



Plan de Gestión de Datos

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1. – Datos del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

METALOENZIMAS DE LOS CICLOS DEL CARBONO Y NITROGENO: CORRELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE CENTROS METALICOS REDOX.

- Título del Proyecto (en inglés)

Metalloenzymes of the carbon and nitrogen cycles: correlation between structure and physicochemical properties of the metal redox centers

- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El estudio de los ciclos del nitrógeno (N) y del carbono (C) realizados por bacterias es un campo de investigación multidisciplinario que involucra diversas áreas científicas. Uno de los puntos más relevantes de la interacción entre estos dos ciclos es la modulación que realizan sobre la respuesta de los ecosistemas al cambio climático global, lo cual está relacionado con los distintos procesos redox catalizados por las metaloenzimas participantes.

Estudiaremos a nivel molecular el mecanismo catalítico de dos metaloenzimas redox involucradas en esos ciclos, los caminos químicos de transferencia electrónica de estas proteínas redox mediante el empleo de sistemas modelo, y el mecanismo de incorporación del ion Mo dentro de la célula bacteriana para su inserción en proteínas dependientes de este metal. Las metaloenzimas se obtendrán de rizobacterias dado su extenso uso como bioinoculantes en agricultura y por su implicancia en la producción de gases de efecto invernadero. Para el ciclo del N se estudiará la enzima de Cu nitrito reductasa (NirK), que cataliza la reducción de NO₂⁻ a NO. Para el ciclo del C, se estudiará la enzima de Mo formato deshidrogenasa (Fdh), que cataliza la oxidación de ácido fórmico a CO₂. También se estudiará el sistema de transporte ModABC, clave para asimilar Mo y por ende Fdh activas.

El trabajo a realizar contempla el uso de técnicas de biología molecular, bioquímicas, espectroscópicas, (espectro)electroquímicas, estructurales y cálculos computacionales, que serán usadas para caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los centros metálicos y los caminos de transferencia electrónica intra e interproteína. Dado que los metales presentes en los sistemas a investigar son paramagnéticos en ciertos estados de oxidación, y que además pueden presentar interacciones magnéticas débiles, utilizaremos la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) para su estudio. Estos estudios en proteínas serán complementados con estudios estructurales, espectroscópicos, magnéticos y de EPR en sistemas inorgánicos simples que contengan metales de transición paramagnéticos unidos por caminos químicos que modelen los caminos de transferencia electrónica en metaloenzimas redox. El estudio integrado de metaloenzimas y sistemas modelo junto con el de las proteínas transportadoras de metales es importante para entender, por ejemplo, como se produce la emisión de gases de efecto invernadero por bacterias presentes en los suelos de cultivo.

- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

The study of the nitrogen (N) and carbon (C) cycles performed by bacteria is a multidisciplinary field of research that involves various scientific areas. One of the most relevant points of the interaction between these two cycles is the modulation they perform on the response of ecosystems to global climate change, which is related to the different redox processes catalyzed by the metalloenzymes participating in these cycles.

We will study at molecular level the catalytic mechanism of two metalloenzymes involved in these cycles, the electron transfer pathways of these redox proteins by mean of model systems, and the Mo ion incorporation mechanism inside the bacterium cell for its insertion in Mo-dependent proteins. The metalloenzymes will be obtained from rhizobacteria given their extensive use as bioinoculants in agriculture and because of their implication in the production of greenhouse gases. For the N-cycle, the Cu-containing enzyme nitrite reductase (NirK), which catalyzes the reduction of NO₂⁻ to NO, will be studied. For the C-cycle, the Mo-containing enzyme formate dehydrogenase (Fdh), which catalyzes the



oxidation of formic acid to CO₂, will be studied. The ModABC transport system, key to assimilate Mo and to produce active Fdh, will also be studied.

