilidad de la variante D134S

En la técnica de fluorescencia diferencial de barrido o DSF (del inglés, "*Differential Scanning Fluorimetry*") se incrementa gradualmente la temperatura lo cual hace que la proteína en estudio se despliegue exponiendo las zonas hidrofóbicas. Estas zonas interaccionan con un fluoróforo externo y el mismo incrementa su fluorescencia (85). Si bien varios fluoróforos pueden ser empleados, el SYPRO Orange (utilizado en este trabajo) tiene mejores propiedades por su alta relación señal-ruido y además porque la longitud de onda de excitación (492 nm) disminuye la probabilidad de que las moléculas pequeñas presentes puedan interferir con las propiedades ópticas del mismo. Otra de las ventajas de esta técnica es que permite realizar múltiples ensayos al mismo tiempo posibilitando evaluar varias condiciones a la vez en un tiempo reducido y utilizando bajas cantidades de proteína. El parámetro que se determina en este estudio es la

temperatura de desnaturalización (T_m), definida como la temperatura a la cual la mitad de la población de proteínas está plegada y la otra mitad desplegada.

Los ensayos se realizaron utilizando un equipo Step One Real-Time PCR System™ (Applied Biosystems) programado con un incremento de temperatura de 1 °C y un rango de 25 a 95 °C. Previo a las reacciones para determinar T_m, se realizaron ensayos de optimización para determinar la relación proteína/fluoróforo más favorable. El rango de concentraciones evaluadas fue de 2 a 20 µM proteína y de 1 a 20X SYPRO Orange (Sigma-Aldrich) en tampón Mix a pH 6.0. Una vez establecida esta relación, las reacciones para determinación de T_m se hicieron en un volumen final de 20 µL usando tiras de 8 tubos de PCR que contenían 20 µM de proteína recombinante (*Sm*NirK de tipo salvaje o D134S), 5X solución SYPRO y tampón Mix (intervalo de pH 5.4 a pH 8.0) (86,87).

Se estudió además el efecto de aditivos que actúan como estabilizadores para lo cual se agregó glicerol (10 %) o etilenglicol (200 mg/mL).

La temperatura de desnaturalización (T_m) se calculó mediante el ajuste no lineal (ecuación 4) de los datos de fluorescencia truncados (sólo los datos de la zona sigmoidal de la curva). El modelo aplicado fue el de Boltzmann provisto en el software Origin. Los resultados son la media de al menos nueve réplicas (87).

$$y = \frac{inferior + (superior - inferior)}{[1 + exp(T_m - x/pendiente)]} \qquad \textbf{(Ecuación 4)}$$

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 (87).

3.11. Titulación potenciométrica de *Sm*NirK salvaje y variante D134S

Con el objetivo de evaluar si la mutación puntual generada modificaba el potencial de reducción de la enzima, se realizaron titulaciones potenciométricas a dos valores de pH monitoreadas con las técnicas de UV-vis y EPR en una cubeta o recipiente de cuarzo con agitación constante, en condiciones anaeróbicas proporcionadas por una línea de tipo Schlenk y a temperatura ambiente. El potencial electroquímico de la solución se midió utilizando un electrodo combinado de platino-plata/cloruro de plata calibrado con una solución saturada de quinhidrona (pH 7.0 y pH 4.0) a temperatura ambiente (~25 ºC).

La titulación UV-vis se utilizó para evaluar el potencial de reducción (E_m) del centro T1. La misma se realizó en una mezcla de reacción de volumen final de 1500 µL que contenía ~150 µM de enzima (*Sm*NirK salvaje o D134S), 30 mM de tampón Mix (pH 7.0 o pH 8.0) y mediadores en una concentración final de 0.5 µM (ferricianuro potásico -436 mV-) y 1 µM (duroquinona -5 mV-, metasulfato de fenazina -80 mV-, y 2,5-dimetil benzoquinona -180 mV-). Para las titulaciones a pH 7.0 se adicionó además 10 % de glicerol. Como agente reductor se utilizó una solución de ditionito sódico (50 mg/mL preparado en 100 mM Tris-HCl pH 7.6). Los datos ópticos se recogieron con un espectrofotómetro UV-vis de matriz de diodos (Agilent Cary 8454 de Agilent Technologies) a 585 nm para la enzima de tipo salvaje y 580 nm para la variante D134S.

Con el objetivo de evaluar el potencial de reducción de ambos centros, se utilizó la técnica de EPR. Para las titulaciones por EPR, la solución de enzima (150 µM) se incubó con el mismo tampón Mix y mediadores utilizados en el ensayo por UV-vis en un volumen final de 4 mL. El potencial electroquímico se redujo utilizando una solución de ditionito sódico de 50 mg/mL. Una vez que se alcanzó el equilibrio a diferentes valores de potenciales, se tomaron muestras de 200 µL, se introdujeron en tubos de EPR y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para luego medirse por espectroscopia de EPR (ver condiciones en 3.7.2.). Los valores de los potenciales de reducción se expresaron en relación con el potencial del electrodo de hidrógeno estándar. Tanto la valoración UV-vis como la EPR se realizaron por duplicado.

Teniendo en cuenta el balance de masa, $Cu_{total} = Cu_{ox} + Cu_{red}$, y la ecuación de Nernst (Ecuación 5), se graficó la relación de concentraciones $\frac{Cu_{ox}}{Cu_{total}}$ en función de los potenciales de reducción obtenidos a cada pH. Cada conjunto de datos fue ajustado por mínimos cuadrados a la ecuación 6 y el potencial de reducción fue obtenido a partir del parámetro E_m de la función utilizada para el ajuste.

$$E = E_{m,pH} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{Cu_{ox}}{Cu_{total}} \qquad \textbf{(Ecuación 5)}$$

Donde "*E*" corresponde al potencial de reducción, "$E_{m,pH}$" al potencial de reducción medio en una condición de pH dada, "*R*" es la constante de los gases universal, "*T*" es la temperatura en Kelvin, "n" es el número de electrones que intervienen en la reacción, "*F*" es la constante de Faraday y "Cu_{ox}" y "Cu_{total}" son las concentraciones de cobre oxidado y total, respectivamente.

$$\frac{Cu_{ox}}{Cu_{total}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{nF}{RT}(E_m - E)}} \qquad \textbf{(Ecuación 6)}$$

Cabe aclarar que en las titulaciones por UV-vis se mide el valor de la absorbancia a una longitud de onda característica del T1, siendo este valor proporcional a la concentración de Cu_{ox}. En el caso de las titulaciones por EPR, la contribución de T1 y T2 se determina mediante la integración del área bajo la curva correspondiente a cada señal simulada, siendo el área resultante proporcional a la concentración de Cu_{ox}.

3.12. Métodos computacionales

La estructura inicial de D134S se creó utilizando la estructura de *Sm*NirK de tipo salvaje (PDB ID: 7P2F) como plantilla, como se informó en un trabajo previo (88). Se agregaron átomos de hidrógeno a los residuos titulables correspondientes a pH 7.0. Luego, la estructura se solvató con una capa de 6 Å alrededor de los residuos superficiales de las moléculas de agua y el sistema se neutralizó con 9 iones Na^+. Se realizó una breve simulación de dinámica molecular (10 ns) para relajar los átomos de hidrógeno y las moléculas de agua de solvatación, manteniendo fijos los átomos de la cadena principal de todos los residuos. Los cálculos combinados de QM/MM se realizaron utilizando el código Gaussian 09 (89). Para la parte QM, se utilizó el funcional WB97XD polarizado por espín, que incluye correcciones empíricas de dispersión átomo-átomo (90). La parte MM se manejó con el campo de fuerza clásico de Amber (91).

La base establecida para los átomos en la parte QM fue 6-31 G(d,p). Para la parte QM, se trataron los residuos His136, His171, $Ser134_{CAT}$ ($Asp134_{CAT}$) del monómero A e $His342$, $His291_{CAT}$ e Ile293 del monómero C, que son los ligandos de la segunda esfera de T2. His181, Cys172, His131 y Met186 del monómero A son ligandos del átomo de Cu en T1. Además, se consideraron los residuos de la segunda esfera Ile133, Ala173 (del monómero A) y tres moléculas de agua (ocluidas) etiquetadas como 1200, 584, 619. Para modelar el estado resting de la proteína, también se incluyeron en la parte QM una molécula de agua (W_{ap}, H_2O_503) coordinada en T2, y una molécula de agua (W_{br}, H_2O_578) que une la His_{CAT} y Ser_{CAT} o Asp_{CAT}. Se consideró que His_{CAT} estaba protonada y desprotonada en $N_{\delta1}$ y $N_{\varepsilon2}$, mientras que el Asp_{CAT} estaba desprotonado como se sugirió en otros trabajos publicados (53,64). Para estudiar la ligación del nitrito a T2, se agregó una molécula de NO_2^- que reemplazó a la molécula de W_{ap} en la parte QM. La estructura se optimizó con los residuos de QM libres para relajarse mientras se mantenían fijos los átomos tratados con MM. El resto de los residuos se trataron en el nivel MM de la teoría.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Influencia de residuos de la segunda esfera de coordinación del T2 en las propiedades moleculares y espectroscópicas de la enzima. Variante D134S

4.1.1. Optimización de la producción y aislamiento de la variante

Una vez confirmada la mutación por secuenciación de los clones, se realizaron pruebas de expresión utilizando *E. coli* BL21(DE3) como huésped. Las diferentes condiciones testeadas para la optimización incluyeron variación de la concentración de IPTG (0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM) y tiempo de inducción (1, 2, 3 y 16h). De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 8, se eligió una concentración de 0.5 mM de IPTG y un tiempo de inducción de 16 h. Estas condiciones resultaron en un rendimiento de aproximadamente 9 g de células/L de cultivo.

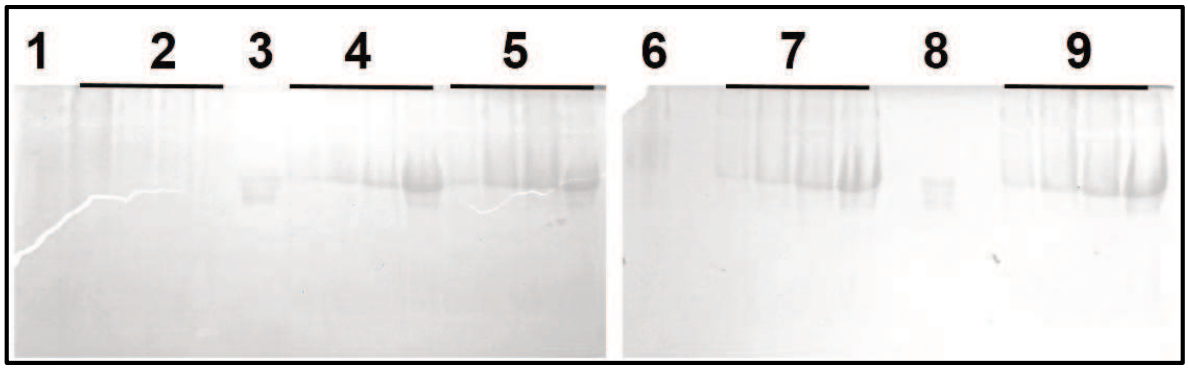


Figura 8. *Optimización D134S evaluado mediante SDS-PAGE*. Muestra *Sm*NirK de tipo salvaje usada como marcador (3 y 8), extracto total de células antes de inducir (1 y 6), con 0 mM (2), 0.05 mM (4), 0.1 mM (5), 0.5 mM (7) y 1.0 mM (9) de IPTG. Las cuatro calles corresponden a la inducción con diferentes tiempos de inducción (1, 2, 3, y 16 h de izquierda a derecha).

El siguiente objetivo fue evaluar si en estas condiciones la variante se expresaba de forma soluble e incorporaba cobre en el T1 y T2. Los resultados mostraron que, si bien la variante se encontraba en el extracto soluble, la cantidad de cobre incorporado no era la esperada. Para revertir esta situación se probaron dos protocolos. En el primero, se agregó una solución de $CuSO_4$ tanto durante el cultivo como en el proceso de sonicado y diálisis del extracto soluble. En el segundo, el cobre fue agregado solo durante la diálisis del extracto soluble.

En los dos extractos solubles obtenidos se evaluó si la variante era activa. La figura 9 muestra el resultado de ensayos de actividad utilizando un método rápido con MV como dador electrónico artificial. De acuerdo con lo observado se pudo comprobar que ambos protocolos dan como resultado una variante catalíticamente activa.

Figura 9. *Ensayos de actividad en extracto soluble.* Los tubos muestran el resultado de ensayos (1) sin enzima como control negativo, (2) con enzima *Sm*NirK de tipo salvaje como control positivo, (3) con extracto soluble del protocolo incorporando $CuSO_4$ en el medio de cultivo y sonicado y (4) con extracto soluble incorporando $CuSO_4$ únicamente después de la diálisis.

El segundo protocolo fue elegido para la producción de la variante ya que se observó una mayor incorporación de cobre en ambos centros. Es importante mencionar que, a diferencia de la proteína salvaje, la incorporación de cobre en la variante fue un proceso más extenso (40 h) y requirió de un paso de centrifugación a las 16 h de diálisis para eliminar proteínas precipitadas. Durante el proceso de diálisis se observó una evolución del color desde amarillo amarronado a un color verde característico de estas proteínas. La dificultad en la incorporación de cobre será discutida más profundamente en secciones posteriores.

Al momento de definir los pasos de purificación, se evaluaron distintos tipos de resinas hasta llegar al protocolo descripto en la sección 3.5.2 que dio como resultado un rendimiento de aproximadamente 60 mg de enzima/L de cultivo. El grado de pureza a lo largo de todo el proceso se muestra en la figura 10.

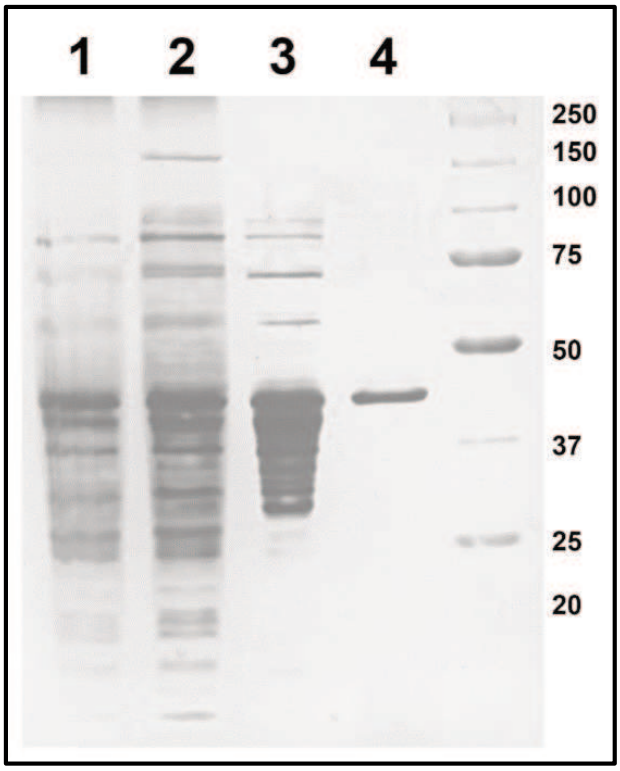


Figura 10. *SDS-PAGE (12%)* de extracto soluble (1), fracción obtenida después de DE52 (2), DEAE Sepharose FF (3) y Superdex 200 (4). Los marcadores de masa molecular se indican en kDa, fueron obtenidos de BIO-RAD (Precision plus protein all blue standards).

4.1.2. Propiedades moleculares

La variante D134S, al igual que la enzima *Sm*NirK salvaje mostró un color verde intenso (cuadro a la izquierda dentro de la Figura 11).

Mediante SDS-PAGE (Figura 10) se observó una banda correspondiente a un monómero de masa molecular de ~40 kDa como en la enzima de tipo salvaje. Por otro lado, la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño mostró un único pico de masa molecular aparente de ~125 kDa (Figura 11). La sustitución del ácido aspártico por serina sugiere un estado oligomérico preservado de *Sm*NirK.

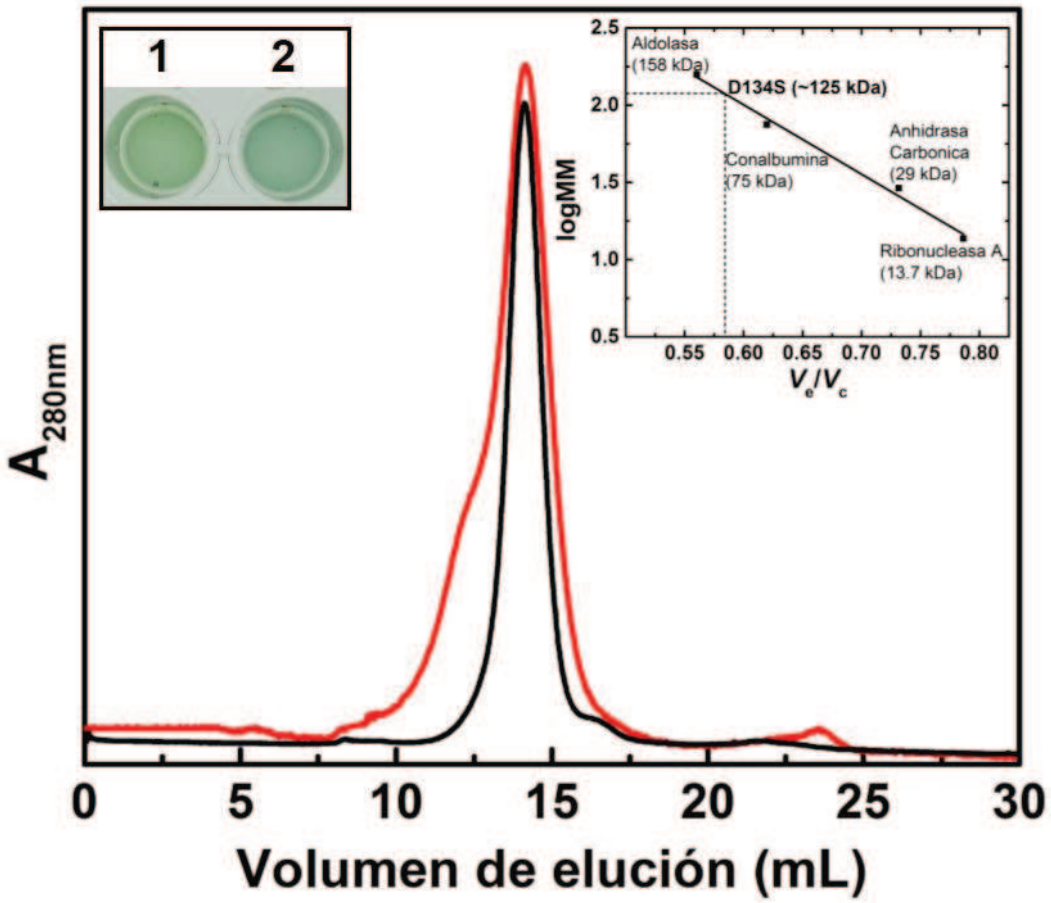


Figura 11. *Cromatografía de exclusión molecular para determinación de masa molecular aparente de D134S (línea roja) y forma salvaje (línea negra) de SmNirK.* En el cuadro de la izquierda se incluye una fotografía de la variante (1) y la forma salvaje de la enzima (2) en solución. En el cuadro de la derecha se incluye la curva de calibrado utilizada para determinar la masa molecular aparente de la variante.

El contenido de cobre por monómero de proteína fue de 1.6 ± 0.1. La menor ocupación de cobre, obtenida tras las 24 h adicionales de diálisis necesarias en comparación a la *Sm*NirK de tipo salvaje (con 12 h de diálisis se incorporan ~2 Cu/monómero) (56), indica que la sustitución del ácido aspártico por serina dificulta la incorporación de cobre.

4.1.3. Estudio de la estabilidad de la variante D134S

4.1.3.1. Determinación de las concentraciones de proteína y fluoróforo óptimas

La estabilidad de la variante D134S se estudió mediante la técnica de DSF evaluando los cambios en la estructura mediante la exposición a un aumento de temperatura. Como se dijo previamente, esta técnica tiene como ventajas importantes la baja complejidad en la preparación del experimento y la posibilidad de evaluar y procesar

varias condiciones al mismo tiempo incluyendo, en el mismo ensayo, la cantidad de réplicas que se considere necesaria.