The work to be performed contemplates the use of molecular biology, biochemical, spectroscopic, (spectro)electrochemical, structural and computational calculation techniques, which will be used to characterize the physicochemical properties of metal centers and electron transfer pathways. Since the metals present in the systems to be investigated are paramagnetic in certain oxidation states, which can also present weak magnetic interactions between them, we will use extensively the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique. The studies on proteins will be complemented with structural, spectroscopic, magnetic and EPR studies in simple inorganic systems containing paramagnetic transition metals connected by chemical pathways that model electron transfer pathways found in redox metalloenzymes. The integrated study of metalloenzymes and model systems together with that of metal transport proteins are important to understand, for example, greenhouse gas emission performed by bacteria living in agriculture soils.

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)

metaloenzimas	centros metálicos	RPE
---------------	-------------------	-----

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)

metaloenzymes	metal centers	EPR
---------------	---------------	-----

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

Carlos Dante Brondino

- Unidad Académica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

- Teléfono oficial de contacto

+54 342 4575213

-Teléfono móvil de contacto

+54 342 4214611

-E-mail del Director/a del Proyecto

brondino@fbc.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describe la toma de muestras / datos a realizar

Las muestras de proteína serán producidas a partir de organismos nativos y recombinantes. Los organismos nativos, serán cultivados en las condiciones que evidencien mayor expresión de las proteínas de interés. En el caso de proteínas producidas de forma heteróloga, se prepararán constructos con los que se transformarán células de expresión, se optimizarán las condiciones de producción y se realizarán cultivos a mediana escala. En ambos casos las células serán separadas del medio de cultivo por centrifugación. El extracto proteico será obtenido mediante lisis celular por sonicación, centrifugación para separar lo soluble de la fracción insoluble y por último las proteínas de interés serán aisladas por técnicas de cromatografía líquida (IMAC, exclusión molecular, intercambio aniónico).

Las muestras de los sistemas modelo que estudiamos consisten en monocristales, polvos policristalinos obtenidos por molienda de monocristales, y soluciones de los compuestos. Los monocristales se obtienen por evaporación lenta a temperatura ambiente de soluciones que contienen los complejos disueltos a estudiar, sintetizados a partir de los respectivos ligandos y metales de transición de interés. Los monocristales son aislados cuidadosamente para su estudio mediante espectroscopia de EPR en muestras orientadas. Todo el equipamiento necesario para realizar estos procedimientos se encuentra disponible en los laboratorios del Departamento de Física de nuestra Facultad que se describen en el punto 8 del proyecto.

Además, el material monocristalino obtenido se utiliza para obtener muestras de polvo finamente molido para realizar mediciones magnéticas como magnetización y susceptibilidad magnética. Estas mediciones se realizan en colaboración (ver descripción del proyecto), mientras que el análisis e interpretación de los datos es realizado por nosotros. Todas estas muestras también son utilizadas generalmente para realizar mediciones que se realizan a partir de servicios realizados por terceros, como por ejemplo análisis elemental, espectroscopía IR, determinación de metales por absorción atómica, UV-vis en sólidos y difracción de rayos X en muestras policristalinas.

Los datos obtenidos de los experimentos y/o mediciones nombradas anteriormente se analizan con el software correspondiente según la técnica experimental utilizada, y se racionalizan con diferentes modelos teóricos en los casos que corresponda. Esto permite obtener distintos tipos de parámetros que son de nuestro interés para el estudio de las propiedades electrónicas y magnéticas de los metales de transición presentes en los sistemas que estudiamos.



<p>- Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)</p>	
	NO
X	<p>SI. Elija una de las opciones:</p> <p>a) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes</p> <p>b) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible</p> <p>c) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación</p> <p>d) Otro. Justifique.</p> <p>Se solicita confidencialidad debido a que los resultados serán parte de una publicación científica en una revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.</p>
<p>- Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.</p> <p>Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".</p>	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
X	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos:

BRONDINO , CARLOS DANTE