El primer paso realizado fue optimizar la concentración de proteína y flouróforo de forma de tener la mejor señal para determinar los valores de T_m. En estos ensayos se trabajó a diferentes concentraciones de proteína y SYPRO Orange a pH 6.0. La figura 12 muestra los termogramas para todas las condiciones evaluadas. De acuerdo a lo observado, la condición 20 µM proteína y 5X SYPRO Orange fue considerada como aceptable y, por lo tanto, seleccionada para realizar todos los estudios posteriores.

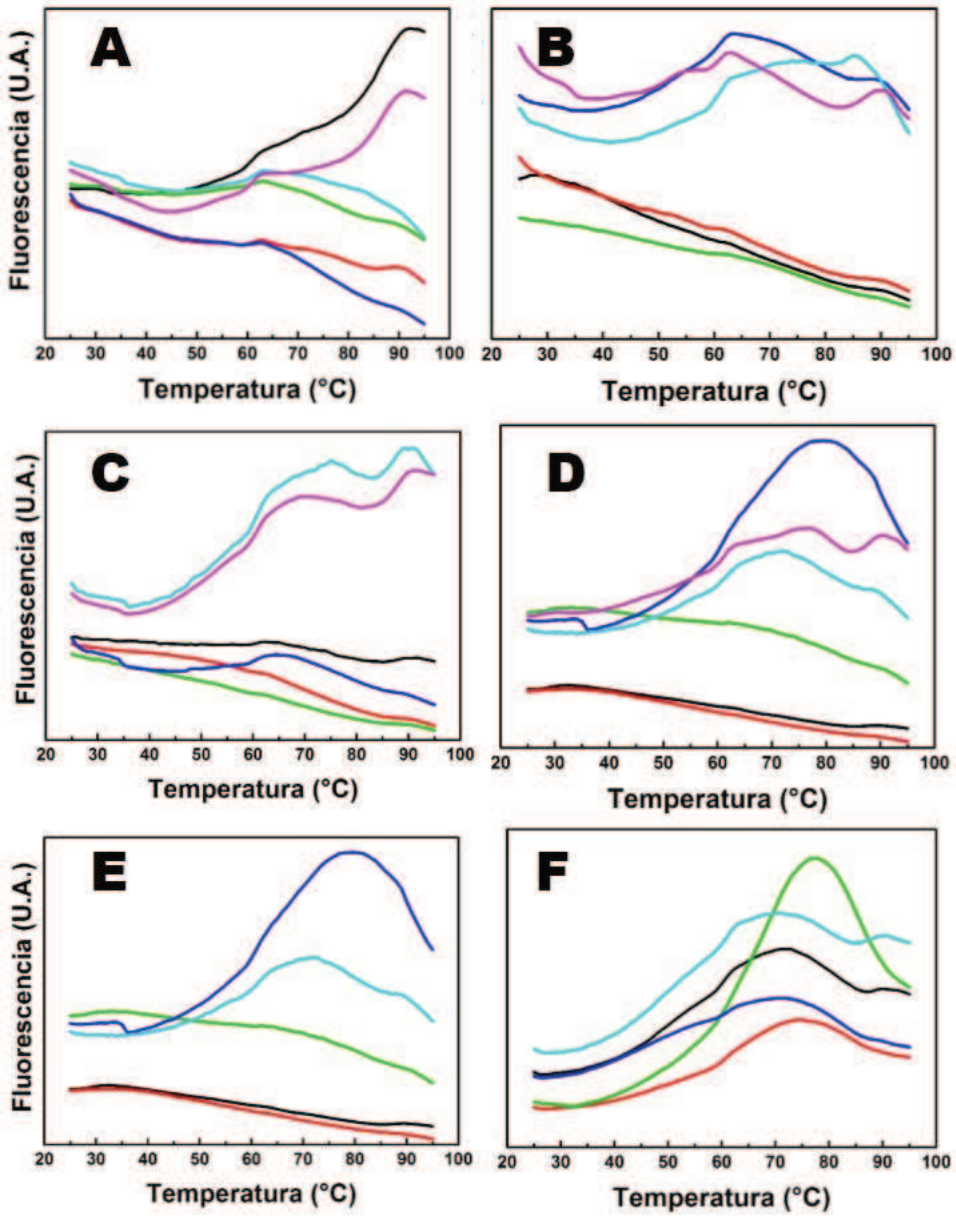


Figura 12. *Optimización de la concentración de proteína y SYPRO Orange para determinar las condiciones a utilizar en los ensayos de estabilidad.* Las concentraciones de enzima evaluadas fueron A) 2.5 µM, B) 5 µM, C) 7.5 µM, D) 10 µM, E) 12 µM y F) 20 µM. Las concentraciones de SYPRO Orange utilizadas fueron 0.5X (línea negra), 1X (línea roja), 2X (línea verde), 4X (línea azul), 6X (línea cyan) y 10X (línea magenta). Todos los ensayos se hicieron en tampón Mix pH 6.0.

4.1.3.2. Influencia del pH en la estabilidad térmica

Trabajos publicados previamente (73) sugieren que la protonación/desprotonación de residuos claves involucrados en la catálisis afecta la actividad enzimática. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto que tiene la variación del pH en la estabilidad de la variante y compararlo con los datos obtenidos con la enzima de tipo salvaje.

La figura 13 muestra la variación de T_m en un rango de pH de 5.4 a 8.0 para la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y la variante D134S (círculos rojos). De acuerdo con lo observado, se evidencia una tendencia de disminución de T_m con el aumento del pH, para ambas formas de la *Sm*NirK en el rango estudiado. Este resultado indica que la enzima podría ser más estable en condiciones de pH más bajas. La figura 14 muestra los termogramas realizados en los dos puntos de pH extremos (5.4 y 8.0) para mayor claridad. La menor estabilidad observada a mayores valores de pH está muy probablemente asociada a la alteración de la red de puentes de hidrógeno observadas en la estructura cristalográfica de la enzima (23). Los resultados obtenidos en esta sección están de acuerdo con estudios de actividad enzimática en función del pH presentado en la sección 4.1.5.2.

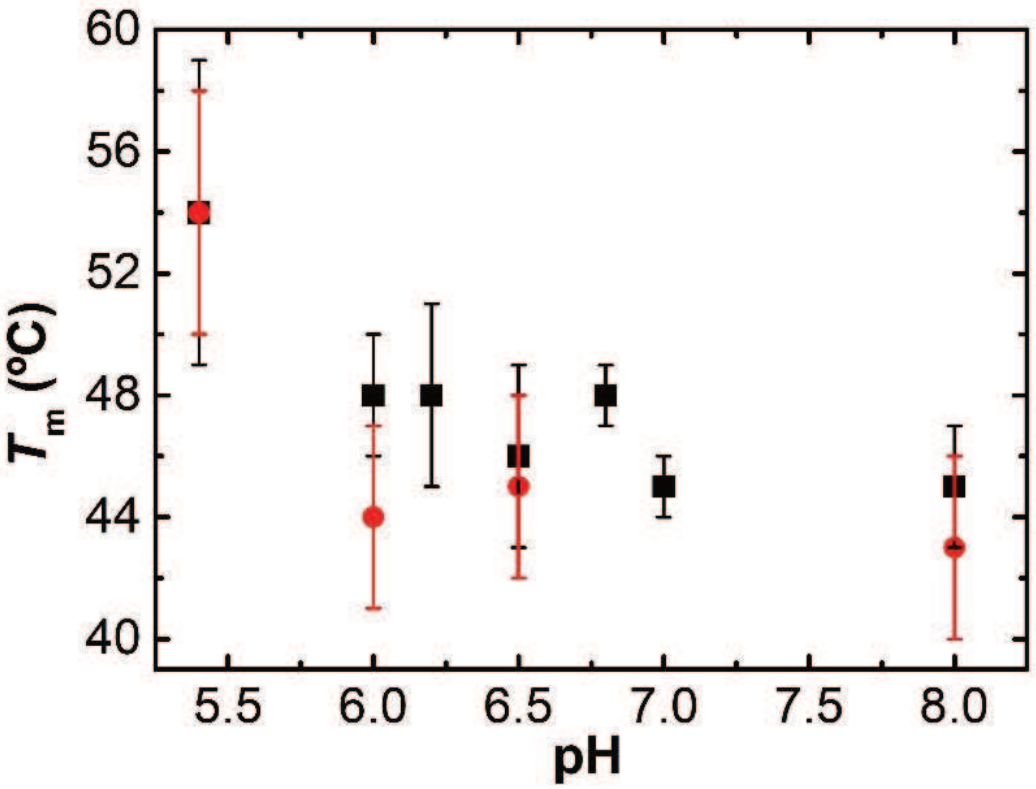


Figura 13. *Estabilidad térmica de D134S en función del pH* (círculos rojos) *estudiada por DSF*. Se incluyen los datos obtenidos para la *Sm*NirK de tipo salvaje (cuadrados negros) para comparación. Cada punto corresponde a un promedio de al menos 9 mediciones (3 réplicas realizadas en 3 días diferentes con el mismo lote de proteína).

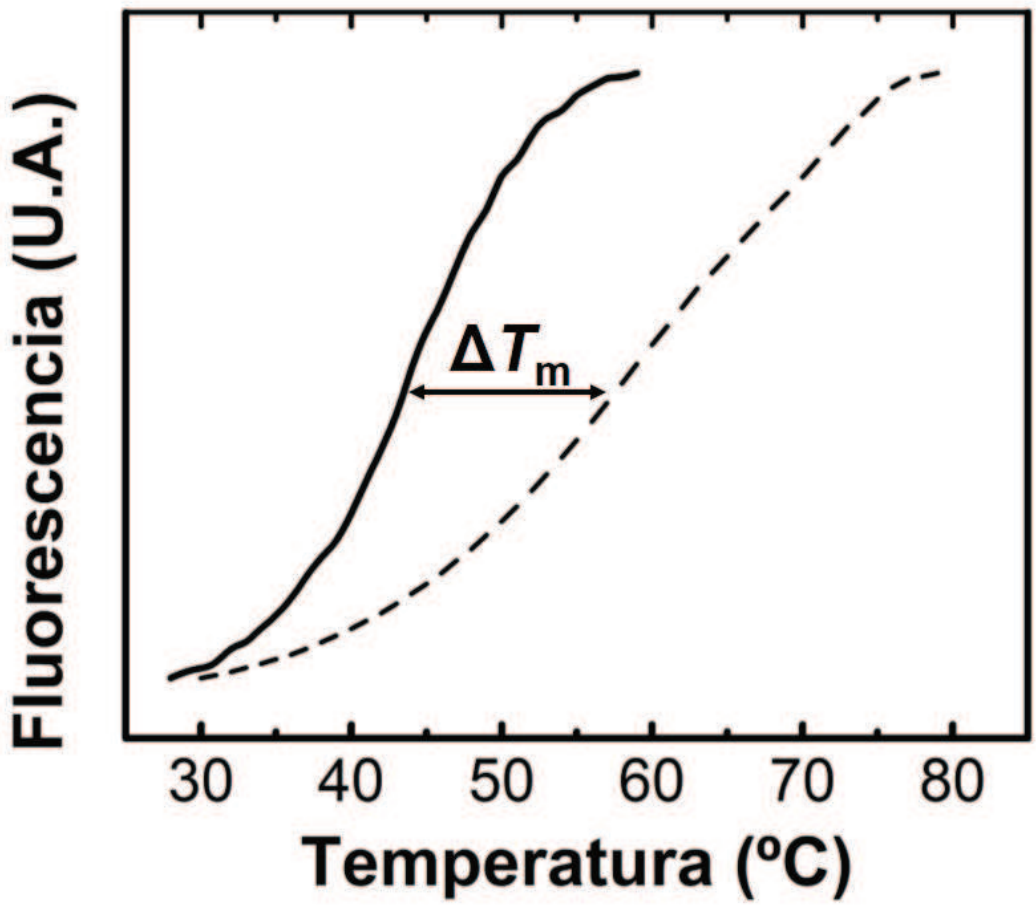


Figura 14. *Termograma de la variante D134S a pH 5.4 (línea de trazos) y pH 8.0 (línea continua).*

4.1.3.3. Estudio del efecto de aditivos en la estabilidad de la variante.

En los estudios de EPR descriptos en las siguientes secciones, tanto la variante D134S como la enzima de tipo salvaje podrían presentar problemas de estabilidad bajo determinadas condiciones. Esto se debe a que para estudiar los metales presentes en enzimas por esta espectroscopia se necesitan altas concentraciones (~200 µM) lo cual hace que la enzima pueda precipitar.

Por tal motivo, se procedió a buscar aditivos que puedan aumentar la estabilidad de la misma. Los aditivos evaluados fueron glicerol (10 %) y etilenglicol (200 mg/mL).

La figura 15 muestra los termogramas obtenidos sin la presencia de estabilizadores (línea roja), con glicerol (línea verde) y con etilenglicol (línea gris). Tal como puede observarse, ambos estabilizadores producen un aumento en el valor de T_m indicando que confieren mayor estabilidad a la enzima. Este resultado fue considerado en los ensayos de titulación potenciométrica que se describen en la sección 4.1.7.

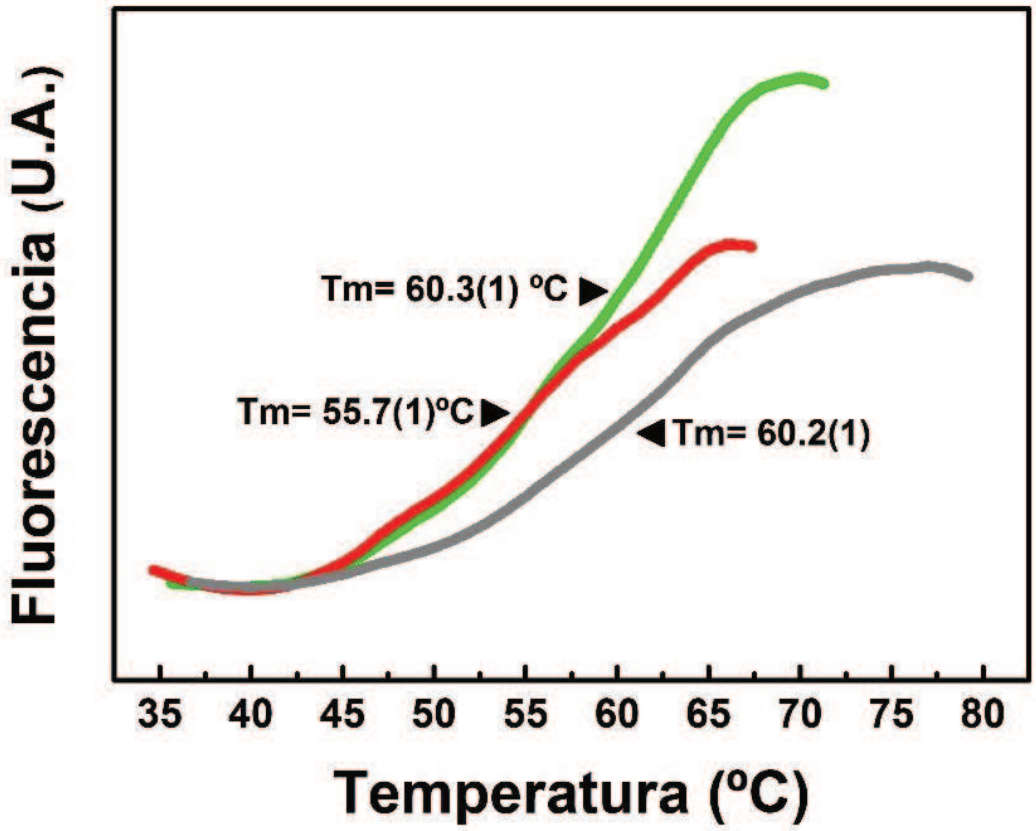


Figura 15. *Análisis de estabilidad de la variante D134S* con el agregado de 10 % de glicerol (línea verde), 200 mg/mL de etilenglicol (línea gris) y sin aditivos (línea roja) a pH 6.0.

4.1.4. Caracterización espectroscópica

4.1.4.1. Espectroscopia de absorción UV-vis

En la figura 16 se muestra el espectro UV-vis de la variante D134S (línea roja) y de la forma salvaje (línea negra) de *Sm*NirK. El espectro UV-vis de la variante no mostró diferencias relevantes en comparación con la enzima de tipo salvaje. De esta forma, se observan dos bandas de absorción principales a 457 nm (ε_{457nm} = 2.3 ± 0.1 mM^{-1} cm^{-1}) y 581 nm (ε_{581nm} = 2.0 ± 0.2 mM^{-1} cm^{-1}) con una relación $\varepsilon_{457nm}/\varepsilon_{581nm}$ de 1.12 ± 0.04, típico de los sitios de cobre verde T1. La banda a menor longitud de onda se atribuye a la transición de transferencia de carga (TC) $(3p_\sigma)S(Cys)\rightarrow(d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$ mientras que la banda a ~590 nm se atribuye a la transición de TC $(3p_\pi)S(Cys)\rightarrow(d_{x^2-y^2})Cu^{2+}$. Los espectros presentan otra banda de absorción más ancha centrada a los 650-750 nm correspondiente a las transiciones d-d y una banda de absorción ubicada a los 350-400 nm atribuida a la transición de TC que ocurre debido al enlace S(Met)-Cu. Los parámetros determinados para la enzima de tipo salvaje fueron ε_{456nm} = 3.3 mM^{-1} cm^{-1}, ε_{586nm} = 2.9 mM^{-1} cm^{-1} con una relación $\varepsilon_{456nm}/\varepsilon_{586nm}$ de 1.14 (51,52).

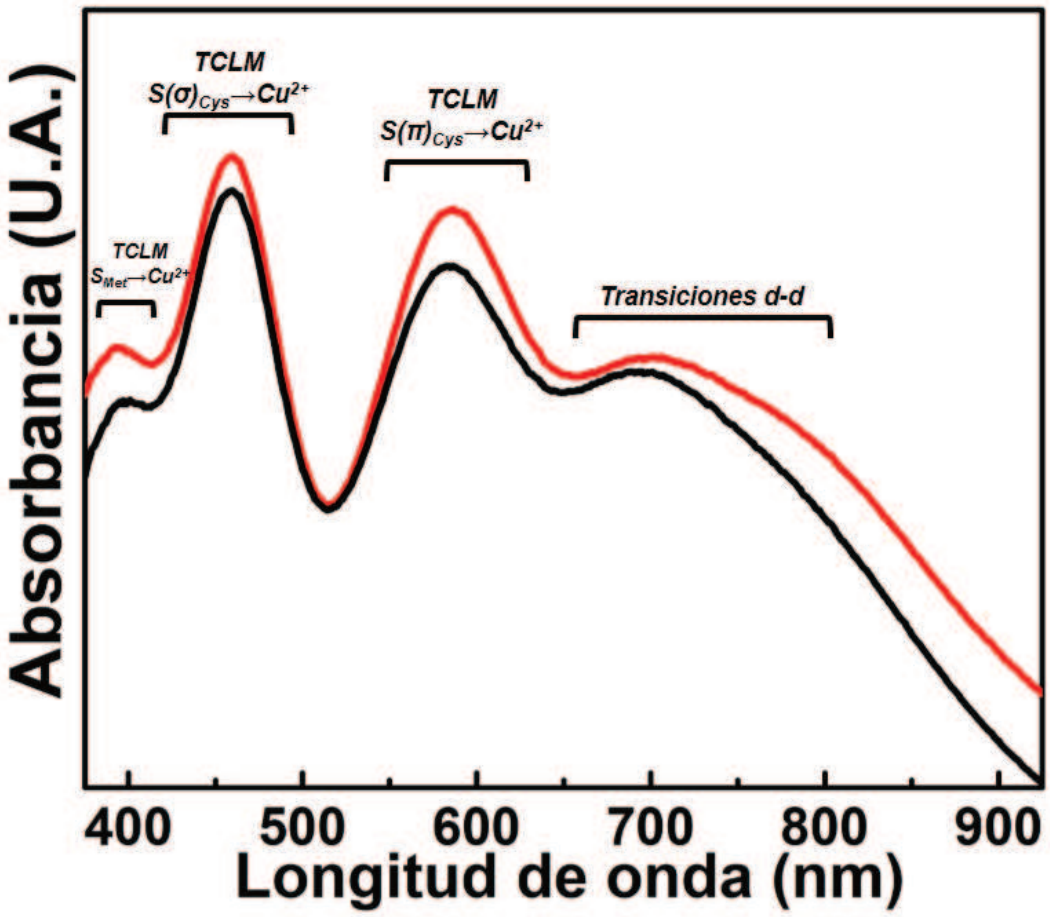


Figura 16. *Espectros de absorción UV-vis de enzima salvaje (línea negra) y variante D134S (línea roja).* Se encuentran indicadas las transiciones asignadas a cada banda de absorción (TCLM, transferencia de carga ligando metal).

4.1.4.2. Espectroscopia de EPR

La figura 17 muestra el espectro de EPR de la enzima de tipo salvaje y la variante D134S. Se evidencian dos componentes espectrales asociadas a especies de Cu (II) de tipo T1 y T2 en una relación 1:1. La simulación de los espectro de la variante (Figura 18) confirmó que la señal del centro T1 ($g_{1,2,3}$ =2.023, 2.052, 2.193 y A_3 =$A_{\|}$=7 mT) no muestra cambios significativos con respecto a la de la enzima de tipo salvaje ($g_{1,2,3}$= 2.023, 2.052, 2.190 y $A_{\|}$=7 mT) (51,56). Este resultado está en consonancia con los datos de espectroscopia UV-vis, confirmando que la mutación no afecta la geometría de coordinación del centro T1. Por el contrario, la señal EPR del centro T2 de la variante ($g_{1,2,3}$= 2.050, 2.050, 2.273 y $A_{\|}$=18 mT) es diferente a la de la enzima de tipo salvaje ($g_{1,2,3}$= 2.065, 2.070, 2.315 y $A_{\|}$=15 mT) lo cual fue un resultado inesperado (Figura 17). Estos resultados indican que el reemplazo de Asp_{CAT} por Ser_{CAT} modifica significativamente las propiedades electrónicas y covalentes del T2, pese a que es un ligando de la segunda esfera de coordinación. Es importante notar que los ligandos de la segunda esfera de coordinación no tienen en general una influencia significativa en

las propiedades electrónicas del sitio metálico en química de coordinación de moléculas pequeñas.

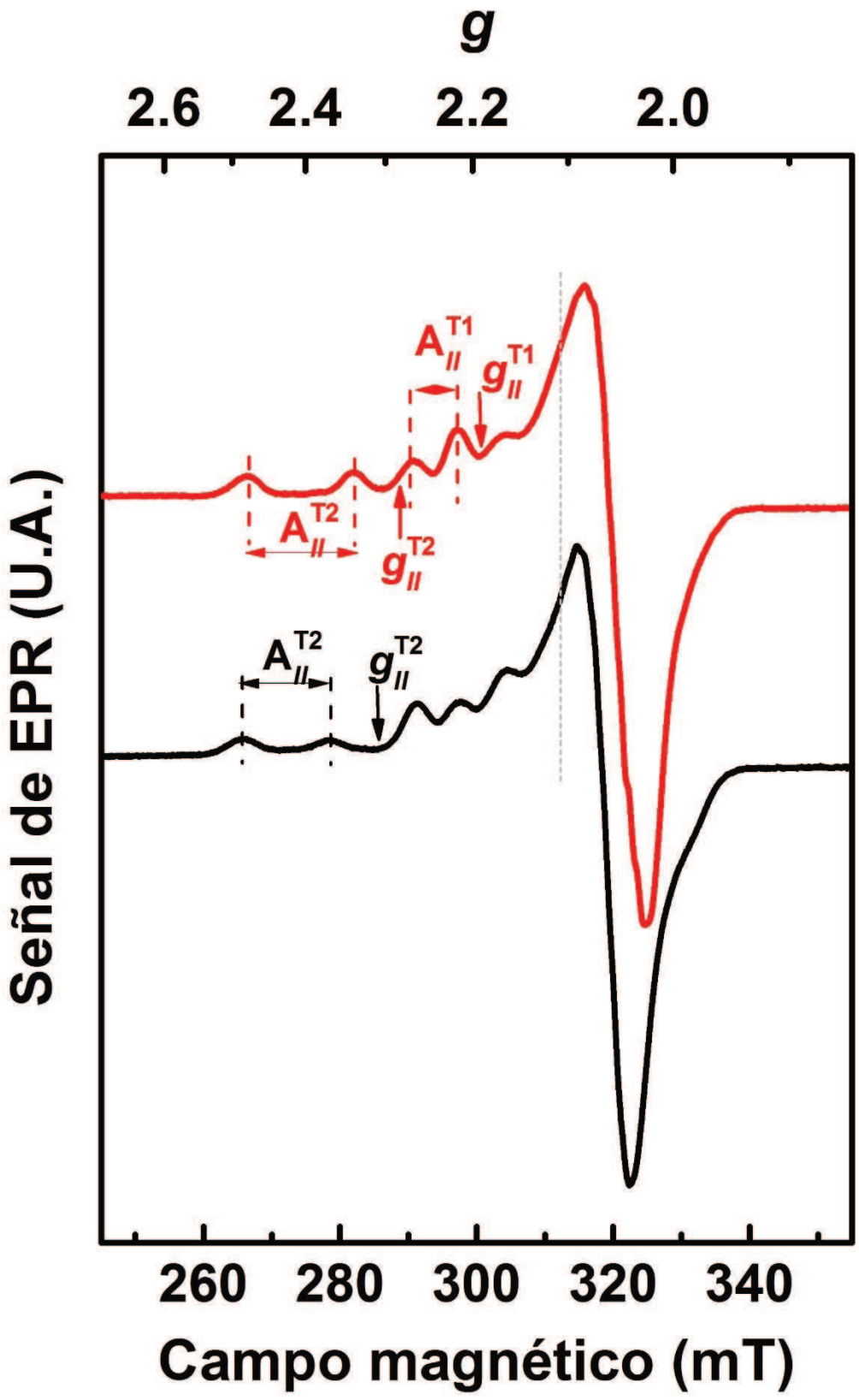


Figura 17. *Espectro EPR de enzima de tipo salvaje (línea negra) y variante D134S (línea roja) a pH 6.0.*

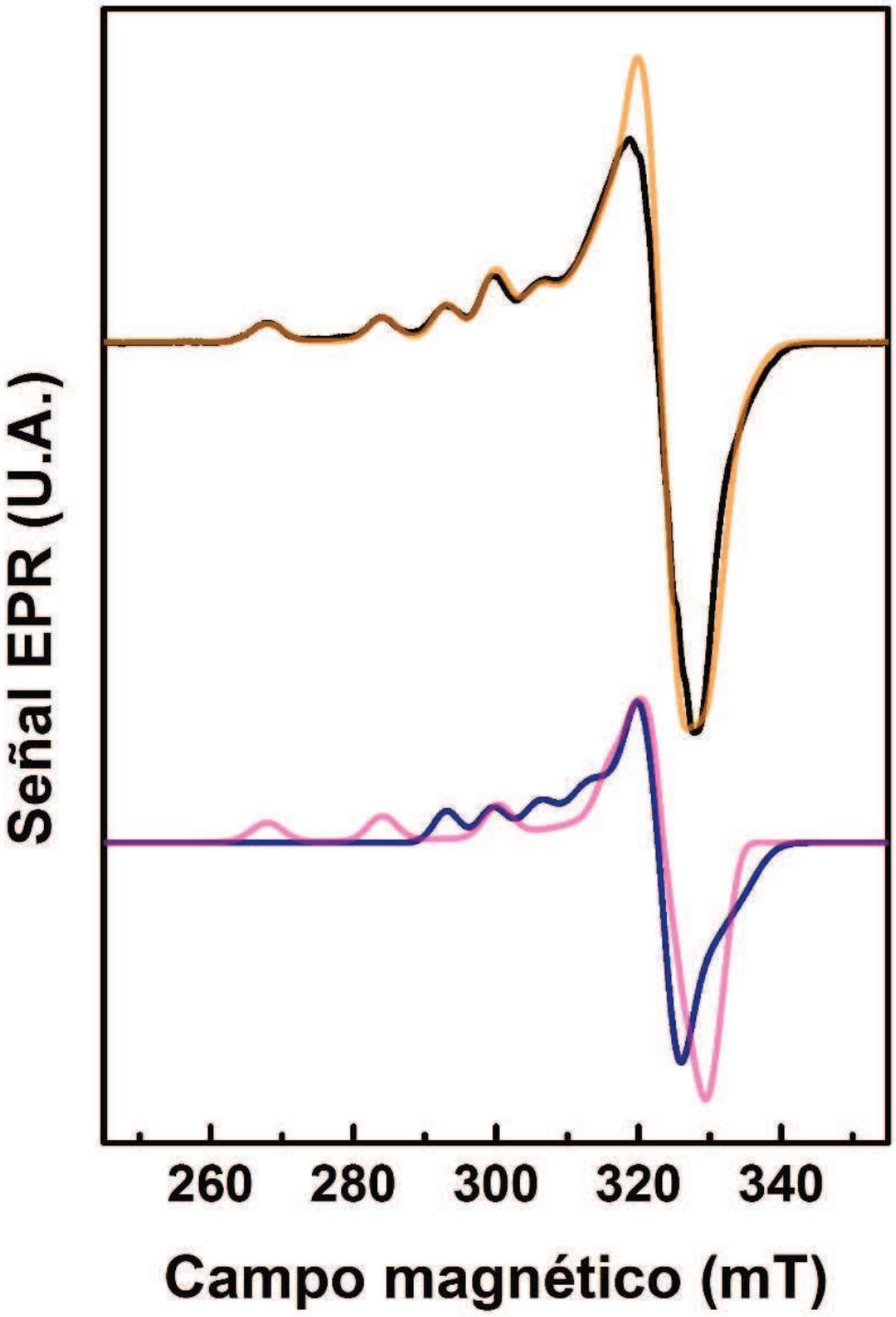


Figura 18. *Simulación del espectro de EPR de D134S.* El espectro simulado (línea naranja) se obtuvo sumando los componentes espectrales T1 y T2 (líneas azul y rosa, respectivamente) en una proporción 1:1. Los parámetros EPR fueron $g_{1,2,3}$=2.023, 2.052, 2.193 y A_3=A_{II}=7 mT para T1, y $g_{1,2,3}$= 2.050, 2.050, 2.273 y A_3=A_{II}=18 mT para T2.

Con el objetivo de evaluar si el pH modificaba las señales de T1 y T2, la variante fue preparada en tampón Mix en un rango de pH de 6.0 a pH 10.0 y medida por espectroscopia de EPR (ver sección 3.7.2). Tal como puede observarse en la figura 19, no se evidenciaron diferencias significativas en la señal de EPR de ambos centros en el rango de pH estudiado. Esto contrasta con lo observado en la enzima salvaje, en la cual

la señal de EPR del T2 se modifica al aumentar el pH (56), lo que sugiere una mayor sensibilidad muy posiblemente debido a la presencia de un residuo ionizable (AspCAT) en la segunda esfera de coordinación del T2.

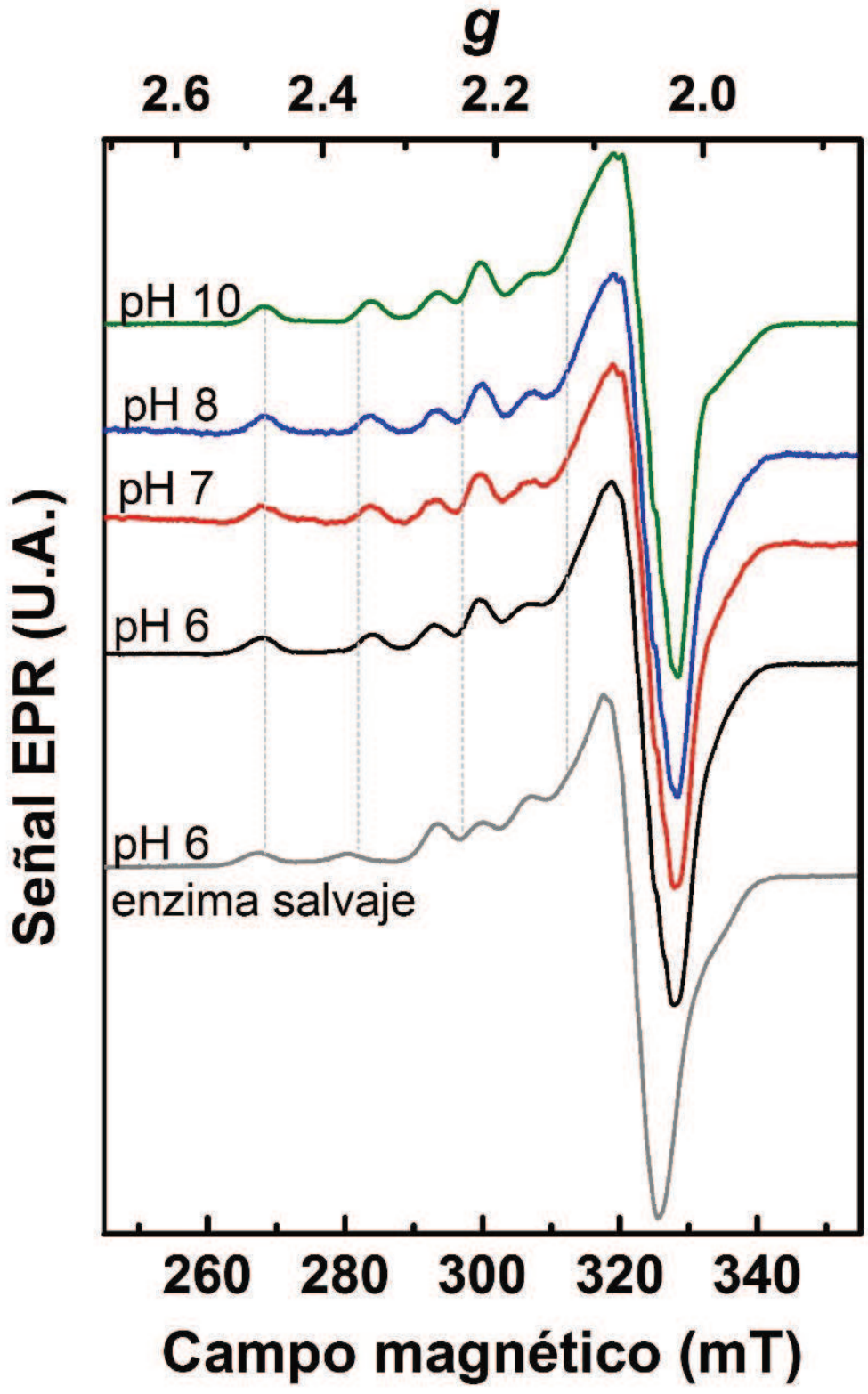


Figura 19. *Espectros de EPR de D134S en función del pH.* Las muestras se prepararon a pH 6.0 (línea negra), pH 7.0 (línea roja), pH 8.0 (línea azul) y pH 10.0 (línea verde). Se incluye el espectro EPR de la enzima de tipo salvaje (línea gris) preparada a pH 6.0 para comparación.

4.1.5. Evaluación de las propiedades cinéticas de la variante D134S

4.1.5.1. Determinación de los parámetros cinéticos K_m, V_m y k_{cat}

Una vez que se confirmó que la variante D134S era activa (sección 4.1.1.), se procedió a evaluar si la mutación puntual afectaba a los parámetros cinéticos. La figura 20 muestra los datos experimentales (velocidad inicial) obtenidos a partir de la variación de la concentración del sustrato a pH 6.5 para la variante D134S incluyendo los datos obtenidos para la enzima de tipo salvaje para comparación. La cinética de ambas formas de la enzima se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, a partir del cual fueron calculados los parámetros K_m, V_m y k_{cat}.

La tabla incluida dentro de la figura 20 muestra los valores de V_m, k_{cat}, K_m y k_{cat}/K_m obtenidos para la variante y la enzima de tipo salvaje. Tal como puede observarse la variante es significativamente menos eficiente (valor de k_{cat} ~4 veces menor) y la eficiencia catalítica también disminuye sustancialmente (relación k_{cat}/K_m).

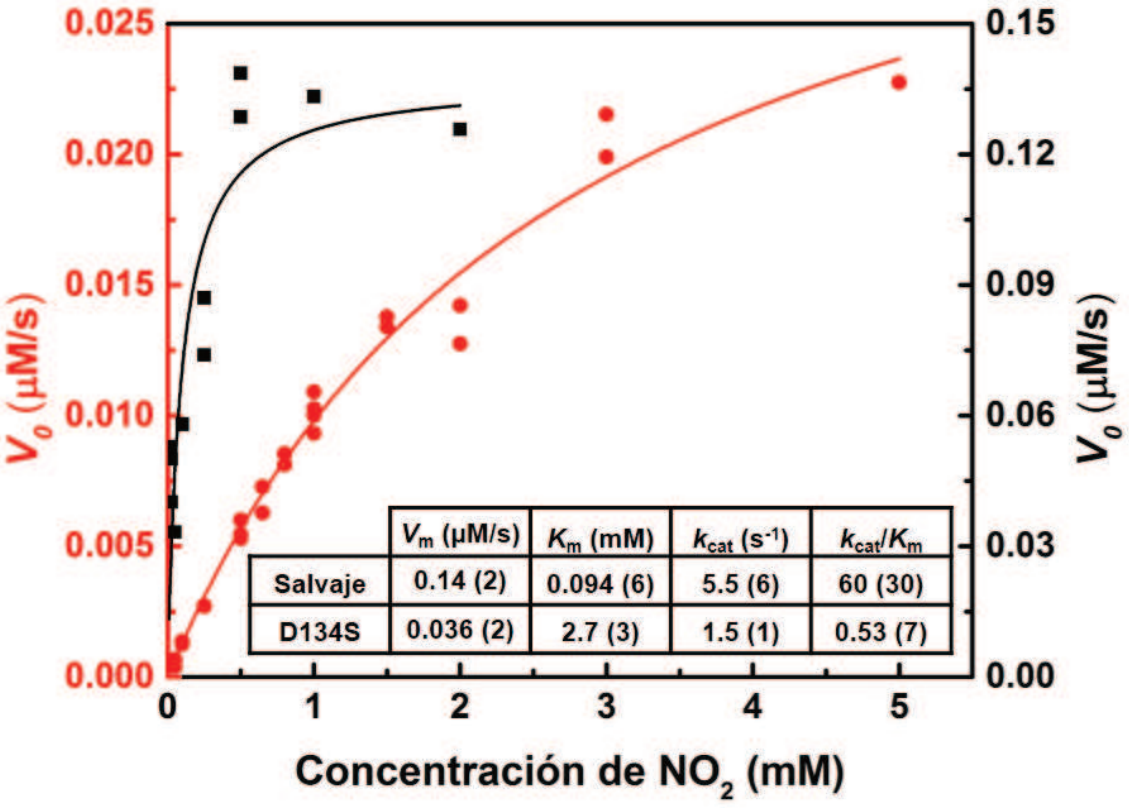


Figura 20. *Cinética de reducción de nitrito por SmNirK.* Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato para la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y la variante D134S (círculos rojos) a pH 6.5. Los ajustes (líneas continuas) se realizaron teniendo en cuenta el modelo de Michaelis-Menten de donde se obtuvieron los valores de los parámetros V_m, K_m y k_{cat} incluidos en la tabla.

4.1.5.2. Efecto del pH en la actividad de la variante D134S

En la sección 4.1.3.2. se mencionó que el estado de protonación de ciertos residuos puede afectar la cinética de reducción del nitrito por *Sm*NirK. Por este motivo, se evaluó el efecto del pH en la actividad catalizada por la variante D134S y la forma salvaje de *Sm*NirK.

Mediante curvas de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato se determinaron los valores de K_m, k_{cat} y la relación k_{cat}/K_m a diferentes valores de pH (Figura 21 A, B y C respectivamente).

Al igual que en la *Sm*NirK de tipo salvaje, la actividad enzimática de la D134S depende del pH; cuanto mayor es el pH, menor es tanto la afinidad de unión al sustrato (K_m aumenta, Figura 21C) como la eficiencia catalítica (la relación k_{cat}/K_m disminuye, Figura 21B).

La actividad enzimática de la D134S es óptima a valores de pH inferiores a 6.0 como en la enzima de tipo salvaje (22), pero a velocidades de reacción ~10 veces inferiores en condiciones de trabajo óptimas (Figura 21A). Además, no se observó actividad significativa a pH > 7.0. En la variante D134S se evidencia una marcada disminución de la afinidad por el sustrato conforme aumenta el pH (disminución de la relación k_{cat}/K_m, Figura 21C), hecho que estaría relacionado con la falta del carboxilato en la serina. La NirK de tres dominios de *Thermus scotoductus* SA-01 también contiene serina en lugar de aspártico y es capaz de reducir el nitrito (53). Aunque el valor k_{cat} parece ser mayor que el determinado para *Sm*NirK (tanto la de tipo salvaje como la variante), los parámetros no pueden compararse debido al uso de un donante de electrones artificial en lugar del fisiológico en el caso de la *Ts*NirK.

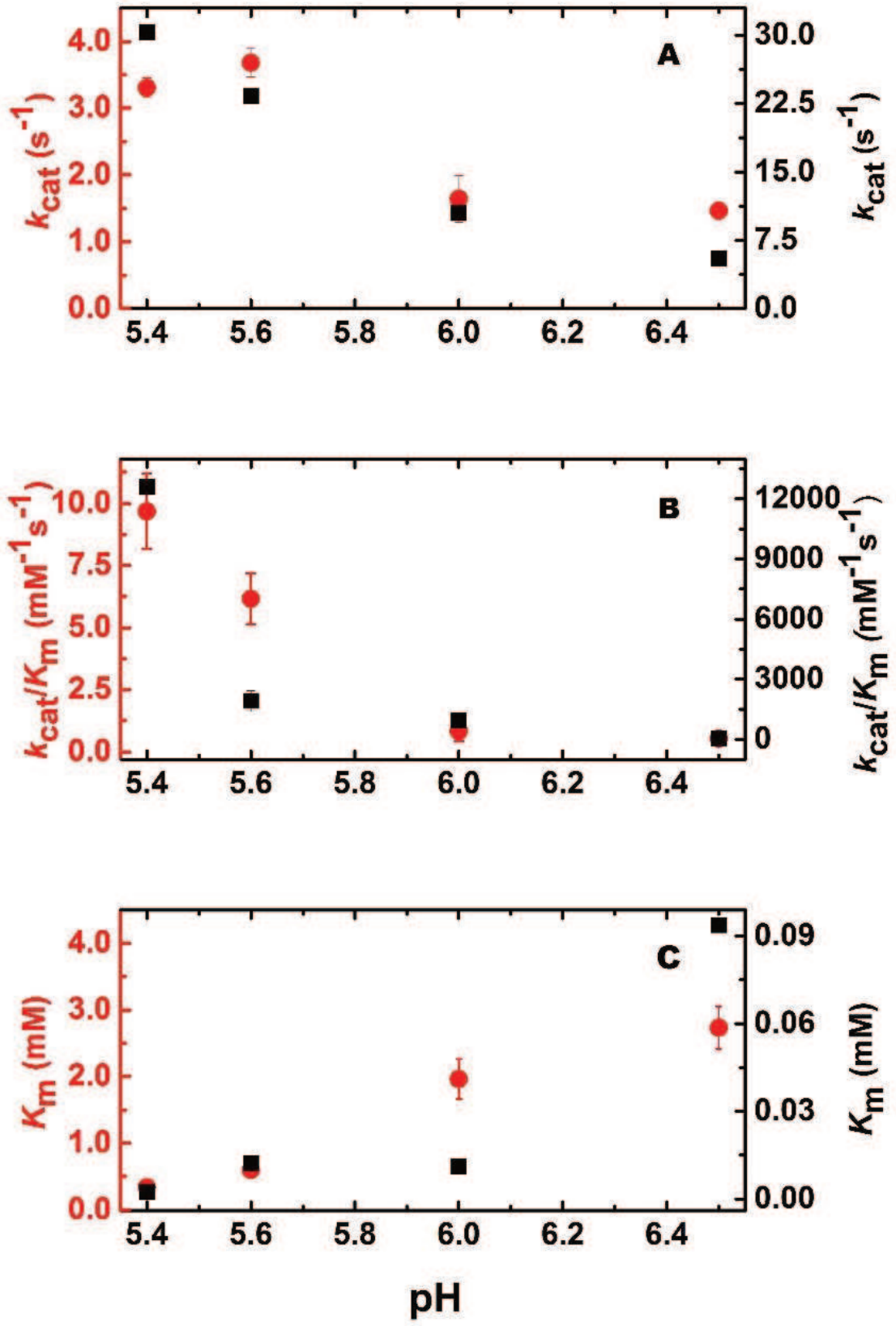


Figura 21. *Efecto del pH en los parámetros cinéticos K_m, k_{cat} y k_{cat}/K_m de enzima Sm*NirK. Se incluyen los datos obtenidos para la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y variante D134S (círculos rojos). Los parámetros K_m y k_{cat} se calcularon ajustando los datos por mínimos cuadrados a un modelo de Michaelis-Menten.

Además de los ensayos realizados usando el dador fisiológico de la enzima, se realizaron estudios de actividad en función del pH empleando un dador electrónico artificial, benzil viológeno (BV), para evaluar si se observaba un efecto similar al evidenciado en presencia de *Sm*Paz (Figura 22). 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. electrodo estándar de hidrógeno (SHE). Ambas enzimas presentan actividad catalítica con BV como dador electrónico y tienen el mismo comportamiento que con *Sm*Paz, es decir, a menores valores de pH presentan mayor actividad. Además, a pH 5.4 puede observarse que la variante es significativamente menos eficiente (~12 veces) que la enzima salvaje.

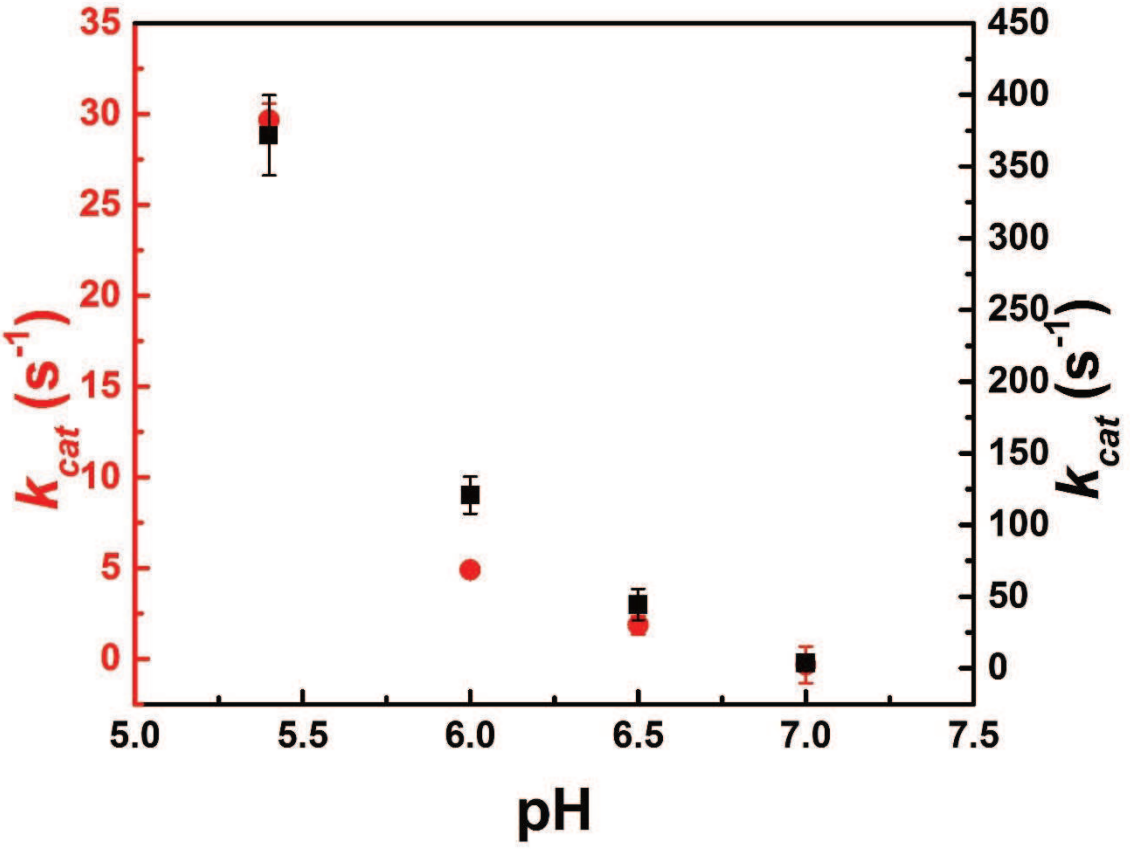


Figura 22. *Ensayos de actividad de SmNirK en función del pH usando benzil viológeno como dador electrónico.* Actividad enzimática en función del pH para la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y variante (círculos rojos).

También se evaluó la eficiencia catalítica de la enzima de tipo salvaje *Sm*NirK variando la concentración del dador de electrones (*Sm*Paz) a tres valores de pH (5.4, 6.0 y 6.5). El efecto observado fue el mismo que cuando se varió la concentración del aceptor de electrones, es decir, a mayor pH menor la afinidad de unión al sustrato y menor k_{cat}. Con

este estudio también se pudo verificar que durante los ensayos en los que se variaba la concentración de sustrato se estaba trabajando en condiciones de V_m ya que la concentración de *Sm*Paz usada era 20 uM.

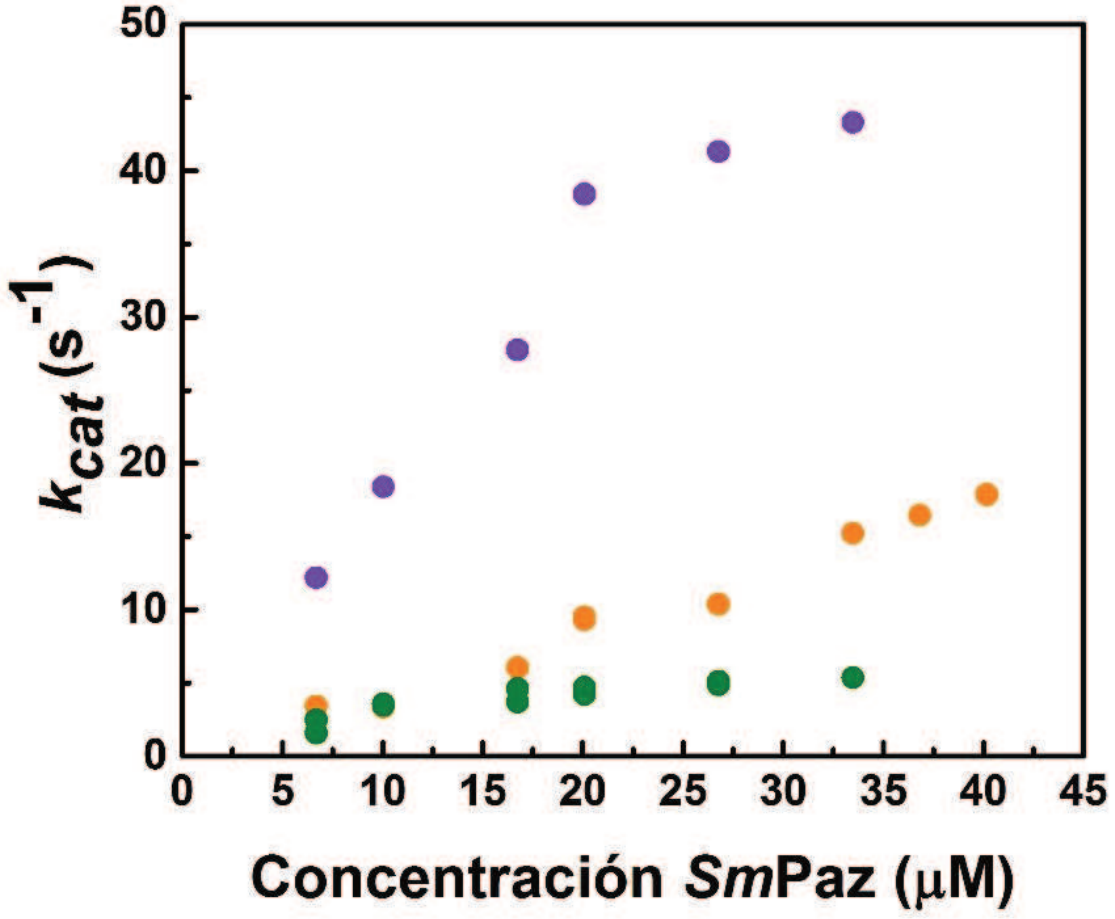


Figura 23. *k_{cat} determinado para la enzima de tipo salvaje en función de la concentración de SmPaz* a pH 5.4 (lila), pH 6.0 (naranja) y pH 6.5 (verde).

4.1.6. Efecto del pH en la velocidad de transferencia electrónica entre los centros T1 y T2

Uno de los resultados encontrados tanto para la *Bj*NirK como para la *Sm*NirK de tipo salvaje es que el proceso de transferencia electrónica entre los centros T1 y T2 difiere bajo diferentes condiciones de pH (33,92). Brevemente, lo que se observó es que a pH 6.0 los centros T1 y T2 de la enzima reducida con ditionito se reoxidan por adición de sustrato de forma inmediata. Por el contrario, a pH 10.0 solo se reoxida el centro T2 mientras que el centro T1 se mantiene reducido. Esto indica que a valores de pH alto no se produce transferencia electrónica entre los centros T1 y T2. Además, demuestra que, si son provistos los equivalentes de reducción, el centro T2 puede transferir los

electrones al sustrato independientemente del centro T1. El mismo estudio fue realizado en la variante D134S utilizando espectroscopia UV-vis y EPR.

La figura 24A muestra el espectro de la variante en su forma *as-prepared* (línea negra), reducida con ditionito (línea azul) y reoxidada con nitrito (línea roja) a pH 6.0. Tal como puede observarse el centro T1 se reoxida en estas condiciones y lo hace de forma inmediata. El mismo experimento realizado a pH 10.0 muestra que la variante reducida con ditionito (Figura 24B, línea azul) recuperó parcialmente (75%) el espectro del centro T1 (Figura 23B, línea roja). Es importante mencionar que la oxidación del centro T1 no sucedió de forma inmediata y, por el contrario, requirió un tiempo de incubación más prolongado con nitrito (t=50 min).

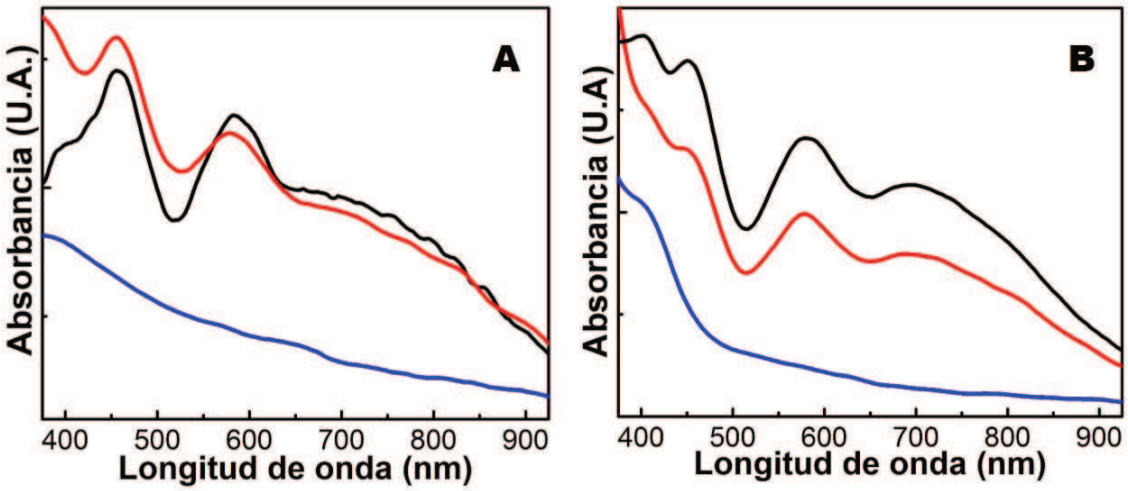


Figura 24. *Influencia del pH en la transferencia electrónica entre el centro T1 y T2 en la variante D134S estudiado por UV-vis.* Las muestras fueron preparadas a pH 6.0 (A) y pH 10.0 (B) y los espectros UV-vis de la forma *as-prepared* (línea negra), reducida con ditionito (línea azul) y reoxidada con nitrito (línea roja) fueron medidos en un rango de longitudes de onda entre 200 – 1000 nm (solo se incluye la parte de los espectros entre 375 – 925 nm).

Paralelamente se realizaron los mismos estudios de reducción/reoxidación con sustrato siguiendo la evolución de los dos centros mediante espectroscopia de EPR.

La figura 25 muestra los espectros de EPR de la muestra a pH 6.0 (A) y pH 10.0 (B). Tal como era esperado, a pH 6.0 el espectro de la muestra *as-prepared* (línea negra) desaparece por la adición de reductores (línea roja y línea azul) y los centros T1 y T2 se reoxidan luego de la adición de nitrito (línea verde discontinua). La relación T1/T2 es de 1:1 y la intensidad de la señal es aproximadamente la mitad de la enzima *as-prepared*. Estos resultados demuestran además que las especies paramagnéticas T1 y T2 son parte importante en el proceso catalítico de la enzima, tal como se observa en los datos UV-vis (Figura 24). Otra observación derivada de los resultados de este experimento, es que ambos centros tienen valores similares de potencial de reducción.

Un análisis más profundo sobre los potenciales de reducción de los centros se detallará en la sección 4.1.7.

Los estudios de reoxidación de la variante con nitrito a pH 10.0 (Figura 25B) mostraron que, aunque ambos centros se reoxidan al agregar un exceso de sustrato (línea verde discontinua) a la enzima reducida (línea azul y línea roja), el proceso de reoxidación del centro T1 fue significativamente más lento que a pH 6.0 y requirió mayores concentraciones de nitrito. Esto está de acuerdo con lo observado mediante UV-vis.

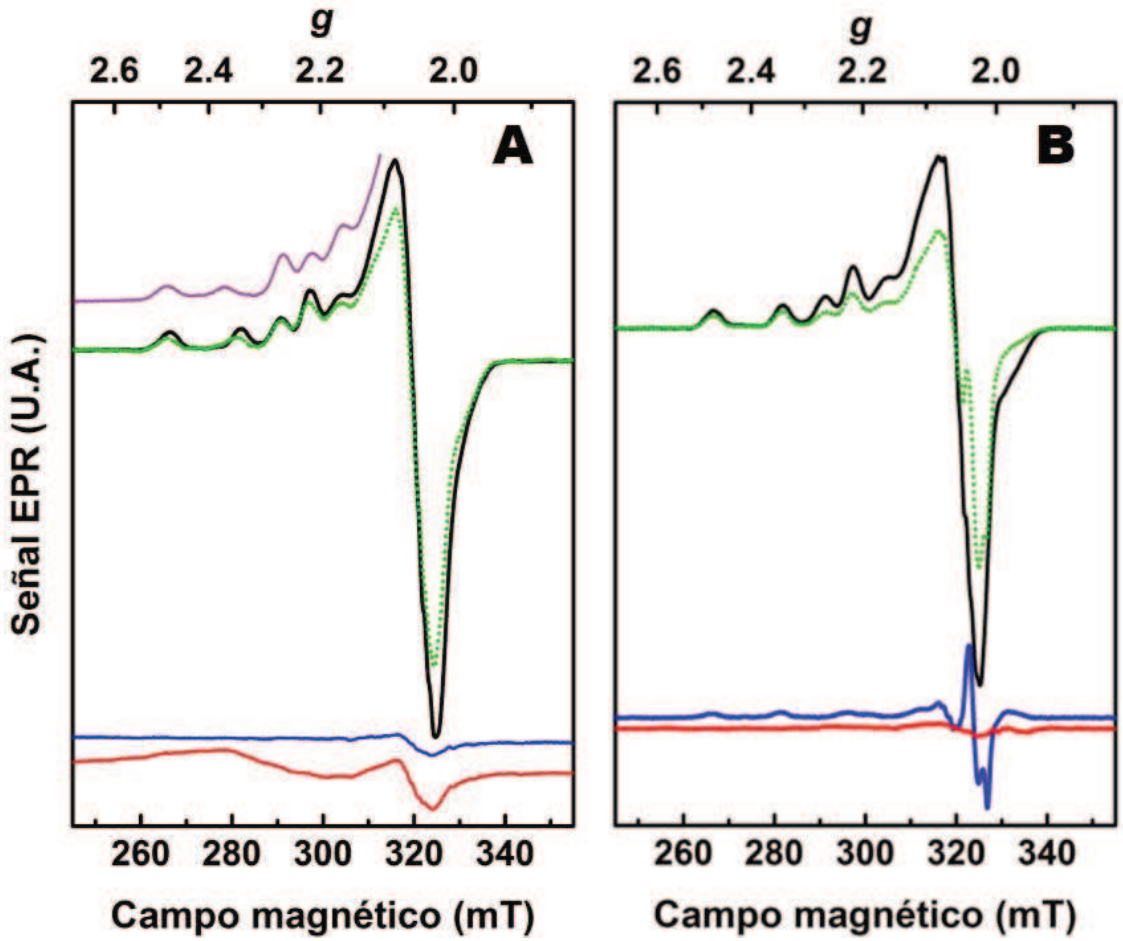


Figura 25. *Influencia del pH en la transferencia electrónica entre el centro T1 y T2 en la variante D134S estudiado por EPR.* Las muestras fueron preparadas a pH 6.0 (A) y pH 10.0 (B) y los espectros de EPR de la forma *as-prepared* (línea negra), reducida con ditionito (línea roja) o ascorbato (línea azul) y reoxidada con nitrito (línea verde discontinua) fueron medidos por EPR en banda X. Se incluye el espectro de la forma salvaje (línea púrpura) para comparación.

4.1.7. Estudio de los potenciales de reducción (E_m) de los centros T1 y T2 y su relación con la catálisis enzimática.

En esta parte del trabajo de tesis se evaluó si la mutación puntual realizada afectaba los potenciales de reducción de uno o ambos centros y en tal caso, como estaba relacionado con la eficiencia catalítica de la enzima. La espectroscopia de UV-vis fue

utilizada para determinar el potencial de reducción del centro T1 ya que el centro T2 no tiene señal detectable por esta técnica. Por otro lado, la espectroscopia de EPR fue utilizada para evaluar el potencial de ambos centros. En primer lugar, se intentó titular la variante a un valor de pH en el cual la enzima era activa (pH 6.0). Sin embargo, a pesar de que se evaluaron varias opciones para estabilizar la enzima, no se pudo encontrar una condición en la cual no precipitara. El valor de pH más bajo en el cual la enzima permanecía en solución era pH 7.0, con el agregado de 10 % de glicerol para aumentar su estabilidad. La otra condición elegida fue pH 8.0 ya que difiere en un punto de la condición anterior sumado a la inactividad de la enzima probada en los estudios cinéticos.

La figura 26 muestra la variación de la intensidad de la señal de UV-vis en función del potencial de reducción a pH 7.0 (Panel A) y pH 8.0 (Panel B) para la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y variante (círculos rojos). De acuerdo a los valores calculados, el E_m del centro T1 de D134S es similar al obtenido en la enzima de tipo salvaje (Tabla 6).

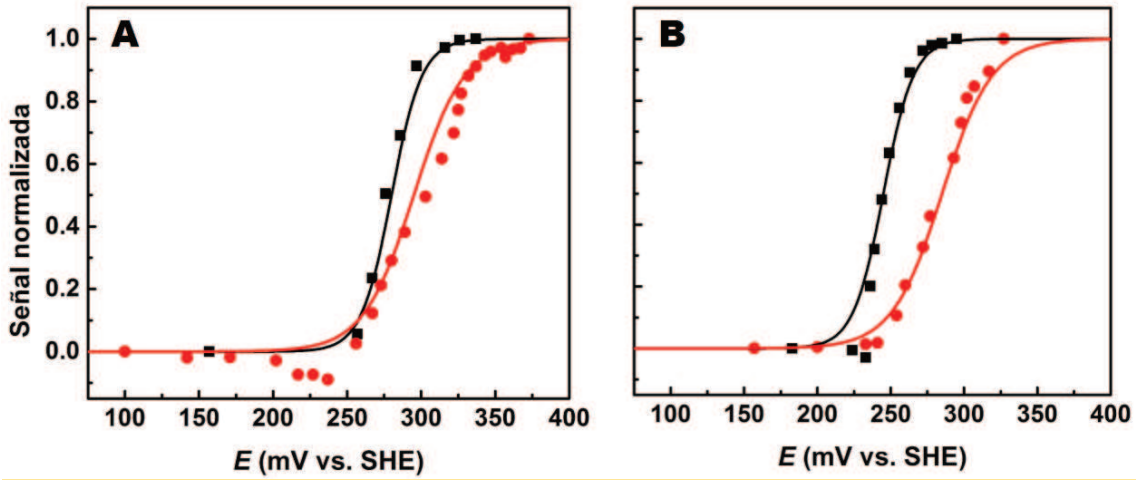


Figura 26. *Curvas de titulación del centro T1 por UV-vis de la enzima de tipo salvaje (cuadrados negros) y variante D134S (círculos rojos) a pH 7.0 (A) y pH 8.0 (B).*

Tabla 6. Potenciales de reducción del T1 y T2 de D134S a pH 7.0 y pH 8.0 junto con los de la enzima de tipo salvaje a pH 7.0.

	T1		T2	pH
Enzima	**EPR**	**UV-vis**	**EPR**	
Salvaje	224 (4) [52]	278 (1)	108 (5) [52]	7.0
	n.d.*	245 (1)	n.d.*	8.0
D134S	270 (20)	302 (2)	225 (6)	7.0
	239 (9)	284 (2)	234 (5)	8.0

* n.d., no determinado debido a problemas experimentales que impiden su evaluación en estas condiciones de pH.

En la figura 27 se encuentran los datos obtenidos a partir de la intensidad de la señal de EPR de los centros T1 y T2 en función del potencial de reducción a pH 7.0 y pH 8.0 para la variante. De acuerdo con los E_m calculados se observa un aumento de ~100 mV para el E_m correspondiente al T2 a ambos valores de pH (Tabla 6). Como primera observación se puede decir que este parámetro está fuertemente influenciado por un ligando de la segunda esfera de coordinación del centro T2 (Ser_{CAT}). En consecuencia, la diferencia de potencial parecería ser más favorable para la transferencia electrónica entre los centros T1 y T2 ($\Delta E_{m\ T1\text{-}T2}$ para D134S es menor que la de *Sm*NirK). Este hecho conduciría a la hipótesis que la sustitución de un residuo con cadena lateral cargada negativamente (aspártico) por otro con cadena lateral neutra (serina) genera una enzima más activa. Sin embargo, como se muestra en la sección 4.1.5.1., el valor de k_{cat} de la variante es alrededor de un orden de magnitud menor que la de tipo salvaje, indicando que el potencial de reducción no es el factor que gobierna la velocidad de reacción.

A pH 8.0, los potenciales de reducción de ambos centros de la variante (Tabla 6) son prácticamente iguales y, aunque estos valores superan a los de la enzima salvaje, la variante no es activa. La pérdida/disminución de la capacidad de transferencia entre los centros T1 y T2 es además apoyada por los resultados obtenidos en los experimentos de reoxidación donde fue necesario agregar una mayor cantidad de sustrato e incubar mayor tiempo para reoxidar el centro T1. Además, estudios de estabilidad demostraron que ambas enzimas (en bajas concentraciones) son menos estables a mayores valores de pH, lo cual está de acuerdo con estudios estructurales realizados en NirK de *Rhodobacter sphaeroides* (24). Por lo tanto, la pérdida de actividad bajo condiciones de pH alto podría deberse a una combinación entre equilibrios dependientes de pH y procesos de inestabilidad que afectan estructuras tales como enlaces $N_{\delta 1}H\cdots O{=}C$ del puente Cys-His (31,64) y de la red de puentes de hidrógenos presentes en los canales de protones y de entrada del sustrato así como otras interacciones intraproteínas. En resumen, la combinación de todos estos factores afecta la red de protones necesaria para regenerar el sitio activo y reiniciar el ciclo catalítico.

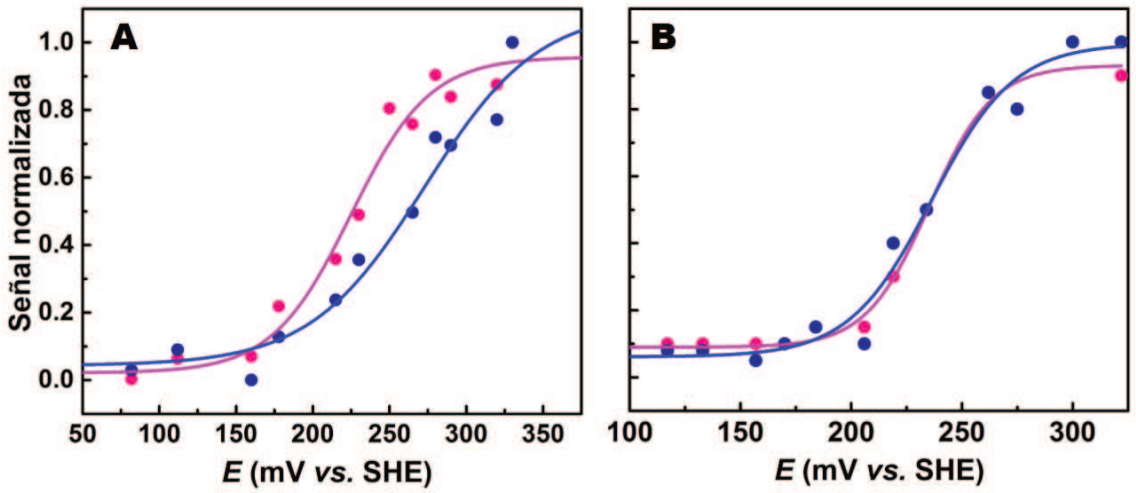
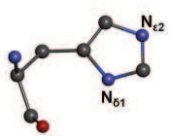


Figura 27. *Valoración potenciométrica redox de D134S a pH 7.0 (A) y pH 8.0 (B) de T1 (círculos azules) y T2 (círculos rosas) monitorizada por EPR.*

4.1.8. Estudio del entorno de coordinación del núcleo catalítico mediante cálculos computacionales

Dado que se desconoce la estructura de rayos X de la variante D134S y que la actividad catalítica depende del pH, se realizaron cálculos teóricos para intentar entender más profundamente los resultados experimentales a nivel molecular. Los cálculos se realizaron suponiendo la His_{CAT} protonada o desprotonada, o sea, simulando condiciones de pH bajo y alto, respectivamente. En la figura 28 se muestran las estructuras QM/MM de la variante D134S y *Sm*NirK de tipo salvaje. El núcleo catalítico de D134S, que incluye a T1 y T2, es muy similar al observado en la *Sm*NirK de tipo salvaje, pero con diferencias en el entorno de la Ser_{CAT}. En los cálculos, se evaluó la estabilidad energética de dos posibles conformaciones de la Ser_{CAT}, identificadas de aquí en adelante como conformaciones 1 y 2 (Paneles A y B de la Figura 28, respectivamente), con la His_{CAT} protonada en dos átomos de nitrógeno ($N_{\delta 1}$ y $N_{\varepsilon 2}$)[1]. La His_{CAT} es un residuo de la segunda esfera de coordinación del T2 que establece un puente de hidrógeno con agua estructural denominada W_{br} (el término proviene del inglés bridging water) (Figura 4, Figura 28 panel C). W_{br} está unida al Asp_{CAT} también mediante puentes de hidrogeno. Se postula que His_{CAT} es relevante en el mecanismo catalítico de transporte de protones (21,29,30,43).

1 

La conformación 1 se asemeja a la conformación proximal obtenida para la enzima de tipo salvaje en estado *resting* y varias otras NirKs (23,53,64,93–97) de dos dominios (Figura 28, panel C). Esta configuración inicial se mantuvo luego de la relajación. Como se muestra en el panel A de la figura 28, el átomo O del grupo hidroximetilo de la Ser_{CAT} forma un enlace de hidrógeno simultáneo con un hidrógeno de la molécula de W_{ap} ($d_{OSer\text{-}Oap/OSerHap}$ = 2.70 /1.84 Å) y con un hidrógeno de la molécula de W_{br} ($d_{OSer\text{-}Obr/OSerHbr}$ = 2.95/2.12 Å). Además, el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de Ser_{CAT} interactúa con su propio grupo carbonilo. Se trata de una red de puentes de hidrógeno diferente comparado con el de la *Sm*NirK de tipo salvaje, donde el Asp_{CAT} utiliza los átomos de oxígeno del grupo carboxilato para formar enlaces hidrógeno con las moléculas de W_{ap} y W_{br}.

La conformación 2 se inició con el grupo hidroximetilo de la Ser_{CAT} interactuando con el grupo carbonilo de la histidina del puente Cys-His. Esta configuración inicial permaneció estable tras la relajación ($d_{OSer\text{-}OHis}$= 2.81 Å, $d_{OSer\text{-}Oap}$= 2.72 Å) pero las interacciones entre la Ser_{CAT} y la His_{CAT} con el átomo de oxígeno de la molécula de W_{br} ($d_{OSer\text{-}Obr/OSer\text{-}Hbr}$ = 3.89/3.75 Å y $d_{N\varepsilon2\text{-}Obr}$ = 4.03 Å) se debilitaron. La conformación 1 resultó más estable que la conformación 2 (ΔE_{2-1} = 9 kcal/mol). Los residuos relevantes de la segunda esfera de coordinación del T2, como por ejemplo la Ile_{CAT}, no mostraron cambios significativos, o bien solo sufrieron un ligero movimiento en ambas conformaciones en relación con los de la enzima de tipo salvaje, como se observa para la His_{CAT}.

Posteriormente se realizaron cálculos QM/MM asumiendo la Ser_{CAT} en la conformación 1 con la His_{CAT} desprotonada obtenida mediante la eliminación del protón unido al $N_{\varepsilon2}$ (condición de pH alto). Luego de la relajación de esta configuración inicial, la estructura obtenida se parecía a la conformación 2 con la His_{CAT} protonada (Figura 28, panel D). Por lo tanto, podría concluirse que la pérdida del enlace de hidrógeno entre la His_{CAT} y la molécula de W_{br} provoca una deslocalización significativa de la molécula de W_{br} lo cual desestabiliza a la Ser_{CAT}. La posición final del átomo de O de la molécula de W_{br} está estabilizada por puentes de hidrógeno con moléculas de agua ocluidas. Por lo tanto, los cálculos QM/MM sugieren que la conformación 2 de la Ser_{CAT} es probablemente la estructura adoptada por la proteína a pH alto.

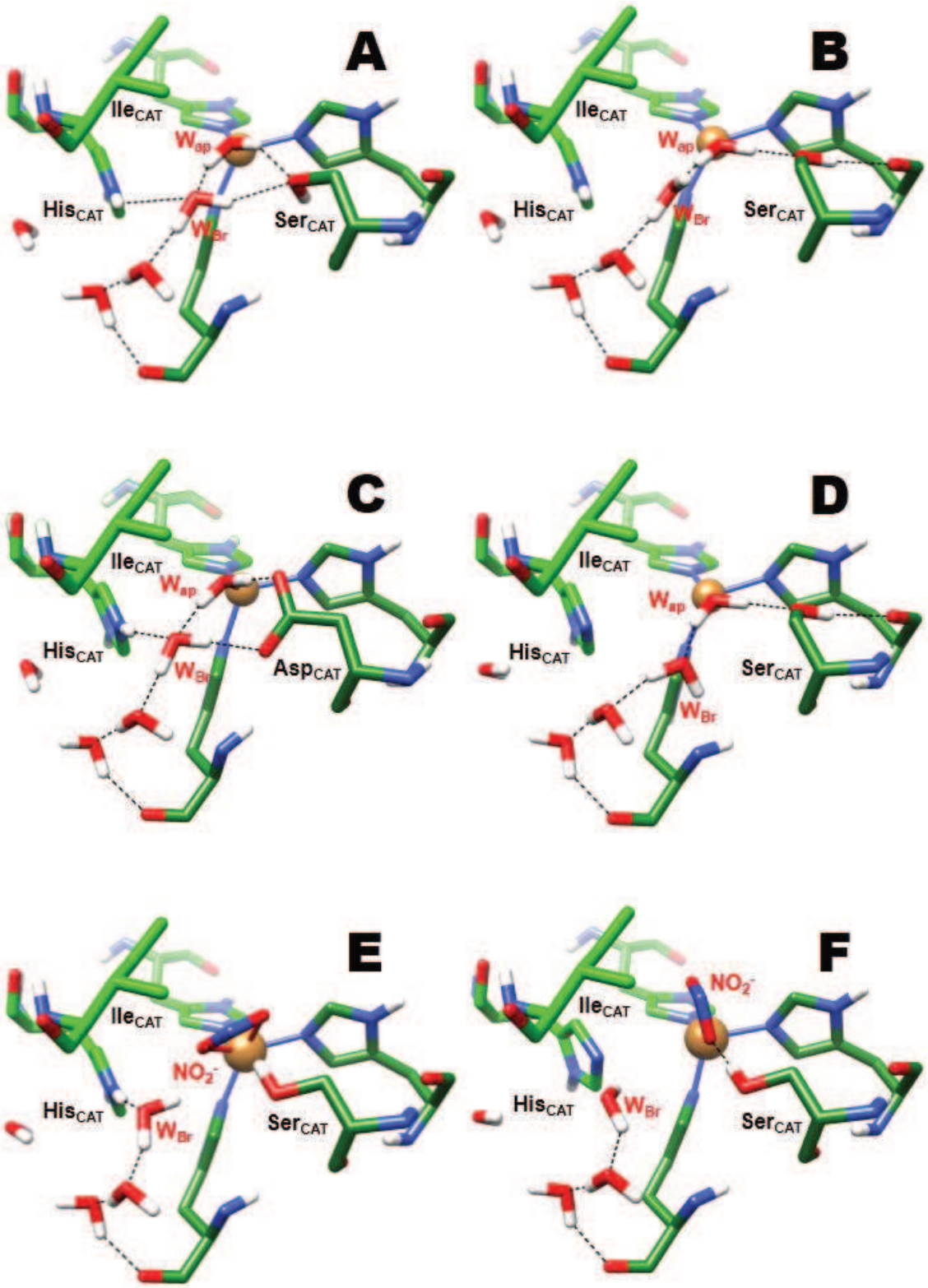


Figura 28. *Cálculos QM/MM para la variante D134S*. Los paneles A y B muestran las estructuras QM/MM del centro catalítico T2 de la variante D134S con la Ser_{CAT} en las conformaciones 1 y 2, respectivamente. El panel C muestra la estructura calculada de la *Sm*NirK de tipo salvaje; nótese que esta estructura es casi indistinguible de la estructura de rayos X de la *Sm*NirK de tipo salvaje (23). El panel D muestra la conformación QM/MM de la proteína al eliminar el átomo de hidrógeno unido al $N_{\varepsilon 2}$ de His_{CAT}. Los paneles E y F muestran las formas de unión de nitrito a T2 calculados con la Ser_{CAT} en conformación 1 y la His_{CAT} protonada y desprotonada, respectivamente.

Además, se evaluó la forma en la que la variante D134S une al sustrato. Se utilizó como configuración inicial una molécula de nitrito unida al átomo de cobre en modo bidentado *k²O,O'* con la Ser_{CAT} en la conformación 1 y la His_{CAT} en dos estados: protonada y desprotonada. Al igual que en el cálculo anterior, se permitió que todos los átomos de la parte QM, incluida la molécula de nitrito, se relajaran sin restricciones. La estructura obtenida para la His_{CAT} protonada mostró que el nitrito mantenía el modo k^2O,O' y la Ser_{CAT} la conformación 1. Las distancias de enlace nitrito-Cu fueron $d_{CuO/N/O'}$= 2.059/2.52/2.157 Å (Figura 28, panel E). Esta forma del nitrito unido a la enzima se utilizó para calcular la estructura con la His_{CAT} desprotonada. La molécula de nitrito conservó tanto el modo k^2O,O' ($d_{CuO/N/O'}$= 2.021/2.494/2.107 Å) como la interacción de puente de hidrógeno con la Ser_{CAT} en la conformación 1, pero el plano de la molécula de nitrito rotó con respecto a la posición obtenida para His_{CAT} protonada (Figura 28, paneles E y F).

A diferencia del caso en que la enzima se encontraba en el estado *resting*, la coordinación del nitrito al T2 se estabilizó con la Ser_{CAT} en conformación 1 tanto con la His_{CAT} protonada como desprotonada. Los cálculos QM/MM indican que la unión del nitrito al T2 es similar a la de *Sm*NirK de tipo salvaje y que la Ser_{CAT} contribuye a mantener el nitrito en posición para la reducción durante la catálisis.

Todos estos resultados en conjunto con los obtenidos por los estudios de cinética enzimática y titulación potenciométrica, sugieren fuertemente que la disminución de la eficiencia catalítica puede ser atribuida a la dificultad del grupo hidroximetilo de la serina para interaccionar con el W_{ap} y W_{br} y no a la dificultad de la incorporación de cobre en la estructura de la enzima. En resumen, D134S interacciona con un único átomo de oxígeno protonado mientras que la enzima de tipo salvaje lo hace con dos átomos de oxígeno del grupo carboxilato de la cadena lateral. Estos estudios también sugieren que la dependencia de la actividad catalítica con el pH no es únicamente debido a las propiedades acido-base del carboxilato de la cadena lateral del Asp_{CAT}. Además, la eficiencia catalítica depende fuertemente de la presencia de la cadena lateral del aspártico cargada negativamente. Finalmente, el mecanismo de reacción propuesto para NirK de dos dominios basados en la transferencia de protones mediada por Asp_{CAT} (64) no es válida para las variantes con Ser_{CAT} ya que dentro de todas las posibilidades que se evaluaron en esta tesis un mecanismo que incluya la Ser_{CAT} desprotonada no es posible.

4.2. Influencia de residuos de la tercera esfera de coordinación del T2 en las propiedades moleculares y espectroscópicas de la enzima. Variante K305M

El diseño de esta variante fue planeado con el objetivo de evaluar la influencia de residuos de la tercera esfera de coordinación en las propiedades estructurales, funcionales y espectroscópicas de la enzima. La Lys305 se encuentra ubicada en la tercera esfera de coordinación del centro catalítico T2 e interacciona con el Glu_{CAT} (Glu315) que a su vez interacciona con la His342 coordinada al Cu del T2 (Figura 7). Estas características hacen que la mutación puntual de la Lys305 sea un experimento válido para evaluar los aspectos mencionados anteriormente. En un trabajo previo (73) se realizó una mutación puntual en el Glu_{CAT} con el objetivo de evaluar si el reemplazo de un residuo ácido por uno no polar (Ala) producía alguna alteración en el potencial de reducción del T2. Tal como esperado el potencial de reducción del centro T2 incrementó debido a la menor densidad de carga negativa del entorno. En el presente trabajo se planteó el reemplazo de la Lys305 (un residuo básico) por Met (un residuo no polar), con el objetivo de analizar la influencia de este aminoácido en el potencial de reducción.

4.2.1. Optimización de la expresión de la variante K305M en su forma soluble y activa

En lo que se refiere a lo experimental, la preparación del plásmido con la mutación puntual se logró sin mayores inconvenientes. Sin embargo, al momento de optimizar la producción y aislamiento de la variante K305M surgieron innumerables inconvenientes que requirieron un extenso período de trabajo. A continuación, se describen las estrategias planteadas para superar los inconvenientes que se presentaron. La documentación de las diferentes metodologías empleadas tiene como objetivo producir un material que sea de utilidad en otros procesos de optimización que podrán ser realizados a futuro.

Como punto de partida se comenzó usando como células de expresión *E.coli* BL21 (DE3) crecidas en dos medios de cultivo diferentes (LB y Terrific Broth (TB)), induciendo a 25 °C con diferentes concentraciones de IPTG (0, 0.025, y 0.05 mM) y evaluando la expresión a diferentes tiempos de inducción (1 a 5 h). Aunque el resultado observado fue una elevada expresión de la variante (Figura 29), la misma se encontraba en cuerpos de inclusión.

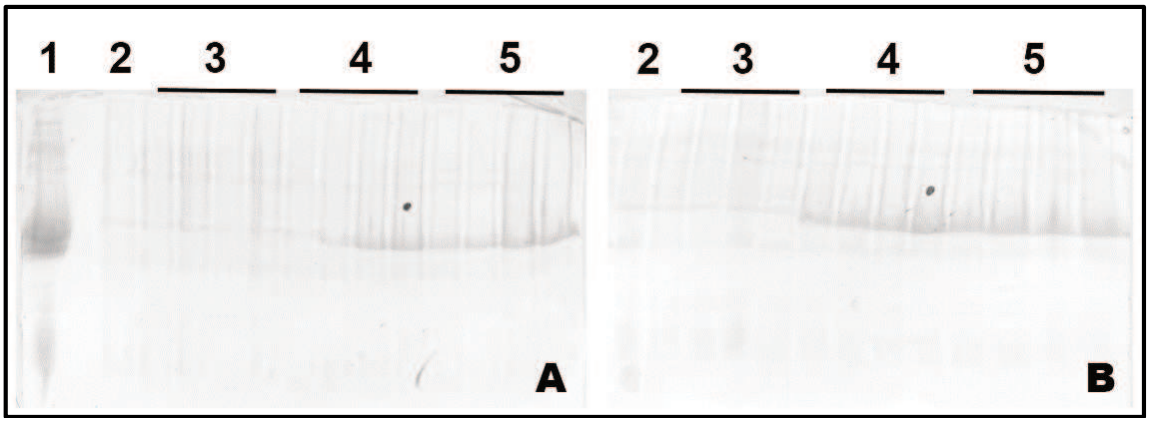


Figura 29. *Evaluación del nivel de expresión de la variante K305M mediante SDS-PAGE.* Los paneles A y B corresponden a células crecidas en medio TB y LB, respectivamente. Muestra conteniendo D134S (1), extracto total de células antes de inducir (2), con 0 mM (3), 0.025 mM (4) y 0.05 mM (5) de IPTG. Las cuatro calles correspondientes a la inducción con diferentes concentraciones de IPTG corresponden a tiempos de inducción de 1, 3, 4 y 5 h (de izquierda a derecha).

Algunas de las razones por las cuales las proteínas son encapsuladas en cuerpos de inclusión son la excesiva cantidad de las mismas en la célula (sobreexpresión) así como el plegamiento incorrecto. Por este motivo, la estrategia siguiente fue usar dos tipos de células (BL21 (DE3) y BL21 Gold) y agregar $CuSO_4$ (200 µM) disminuyendo al mínimo la concentración de inductor (0.025 mM IPTG) y el tiempo de inducción (Figura 30). La incorporación temprana de cobre en la estructura puede aumentar la estabilidad de la variante probablemente promoviendo el plegamiento. Cabe recordar que para producir la forma salvaje y la variante D134S no es indispensable que el medio de cultivo se suplemente con cobre para obtener una enzima soluble y estable. A pesar de los cambios introducidos, la variante se mantuvo en cuerpos de inclusión. En la misma línea de razonamiento, se realizó una prueba con células BL21 (DE3) inducidas con 0.025 mM de IPTG tan solo por 2 h. Aunque en estas condiciones se observó actividad enzimática, la proteína permanecía insoluble.

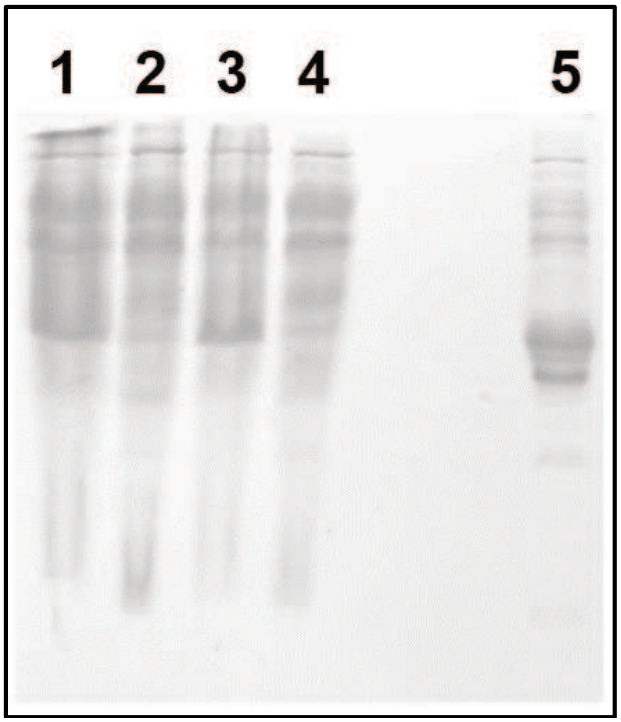


Figura 30. *Evaluación del nivel de expresión de la variante K305M en diferentes cepas de E. coli con menor tiempo de inducción.* La expresión de K305M se evaluó en las cepas BL21 (DE3) (1 y 2) y BL21 Gold (3 y 4). Las calles 1 y 3 muestran el patrón proteico en células totales, mientas que las calles 2 y 4 el correspondiente extracto soluble. En la calle 5 se incluyó una muestra conteniendo la variante D134S como marcador.

Seguidamente se trabajó con Lemo21 (DE3), una cepa de *E. coli* utilizada en casos en los cuales la solubilidad de la proteína *target* es una dificultad a superar. En este caso también se evaluaron diferentes concentraciones de inductor (0.05, 0.1 y 0.5 mM IPTG) y tiempos de inducción (1, 3 y 16 h). Las condiciones 0.05 mM IPTG y tiempo de inducción 3 y 16 h dieron como resultado un nivel de expresión aceptable (no mostrado). Por este motivo se procedió a realizar crecimientos en estas condiciones, pero con el agregado de glicerol (0, 5, 10 y 20 mM) y en presencia y ausencia de $CuSO_4$ (300 µM). La adición de glicerol en el medio de cultivo (y posteriormente en todo el proceso de purificación y acondicionamiento de la enzima) resultó en una mejora en la estabilidad de K305M. El mecanismo de acción de este aditivo se basa en aumentar las interacciones hidrofóbicas que previenen la agregación de las proteínas. Los resultados del ensayo se muestran en la figura 31.

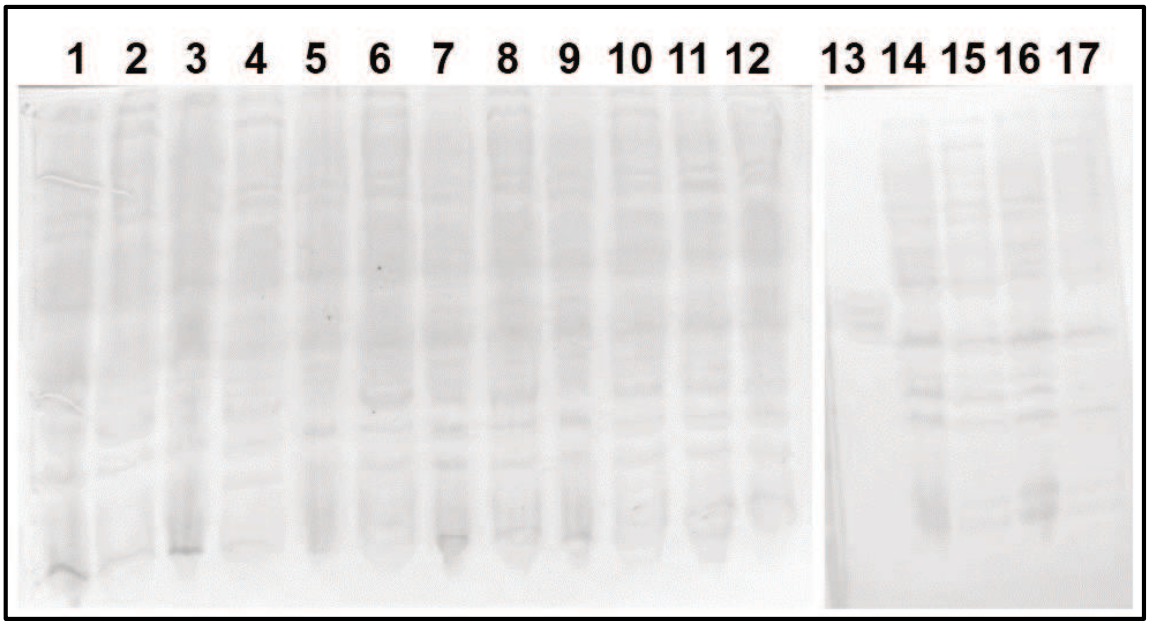


Figura 31. *Evaluación de la expresión de K305M variando la concentración de glicerol y en presencia y ausencia de $CuSO_4$.* Patrón proteico de células totales crecidas en medio de cultivo suplementado con (1) 5 mM glicerol, inducción por 3h, (2) 5 mM glicerol, inducción por 16 h, (3) 5 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$ inducción por 3 h, (4) 5 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 16 h, (5) 10 mM glicerol, inducción por 3h, (6) 10 mM glicerol, inducción por 16 h, (7) 10 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 3 h, (8) 10 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 16 h, (9) 20 mM glicerol, inducción por 3h, (10) 20 mM glicerol, inducción por 16 h, (11) 20 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 3 h, (12) 20 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 16 h, (13) Variante D134S, (14) 300 µM $CuSO_4$, inducción por 3 h, (15) 300 µM $CuSO_4$, inducción por 16 h, (16) 20 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 3 h, (17) 20 mM glicerol y 300 µM $CuSO_4$, inducción por 16 h.

De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió realizar un crecimiento en mediana escala en el cual el medio de cultivo estaba suplementado con 300 µM $CuSO_4$ y 20 mM glicerol e inducir la expresión de la variante por 3 h. Las células obtenidas en estas condiciones fueron sometidas a un protocolo para obtención del extracto soluble el cual fue dializado por 16 h contra un tampón conteniendo 300 µM $CuSO_4$ y 20 mM glicerol. La actividad de la variante se evaluó en el extracto soluble antes y después de la diálisis (Figura 32). Bajo estas condiciones, aunque la proteína se encontraba en la parte soluble y estaba activa, la cantidad y estabilidad de la misma no fue suficiente para aislarla por un proceso de purificación.

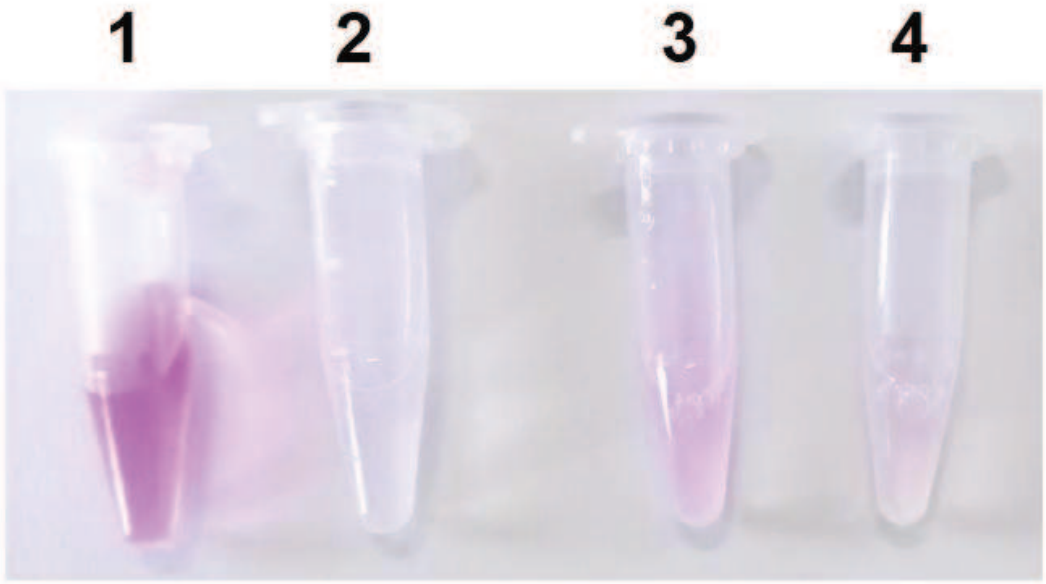


Figura 32. *Ensayos de actividad enzimática de la variante K305M*. Los tubos muestran el resultado de ensayos sin enzima (1), con enzima *Sm*NirK de tipo salvaje usada como control positivo (2), con extracto soluble antes y después de diálisis (3 y 4, respectivamente).

En esta etapa del trabajo las dificultades encontradas para obtener cantidad suficiente de proteína soluble y estable aún estaban poco resueltas. Se procedió, por lo tanto, a agregar $CuSO_4$ (100 µM) desde el inicio del cultivo y a inducir la expresión cuando la DO del cultivo alcanzara un valor de 0.8 en lugar de 0.4 a 0.6. Esta modificación tuvo como objetivos: 1) disponibilizar cobre en el interior de la célula para que la proteína pueda incorporarlo en su estructura con mayor facilidad y favorecer el plegamiento correcto en el interior de la célula y 2) aumentar la biomasa para incrementar la cantidad de proteína *target*. Además, durante el proceso de purificación se agregó glicerol (20 mM) en todos los tampones. El resultado de esta experiencia fue una proteína activa, aunque aún sin el grado de pureza suficiente para realizar posteriormente los estudios planteados.

Siendo que en este punto el problema de la estabilidad estaba parcialmente resuelto, se modificó el protocolo de manera de obtener mayor cantidad de biomasa en el momento de la inducción. Brevemente, la modificación realizada fue aumentar el tiempo de producción de biomasa a 24 h previo a la inducción. La inducción de la proteína se realizó por un corto periodo de tiempo (30 y 60 min) y con mayor concentración de IPTG (0.5 mM). Los resultados mostraron que el tiempo de inducción fue insuficiente para la producción de la variante ya que durante el proceso de purificación la cantidad de proteína no permitió realizar todos los pasos necesarios para obtenerla pura.

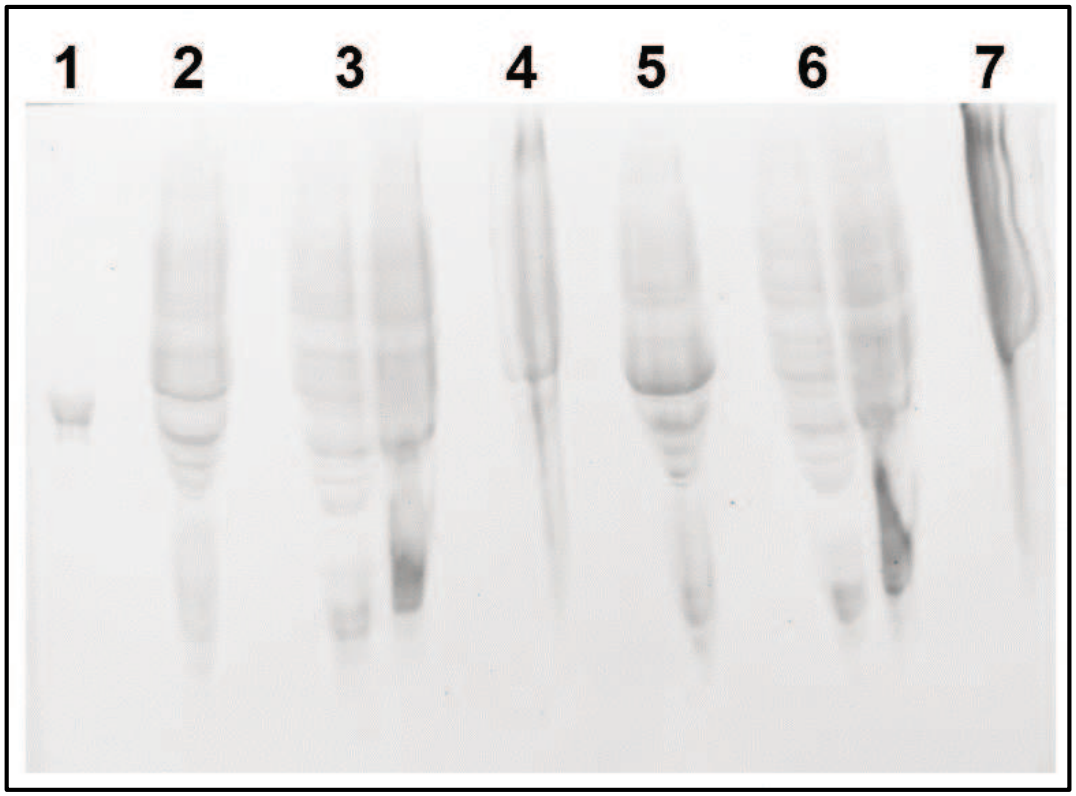


Figura 33. *Evaluación de la expresión en tiempo de inducción reducido.* (1) *Sm*NirK de tipo salvaje usada como marcador, (2) extracto total de células inducidas durante 30 min, (3) extracto soluble de células inducidas durante 30 min, (4) extracto insoluble de células inducidas durante 30 min, (5) extracto total de células inducidas durante 1 h, (6) extracto soluble de células inducidas durante 1 h, y (7) extracto insoluble de células inducidas durante 1 h.

El paso siguiente se basó en el artículo de Oganesyan *et al.* (98) en el que se demostraba que el aumento de la fuerza iónica en el medio de cultivo aumentaba la estabilidad de las proteínas. Por lo tanto, se trabajó con medio de cultivo LB y medio salino-mínimo suplementado con 500 mM NaCl. El medio LB se suplemento además con tampón 40 mM KPB para mantener el pH durante el cultivo. De acuerdo con trabajos publicados en la literatura (99–101), el cultivo de células y la inducción de la expresión de proteínas bajo estrés osmótico causado por la presencia de sorbitol, sacarosa, etanol, glicina betaina o NaCl incrementa el nivel de proteínas solubles. En general, las bacterias se adaptan a las condiciones de estrés osmótico acumulando osmolitos. Los osmolitos son compuestos orgánicos pequeños que pueden actuar como chaperonas químicas incrementando la estabilidad de las proteínas recombinantes y probablemente colaborando en el plegamiento de polipéptidos (98). Con esta modificación se observó que la cantidad de proteína en el soluble aumentaba, aunque el tiempo de inducción continuaba siendo insuficiente.

Se hizo una última adaptación, de acuerdo con el protocolo Cai *et al.* (76), usando dos tipos de células (BL21 (DE3) y Lemo21 (DE3)), donde el preinóculo fue cultivado en medio LB suplementado con NaCl y glicerol para luego realizar la producción de

biomasa en el mismo medio suplementado con $CuSO_4$. La inducción de la variante se hizo cambiando el medio de cultivo a medio salino-mínimo suplementado con NaCl, glicerol, $CuSO_4$ y con una concentración de IPTG de 0.5 mM. En la sección de materiales y métodos se pueden encontrar más detalles del protocolo seguido. Los resultados mostraron que las células BL21 (DE3) crecidas en estas condiciones constituían un mejor sistema de expresión. Por lo tanto, estas fueron las condiciones elegidas para la producción de la variante K305M. Realizando el cultivo bajo estas condiciones se obtuvieron aproximadamente 10 g de células/L de medio. La tabla 7 resume todas las condiciones evaluadas y descriptas en esta sección.

Tabla 7: Optimización de las condiciones de crecimiento y expresión de la variante K305M

Células de expresión	Medio de cultivo	Condiciones de inducción				Suplementos	Resultados
		OD	Concentración de IPTG (mM)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)		
BL21(DE3)	LB/TB	0.4-0.6	0, 0.025, 0.05	0 a 5	25	-	Sobreexpresión en células totales.
			0.025	5			Proteína localizada en cuerpos de inclusión.
			0.025	3			Expresión moderada. Proteína localizada en cuerpos de inclusión.
BL21 (DE3)/BL21 Gold	LB		0.025			200 µM $CuSO_4$	Proteína localizada en cuerpos de inclusión.
BL21 (DE3)				2			Variante activa. Proteína localizada en cuerpos de inclusión.
Lemo21 (DE3)			0.05, 0.1, 0.5	1, 3 y ON		-	Sobreexpresión. Mínima cantidad de enzima en el extracto soluble
		>0.6	0.05	3 y ON		con y sin 300 µM $CuSO_4$ 5, 10 y 20 mM glicerol	Expresión moderada.
			0.05	3 y ON		300 µM $CuSO_4$ con y sin 20 mM glicerol	Expresión moderada.
		>0.6 crecimiento de 16h	0.5	0.5 y 1	30	20 mM Glicerol 300 µM $CuSO_4$	Aumento de la cantidad de proteína en el extracto soluble.
		0.8		1		20 mM glicerol 300 µM $CuSO_4$ 500mM NaCl 40mM KPB	Aumento de la expresión en medios con NaCl. Aumento de la cantidad de proteína en el extracto soluble. Mejora en la estabilidad en la enzima.
	Salino-mínimo	>0.8				20 mM glicerol 300 µM $CuSO_4$ con y sin 500mM NaCl	Tiempo de inducción insuficiente.
BL21 (DE3)/Lemo21 (DE3)	LB/ Salino-mínimo			16	25	20 mM glicerol 300 µM $CuSO_4$ 500 mM NaCl	Mejores resultados en BL21 (DE3) Proteína activa y en el soluble. Proteína más estable aunque no lo suficiente para realizar los ensayos propuestos.

La sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* lleva en muchos casos al plegamiento incorrecto y agregación en cuerpos de inclusión. Por este motivo se plantearon diversas estrategias direccionadas a regular la producción y promover el plegamiento correcto. Luego de realizar varios estudios, se llegó a la conclusión que la incorporación temprana de cobre en la estructura aumentaba la estabilidad de la variante probablemente promoviendo el plegamiento. Cabe recordar que la producción de la forma salvaje y D134S no necesita que el medio de cultivo se suplemente con $CuSO_4$ para obtener una enzima soluble y estable. La adición de glicerol en el medio de cultivo y en todo el proceso de purificación y acondicionamiento de la enzima también resultó en una mejora en la estabilidad de K305M. El mecanismo de acción de este aditivo se basa en aumentar las interacciones hidrofóbicas que previenen la agregación de las proteínas. Otro de los suplementos que mejoraron la estabilidad de la K305M fue el NaCl en una concentración de 500 mM.

4.2.2. Purificación de la variante K305M.

La optimización del proceso de purificación de la variante K305M también implicó diversas pruebas utilizando diferentes resinas y tampones. Los detalles de este proceso no serán descriptos y solo se incluye el protocolo con mejores resultados.

La figura 34 muestra el perfil electroforético del extracto soluble, y las fracciones obtenidas luego del primer y segundo paso de purificación. El rendimiento del proceso fue de aproximadamente 4 mg de proteína/L de cultivo, muy inferior comparado con el correspondiente a la proteína de tipo salvaje.

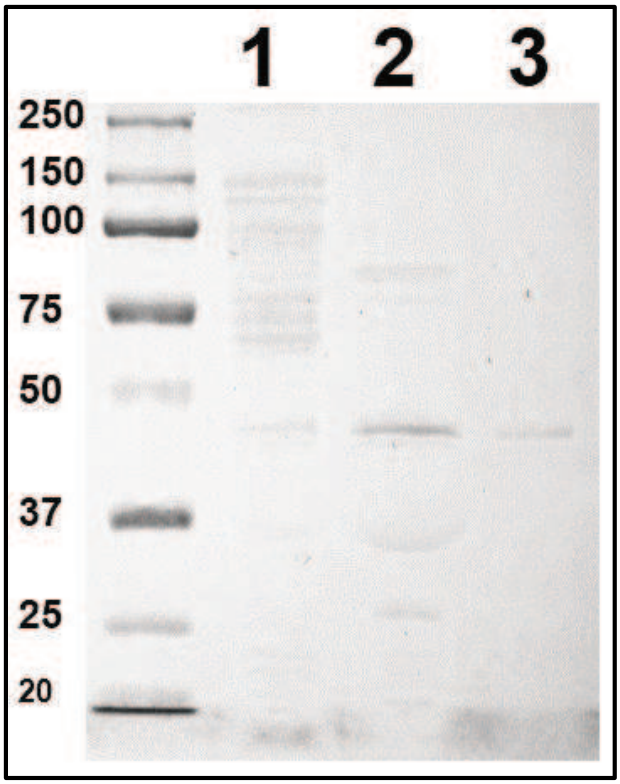


Figura 34. *Perfil electroforético en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%* del (1) extracto soluble, (2) fracción obtenida luego de DEAE Sepharose FF y (3) fracción obtenida luego de Superdex 75. Los marcadores de masa molecular se indican en kDa y fueron obtenidos de BIO-RAD (Precision plus protein all blue standards).

4.2.3. Propiedades moleculares y espectroscópicas

La variante K305M en su forma *as-purified* presenta un color verde amarillento (Figura 35, cuadro a la derecha) y el análisis por SDS-PAGE muestra una banda que corresponde a una masa molecular de ~40 kDa como esperado (Figura 34). La cromatografía de exclusión molecular utilizada para evaluar la composición de subunidades mostró dos picos correspondientes a una masa de ~110 y ~40 kDa. Este perfil cromatográfico sugiere que la estabilidad de la enzima queda comprometida con la mutación puntual realizada. Se observa también un hombro en el pico correspondiente a ~110 kDa que podría corresponder a un dímero de la proteína.

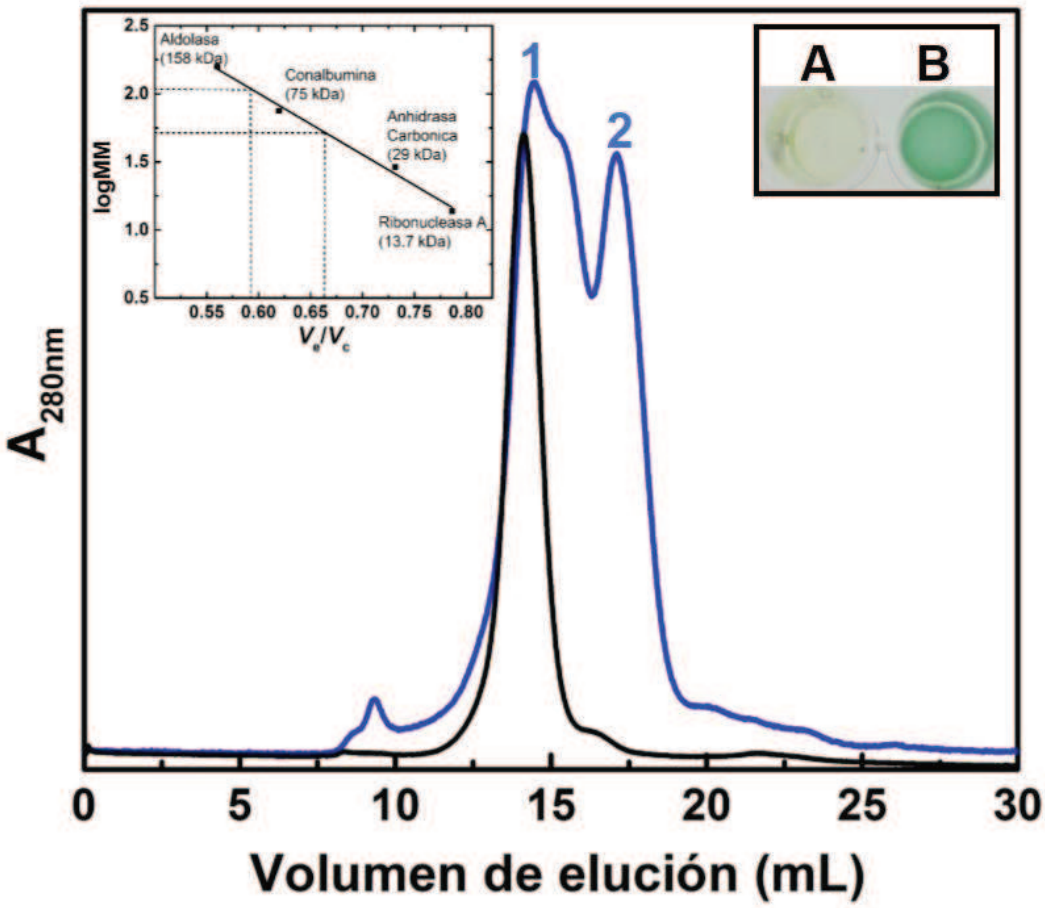


Figura 35. *Cromatografía de exclusión molecular para determinación de masa molecular aparente de K305M (línea azul) y forma salvaje (línea negra) de SmNirK.* Se incluye la curva de calibrado utilizada para determinar la masa molecular aparente de la variante. En el recuadro derecho se muestran la variante (A) y la forma salvaje de la enzima (B).

Los datos obtenidos hasta el momento muestran que el reemplazo de la Lys305 por Met genera una variante poco estable con cambios no solo en el entorno del T2 sino en el núcleo catalítico en su totalidad. No obstante, la evaluación de la actividad de la enzima por métodos colorimétricos muestra que la variante K305M puede catalizar la reducción de nitrito. Esta actividad se va perdiendo a lo largo del proceso de purificación de la enzima, apoyando aún más la observación de que la estabilidad de la enzima se ve comprometida con la mutación puntual realizada.

La figura 36 muestra el espectro UV-vis de la variante (línea azul) y de la enzima en su forma salvaje (línea negra). Como puede observarse, la mutación realizada induce un cambio profundo en el espectro UV-vis en comparación con la forma salvaje. La variante posee un centro de cobre con características más cercanas al T1 de tipo azul evidenciado por la presencia de una banda de absorción en ~600 nm. El mayor ancho de dicha banda muestra que este centro posee características muy peculiares. Además, la K305M puede catalizar la reducción de nitrito mostrando la existencia de un centro T2. Los resultados muestran que, aunque el reemplazo haya sido realizado en el entorno

del T2, la coordinación del cobre del T1 es afectada. La causa de este efecto puede deberse tanto a una modificación del entorno del núcleo catalítico (T1-T2) como a la inestabilidad estructural causada por el reemplazo de la Lys por Met.

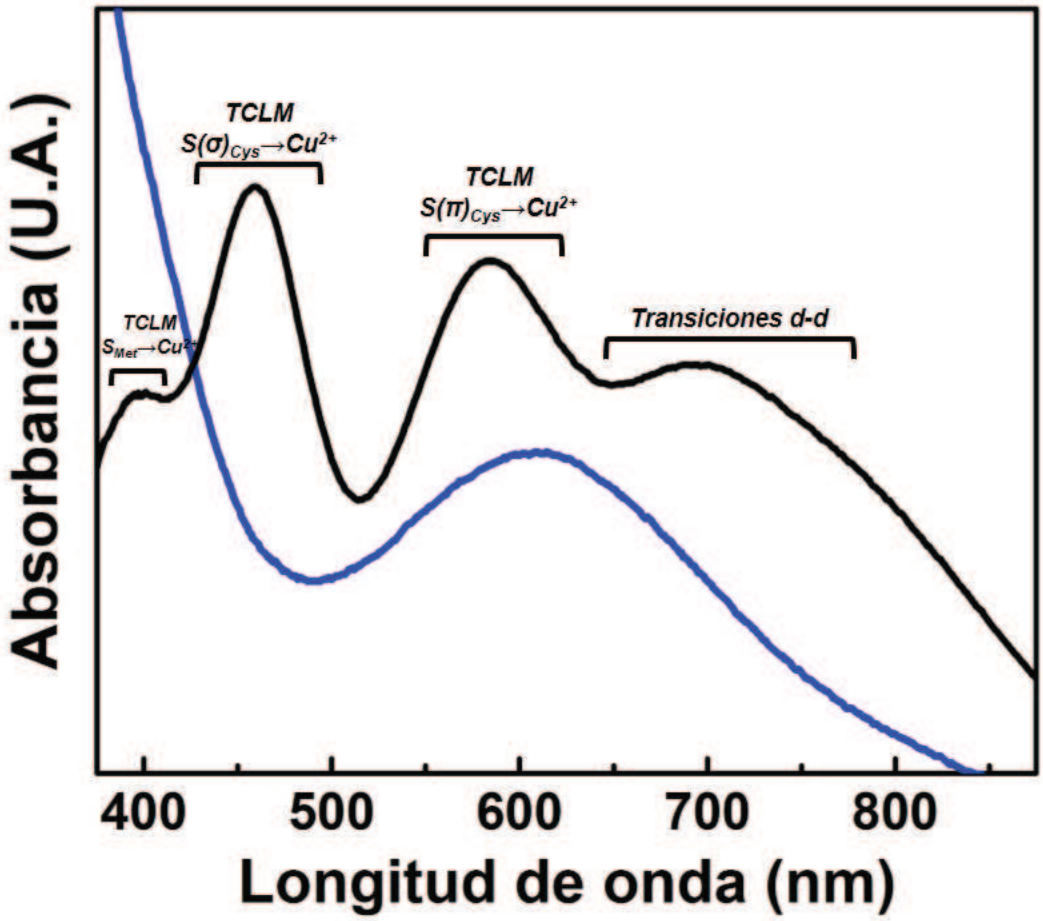


Figura 36. *Espectro UV-vis del pool obtenido luego del segundo paso de purificación*. Enzima salvaje (línea negra) y variante K305M (línea azul).

5. CONCLUSIONES

Esta tesis se enmarca dentro de un grupo de investigación dedicado a caracterizar enzimas de la vía desnitrificante de rizobacterias, no solo en la forma salvaje sino también en variantes de estas. El objetivo es entender el rol de residuos clave en catálisis enzimática que lleven a comprender más profundamente los mecanismos de reacción.

Este trabajo se focalizó en el estudio de la *Sm*NirK, la enzima que cataliza el segundo paso en la vía de desnitrificación del ciclo del nitrógeno en la rizobacteria *Sinorhizobium meliloti* 2011. La relevancia de estos estudios es aportar mediante investigación básica conocimientos con impacto no solo en ciencias básicas, sino también en problemáticas medioambientales, económicas y de salud pública. Con este objetivo en mente, se estudiaron dos variantes en las que se reemplazaron residuos de segunda y tercera esfera de coordinación del T2.

La variante D134S fue diseñada con el objetivo de evaluar la influencia de un residuo de la segunda esfera de coordinación en la catálisis enzimática, el potencial de reducción y las características espectroscópicas y estructurales. El Asp_{CAT} es parte del denominado *sensing loop* y se postula que es capaz de sensar la unión del sustrato al centro T2 y de esta forma disparar el proceso de transferencia electrónica entre el centro T1 y T2. Las concusiones más importantes de esta tesis son: 1) Se logró producir y purificar a grado electroforético una variante soluble y con cobre en ambos centros, 2) Se logró una variante activa, aun reemplazando un residuo que es muy relevante en el mecanismo catalítico con cadena lateral cargada negativamente por un residuo con cadena lateral neutra, 3) Se verificó que la estabilidad y eficiencia catalítica de la variante son influenciadas por el pH, 4) Se modificaron profundamente las características espectroscópicas de la enzima en el entorno del T2, 5) Se demostró que la menor eficiencia catalítica de la variante no se debe ni a la dificultad en incorporar cobre ni a la pérdida de las propiedades ácido-base del Asp_{CAT}. A diferencia de lo que se observa en la enzima salvaje, el grupo hidroximetilo de la Ser_{CAT} interacciona simultáneamente con el W_{ap} y W_{br} en el estado *resting* y no interacciona con el W_{br} en la forma unida al sustrato (Figura 28), 6) Se modificó el potencial de reducción del T2 en las dos condiciones de pH estudiada, demostrando la importancia de los ligandos de la segunda esfera de coordinación en la modulación de este parámetro, 7) Se demostró que la falta de actividad de la enzima en condiciones de pH alto no está relacionada con un $\Delta E_{m\ T1\text{-}T2}$ desfavorable sino que podría estar asociada a una combinación de varios fenómenos entre los que se incluyen menor estabilidad, desprotonación de residuos relevantes en la catálisis, cambios en la red de puentes de hidrógeno en el canal de sustrato e

interacciones intraproteína. Todos estos factores combinados podrían afectar la regeneración del sitio activo para recomenzar un ciclo catalítico.

En nuestra opinión los resultados obtenidos han aportado al entendimiento a nivel molecular de características importantes de la catálisis, no obstante, consideramos que son necesarios realizar más estudios estructurales para confirmar algunas de las hipótesis planteadas que aún pueden ser discutidas.

Con respecto a la variante K305M se encontraron resultados inesperados que dificultaron la realización de los estudios planteados inicialmente. No obstante, las conclusiones más importantes fueron: 1) Se consiguió obtener una enzima soluble y con un grado de pureza tal que, una vez que se obtenga en mayor cantidad, se podrán realizar los estudios planteados, 2) Se lograron identificar suplementos que aumentan la estabilidad de la enzima e implementarlos durante la producción y aislamiento de la variante, 3) Se observó que una de las principales consecuencias de reemplazar la Lys305 por Met es la producción de una variante inestable que puede presentarse en varias conformaciones (trímeros, monómeros y probablemente dímeros), 4) Se logró incorporar cobre en los dos centros, como se evidencia en el espectro UV-vis (T1) y en la capacidad de reducir nitrito (T2), 5) Se indujeron cambios profundos en el centro T1 como lo demuestra la comparación del espectro UV-vis de la K305M con el de la forma salvaje. La causa de este efecto puede deberse tanto a una modificación del entorno del núcleo catalítico (T1-T2) como a la inestabilidad causada por el reemplazo de la Lys por Met.

Indudablemente quedaron por realizar una gran parte de los estudios planteados inicialmente para esta variante. Sin embargo, el proceso de optimización de la producción de K305M aportó conocimiento sobre diversos protocolos que tienen como objetivo mejorar el plegamiento y la estabilidad de proteínas y que podrán ser futuramente utilizados en el laboratorio. La continuación del estudio de K305M incluye su producción en mayor escala para obtener una cantidad de proteína suficiente para el estudio de los centros T1 y T2 por EPR, determinar los potenciales de reducción de los centros mediante titulación UV-vis y EPR, realizar estudios de estabilidad por DSF y determinar los parámetros cinéticos que caracterizan a esta variante.

Finalmente, los trabajos planteados en esta tesis muestran que hay ligandos de la tercera esfera que cumplen un importante rol estructural y que son esenciales para la estabilidad de la enzima, mientras que hay otros que regulan parámetros fisicoquímicos como el potencial de reducción de los centros (observaciones del grupo no publicadas). Los resultados más concluyentes son evidentemente los obtenidos de la D134S, que

mostraron que la función del Asp_{CAT}, puede ser suplida por un residuo no cargado. Las connotaciones de este hallazgo no son solo relevantes en biología, sino también en química de coordinación, ya que es notable que un ligando de la segunda esfera de coordinación del T2 determine tan significativamente sus propiedades electrónicas. Para cerrar, pensamos que los resultados que se reportan abren muchísimos interrogantes sobre el rol de residuos que se asumen cumplen un rol pasivo en la estructura de esta enzima y de proteínas redox en general.

Bibliografía

1. Martínez-Espinosa RM, Cole JA, Richardson DJ, Watmough NJ. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. Biochem Soc Trans. 1 de febrero de 2011;39(1):175-8.
2. Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. Nat Rev Microbiol. mayo de 2018;16(5):263-76.
3. Stein LY, Klotz MG. The nitrogen cycle. Curr Biol. febrero de 2016;26(3):R94-8.
4. Thomson AJ, Giannopoulos G, Pretty J, Baggs EM, Richardson DJ. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 5 de mayo de 2012;367(1593):1157-68.
5. González PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD, Moura JJG. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. J Inorg Biochem. mayo de 2006;100(5-6):1015-23.
6. Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol Biol Rev. diciembre de 1997;61(4):533-616.
7. Merkle AC, Lehnert N. Binding and activation of nitrite and nitric oxide by copper nitrite reductase and corresponding model complexes. Dalton Trans. 2012;41(12):3355-68.
8. Shiro Y. Structure and function of bacterial nitric oxide reductases. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. octubre de 2012;1817(10):1907-13.
9. Brown K, Djinovic-Carugo K, Haltia T, Cabrito I, Saraste M, Moura JoséJG, et al. Revisiting the Catalytic CuZ Cluster of Nitrous Oxide (N2O) Reductase. J Biol Chem. diciembre de 2000;275(52):41133-6.
10. Brown K, Tegoni M, Prudêncio M, Pereira AS, Besson S, Moura JJ, et al. A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. Nat Struct Biol. 1 de marzo de 2000;7(3):191-5.
11. Moura I, Moura JJG. Structural aspects of denitrifying enzymes. Curr Opin Chem Biol. abril de 2001;5(2):168-75.
12. Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. Science. 16 de mayo de 2008;320(5878):889-92.

13. Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W. How a century of ammonia synthesis changed the world. Nat Geosci. octubre de 2008;1(10):636-9.

14. Tavares P, Pereira AS, Moura JJG, Moura I. Metalloenzymes of the denitrification pathway. J Inorg Biochem. diciembre de 2006;100(12):2087-100.

15. Moura I, Moura JJG, Pauleta SR, Maia LB, editores. Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts [Internet]. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2016 [citado 5 de marzo de 2025]. (Metallobiology). Disponible en: https://books.rsc.org/books/monograph/565/

16. Rana A, Pandey RK, Ramakrishnan B. Enzymology of the nitrogen cycle and bioremediation of toxic nitrogenous compounds. En: Smart Bioremediation Technologies [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 5 de marzo de 2025]. p. 45-61. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128183076000032

17. 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. 26 de julio de 1991;253(5018):438-42.

18. 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 1 1Edited by R. Huber. J Mol Biol. septiembre de 1998;282(2):369-82.

19. Murphy MEP, Turley S, Kukimoto M, Nishiyama M, Horinouchi S, Sasaki H, et al. Structure of Alcaligenes faecalis Nitrite Reductase and a Copper Site Mutant, M150E, That Contains Zinc. Biochemistry. 26 de septiembre de 1995;34(38):12107-17.

20. Kukimoto M, Nishiyama M, Murphy MEP, 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. 1 de mayo de 1994;33(17):5246-52.

21. Adman ET, Godden JW, Turley S. The Structure of Copper-nitrite Reductase from Achromobacter cycloclastes at Five pH Values, with NO-2 Bound and with Type II Copper Depleted. J Biol Chem. noviembre de 1995;270(46):27458-74.

22. Antonyuk SV, Strange RW, Sawers G, Eady RR, Hasnain SS. Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. Proc Natl Acad Sci. 23 de agosto de 2005;102(34):12041-6.

23. 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. noviembre de 2021;30(11):2310-23.

24. Jacobson F, Guo H, Olesen K, Ökvist M, Neutze R, Sjölin L. Structures of the oxidized and reduced forms of nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 at high pH: changes in the interactions of the type 2 copper. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1 de septiembre de 2005;61(9):1190-8.

25. 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. abril de 2003;328(2):429-38.

26. Nojiri M. CHAPTER 5. Structure and Function of Copper Nitrite Reductase. En: Moura I, Moura JJG, Pauleta SR, Maia LB, editores. Metallobiology [Internet]. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2016 [citado 5 de marzo de 2025]. p. 91-113. Disponible en: https://books.rsc.org/books/monograph/565/chapter-abstract/239663/

27. Hadt RG, Gorelsky SI, Solomon EI. Anisotropic Covalency Contributions to Superexchange Pathways in Type One Copper Active Sites. J Am Chem Soc. 22 de octubre de 2014;136(42):15034-45.

28. Strange RW, Murphy LM, Dodd FE, Abraham ZHL, Eady RR, Smith BE, et al. Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase. J Mol Biol. abril de 1999;287(5):1001-9.

29. Boulanger MJ, Kukimoto M, Nishiyama M, Horinouchi S, Murphy MEP. Catalytic Roles for Two Water Bridged Residues (Asp-98 and His-255) in the Active Site of Copper-containing Nitrite Reductase. J Biol Chem. agosto de 2000;275(31):23957-64.

30. Boulanger MJ, Murphy MEP. Directing the mode of nitrite binding to a copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: Characterization of an active site isoleucine. Protein Sci. febrero de 2003;12(2):248-56.

31. Kobayashi K, Tagawa S, Deligeer, Suzuki S. The pH-Dependent Changes of Intramolecular Electron Transfer on Copper-Containing Nitrite Reductase. J Biochem (Tokyo). 1 de agosto de 1999;126(2):408-12.

32. Suzuki S, Kataoka K, Yamaguchi K, Inoue T, Kai Y. Structure–function relationships of copper-containing nitrite reductases. Coord Chem Rev. septiembre de 1999;190-192:245-65.

33. 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 Nitri Reductase. J Biochem (Tokyo). 1 de febrero de 2000;127(2):345-50.

34. Kataoka K, Yamaguchi K, Suzuki S. Spectroscopic and Electrochemical Properties of Cytochrome *c* 551 from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051. Bull Chem Soc Jpn. 1 de agosto de 2000;73(8):1839-40.

35. Abraham ZHL, Lowe DJ, Smith BE. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. Biochem J. 15 de octubre de 1993;295(2):587-93.

36. 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. 15 de enero de 2001;353(2):259-66.

37. 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. julio de 2005;350(2):300-9.

38. Abraham ZeldaHL, Smith BarryE, Howes BarryD, Lowe DavidJ, Eady RobertR. pH-dependence for binding a single nitrite ion to each type-2 copper centre in the copper-containing nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans*. Biochem J. 1 de junio de 1997;324(2):511-6.

39. Dodd FE, Hasnain SS, Hunter WN, Abraham ZHL, Debenham M, Kanzler H, et al. Evidence for Two Distinct Azurins in Alcaligenes xylosoxidans (NCIMB 11015): Potential Electron Donors to Nitrite Reductase. Biochemistry. 15 de agosto de 1995;34(32):10180-6.

40. 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. 1 de diciembre de 2020;12(12):2084-97.

41. Zumft WG, Gotzmann DJ, Kroneck PMH. Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. Eur J Biochem. octubre de 1987;168(2):301-7.

42. Van Pouderoyen G, Mazumdar S, Hunt NI, Hill HAO, Canters GW. The introduction of a negative charge into the hydrophobic patch of *Pseudomonas aeruginosa* azurin affects the electron self-exchange rate and the electrochemistry. Eur J Biochem. junio de 1994;222(2):583-8.

43. 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. 1 de abril de 1998;37(17):6086-94.

44. 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. 1 de junio de 2002;41(23):7464-74.

45. 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. JBIC J Biol Inorg Chem. abril de 1997;2(2):265-74.

46. Kohzuma T, Dennison C, McFarlane W, Nakashima S, Kitagawa T, Inoue T, et al. Spectroscopic and Electrochemical Studies on Active-site Transitions of the Type 1 Copper Protein Pseudoazurin from Achromobacter cycloclastes. J Biol Chem. octubre de 1995;270(43):25733-8.

47. Kukimoto M, Nishiyama M, Ohnuki T, Turley S, Adman ET, Horinouchi S, et al. Identification of interaction site of pseudoazurin with its redox partner, copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6. Protein Eng Des Sel. 1995;8(2):153-8.

48. Wijma HJ, Boulanger MJ, Molon A, Fittipaldi M, Huber M, Murphy MEP, et al. Reconstitution of the Type-1 Active Site of the H145G/A Variants of Nitrite Reductase by Ligand Insertion. Biochemistry. 1 de abril de 2003;42(14):4075-83.

49. 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 (Tokyo). 1981;89(2):453-61.

50. Kukimoto M, Nishiyama M, Tanokura M, Adman ET, Horinouchi S. Studies on Protein-Protein Interaction between Copper-containing Nitrite Reductase and Pseudoazurin from Alcaligenes faecalis S-6. J Biol Chem. junio de 1996;271(23):13680-3.

51. 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. septiembre de 2012;114:8-14.

52. 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. JBIC J Biol Inorg Chem. agosto de 2014;19(6):913-21.

53. 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. enero de 2021;7(1):eabd8523.

54. 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. 1 de enero de 1996;118(33):7755-68.

55. 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. 1 de febrero de 2004;104(2):419-58.

56. 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. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj. marzo de 2018;1862(3):752-60.

57. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. Chem Rev. 1 de enero de 1996;96(7):2239-314.

58. Ellis MJ, Grossmann JG, Eady RR, Hasnain SS. Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. JBIC J Biol Inorg Chem. 15 de octubre de 2007;12(8):1119-27.

59. Nojiri M, Xie Y, Inoue T, Yamamoto T, Matsumura H, Kataoka K, et al. Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. Proc Natl Acad Sci. 13 de marzo de 2007;104(11):4315-20.

60. Tsuda A, Ishikawa R, Koteishi H, Tange K, Fukuda Y, Kobayashi K, et al. Structural and mechanistic insights into the electron flow through protein for cytochrome c-tethering copper nitrite reductase. J Biochem (Tokyo). julio de 2013;154(1):51-60.

61. Opperman DJ, Murgida DH, Dalosto SD, Brondino CD, Ferroni FM. A three-domain copper-nitrite reductase with a unique sensing loop. IUCrJ. 1 de marzo de 2019;6(2):248-58.

62. Hough MA, Conradie J, Strange RW, Antonyuk SV, Eady RR, Ghosh A, et al. Nature of the copper-nitrosyl intermediates of copper nitrite reductases during catalysis. Chem Sci. 2020;11(46):12485-92.

63. Eady RR, Samar Hasnain S. New horizons in structure-function studies of copper nitrite reductase. Coord Chem Rev. junio de 2022;460:214463.

64. 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. 15 de marzo de 2016;113(11):2928-33.

65. Suzuki S, Kohzuma T, Deligeer, Yamaguchi K, Nakamura N, Shidara S, et al. Pulse Radiolysis Studies on Nitrite Reductase from Achromobacter cycloclastes IAM 1013: Evidence for Intramolecular Electron Transfer from Type 1 Cu to Type 2 Cu. J Am Chem Soc. noviembre de 1994;116(24):11145-6.

66. Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Bioenerg. agosto de 1985;811(3):265-322.

67. Formosinho SJ, Barroso M, editores. Proton-coupled electron transfer: a carrefour of chemical reactivity traditions. Cambridge: Royal Soc. of Chemistry; 2012. 157 p. (RSC catalysis series).

68. Marcus RA. Enzymatic catalysis and transfers in solution. I. Theory and computations, a unified view. J Chem Phys. 21 de noviembre de 2006;125(19):194504.

69. Marcus RA. Summarizing lecture: factors influencing enzymatic H-transfers, analysis of nuclear tunnelling isotope effects and thermodynamic versus specific effects. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 29 de agosto de 2006;361(1472):1445-55.

70. González PJ, Rivas MG, Ferroni FM, Rizzi AC, Brondino CD. Electron transfer pathways and spin–spin interactions in Mo- and Cu-containing oxidoreductases. Coord Chem Rev. diciembre de 2021;449:214202.

71. Pinho D, Besson S, Brondino CD, De Castro B, Moura I. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135: Evidence for modulation of the rate of intramolecular electron transfer through nitrite binding to the type 2 copper center. Eur J Biochem. junio de 2004;271(12):2361-9.

72. 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. 1 de abril de 1998;37(17):6095-105.

73. Duré AB. Propiedades magnéticas y transferencia electrónica en la nitrito reductasa de cobre de Ensifer meliloti y su relación con la catálisis enzimática [Internet]. UNL; 2023. Disponible en: https://hdl.handle.net/11185/7295

74. Altschul SF, Lipman DJ. Protein database searches for multiple alignments. Proc Natl Acad Sci. julio de 1990;87(14):5509-13.

75. Thompson JD, Gibson TobyJ, Higgins DG. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. Curr Protoc Bioinforma [Internet]. enero de 2003;00(1). Disponible en: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0203s00

76. Cai M, Huang Y, Yang R, Craigie R, Clore GM. A simple and robust protocol for high-yield expression of perdeuterated proteins in Escherichia coli grown in shaker flasks. J Biomol NMR. octubre de 2016;66(2):85-91.

77. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expr Purif. mayo de 2005;41(1):207-34.

78. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. agosto de 1970;227(5259):680-5.

79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. noviembre de 1951;193(1):265-75.

80. Hanna PM, Tamilarasan R, McMillin DR. Cu(I) analysis of blue copper proteins. Biochem J. 15 de diciembre de 1988;256(3):1001-4.

81. 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. 1 de septiembre de 2004;43(35):11214-25.

82. Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. J Magn Reson. enero de 2006;178(1):42-55.

83. Ida S. Purification to Homogeneity of Spinach Nitrite Reductase by Ferredoxin-Sepharose Affinity Chromatography. J Biochem (Tokyo). septiembre de 1977;82(3):915-8.

84. Ferroni FM, Rivas MG, Rizzi AC, Lucca ME, Perotti NI, Brondino CD. Nitrate reduction associated with respiration in Sinorhizobium meliloti 2011 is performed by a membrane-bound molybdoenzyme. BioMetals. octubre de 2011;24(5):891-902.

85. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nat Protoc. septiembre de 2007;2(9):2212-21.

86. Huynh K, Partch CL. Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. Curr Protoc Protein Sci [Internet]. febrero de 2015 [citado 6 de marzo de 2025];79(1). Disponible en: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps2809s79

87. Bhayani JA, Ballicora MA. Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. Biochem Biophys Res Commun. enero de 2022;590:1-6.

88. Duré AB, Cristaldi JC, Guevara Cuasapud LA, Dalosto SD, Rivas MG, Ferroni FM, et al. 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. J Inorg Biochem. abril de 2023;241:112155.

89. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman. Gaussian˜16 Revision C.01 [Internet]. 2016. Disponible en: https://gaussian.com/citation/

90. 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.

91. 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. mayo de 1995;117(19):5179-97.

92. Cristaldi J. Clonado, expresión, caracterización molecular y fisicoquímica de enzimas involucradas en la etapa de desnitrificación del ciclo del nitrógeno [Internet]. UNL; 2019. Disponible en: http://hdl.handle.net/11185/1214

93. Halsted TP, Yamashita K, Gopalasingam CC, Shenoy RT, Hirata K, Ago H, et al. Catalytically important damage-free structures of a copper nitrite reductase obtained by femtosecond X-ray laser and room-temperature neutron crystallography. IUCrJ. 1 de julio de 2019;6(4):761-72.

94. Halsted TP, Yamashita K, Hirata K, Ago H, Ueno G, Tosha T, et al. An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase. IUCrJ. 1 de enero de 2018;5(1):22-31.

95. Jacobson F, Pistorius A, Farkas D, De Grip W, Hansson Ö, Sjölin L, et al. pH Dependence of Copper Geometry, Reduction Potential, and Nitrite Affinity in Nitrite Reductase. J Biol Chem. marzo de 2007;282(9):6347-55.

96. Rose SL, Hough MA, Antonyuk SV, Eady RR, Hasnain SS. Copper-Containing Nitrite Reductase. En: Scott RA, editor. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry [Internet]. 2.ª ed. Wiley; 2022 [citado 6 de marzo de 2025]. p. 1-14. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119951438.eibc2821

97. Rose SL, Ferroni FM, Horrell S, Brondino CD, Eady RR, Jaho S, et al. Spectroscopically Validated pH-dependent MSOX Movies Provide Detailed Mechanism of Copper Nitrite Reductases. J Mol Biol. septiembre de 2024;436(18):168706.

98. Oganesyan N, Ankoudinova I, Kim SH, Kim R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. Protein Expr Purif. abril de 2007;52(2):280-5.

99. Thomas JG, Baneyx F. Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant Escherichia coli Cells Overexpressing Heat-shock Proteins. J Biol Chem. mayo de 1996;271(19):11141-7.

100. Blackwell JR, Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. FEBS Lett. 16 de diciembre de 1991;295(1-3):10-2.

101. Bowden GA, Georgiou G. The Effect of Sugars on β-Lactamase Aggregation in *Escherichia coli*. Biotechnol Prog. junio de 1988;4(2):97-101.