

## **REDISEÑO RACIONAL DE METALOPROTEÍNAS DE COBRE: HACIA SU UTILIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE AGUA**

**Rebechi Juan**

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario – IBR - CONICET*

**Área:** Ciencias exactas

**Sub-Área:** Química

**Grupo:** Y (Becario BIT de Fundación Banco de Santa Fe)

**Palabras clave:** proteínas, producción de hidrógeno, energías renovables.

### **INTRODUCCIÓN**

Las proteínas de transferencia electrónica (TE) son fundamentales en todos los sistemas biológicos, cumpliendo importantes roles en procesos claves tales como la fotosíntesis y la respiración celular. En estos procesos de TE la naturaleza utiliza un número muy limitado de metales, siendo el cobre el segundo más importante después del hierro. Las proteínas de cobre con funciones de TE se clasifican en dos grandes familias: las que poseen centros tipo 1 (T1) y las que poseen centros  $Cu_A$ , siendo las T1 mononucleares y las  $Cu_A$  dinucleares. En ambos casos los sitios de cobre se encuentran en un plegamiento de tipo cupredoxina. El mismo está formado por 8 láminas  $\beta$  que generan un barril  $\beta$  con bucles flexibles entre ellas. Estos bucles contienen los residuos ligandos de los iones cobre. Las proteínas T1 presentan cuatro ligandos de los cuales tres se encuentran en un único bucle de longitud y composición variable. Respecto a los sitios  $Cu_A$ , cinco de los seis ligandos se encuentran en un único bucle de longitud conservada.

Históricamente, un gran desafío en el rediseño de proteínas de TE ha sido poder modular racionalmente el potencial de reducción del sitio de cobre. Dentro de este objetivo general, en el cual se ha avanzado mucho, se ha pretendido alcanzar un potencial de reducción superior a 1V. Dicho valor de potencial es requerido por importantes reacciones relacionadas a energías renovables como lo es la escisión de la molécula de agua en hidrógeno y oxígeno.

El aumento de potencial podría alcanzarse de diferentes maneras; en particular, en proteínas de cobre con sitios T1 ya se han estudiado los efectos de mutaciones puntuales en la secuencia peptídica, así como otras perturbaciones en la esfera de coordinación secundaria. Combinando éstas, se pudieron obtener potenciales de reducción en Azurina (la proteína mejor caracterizada de T1) de hasta ~800mV.

Otro tipo de perturbaciones, menos conservativas, implican el reemplazo completo del bucle que contiene los ligandos por el de otra proteína de cobre. Nuestro grupo de trabajo realizó experimentos de ingeniería de bucles, injertando los bucles de ligandos de las proteínas T1 Amicianina y Azurina en el esqueleto proteico *Tt-CuA* (en dos experimentos separados), el cual contiene un plegamiento cupredoxina pero posee un sitio binuclear. Las variantes diseñadas fueron caracterizadas por nuestro grupo de trabajo y mostraron potenciales redox de ~500mV, mucho mayores que los potenciales de las proteínas originales (~300mV). Además, mostraron una estructura electrónica

altamente distorsionada y la capacidad de unir una molécula pequeña (imidazol) directamente a los iones Cu(II) gracias a la formación de una cavidad no presente en las proteínas originales cuyos sitios metálicos se encuentran ocluidos.

En relación a las energías renovables, resulta de interés la obtención de proteínas con características catalíticas necesarias para llevar a cabo la reacción de escisión de agua. Dichas características (elevados potenciales redox y unión de ligandos exógenos) se encuentran presentes, aunque de manera incompleta en las mutantes de Azurina y Amicianina. El presente trabajo se orientó a obtener nuevas mutantes de bucle análogas a las anteriores y a realizar mutaciones puntuales sobre las nuevas mutantes con el objetivo de obtener proteínas de elevado potencial redox.

## METODOLOGÍA

Para la obtención de todas las mutantes se encargaron un total de seis genes sintéticos correspondientes a la proteína *TtCuA* con la modificación del bucle de ligandos por los bucles de seis proteínas tipo 1. La incorporación de los genes se realizó en el plásmido pET-28a(+), utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I para los cortes y la ligasa T4 para la posterior ligación. El plásmido conteniendo el gen fue transformado en la cepa BL21 de *E. Coli*, utilizando métodos estándares de transformación por cloruro de calcio.

La expresión se realizó por crecimiento del cultivo bacteriano en medio líquido LB suplido con kanamicina y posterior inducción con IPTG. La purificación se llevó a cabo mediante sucesivas etapas de emulsificación – centrifugación (eliminación de restos de bacterias y membranas celulares), precipitación con sulfato de estreptomicina – centrifugación (eliminación de ADN), elución en columna Ni-Sepharose (la proteína contiene un HisTag en uno de sus extremos, afín al ion Níquel, permitiendo separarla de otros componentes no afines al mismo) y finalmente elución en columna de exclusión molecular. La eliminación del HisTag se realizó mediante corte con trombina. Todas las etapas de la purificación fueron correctamente verificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los espectros de absorción fueron adquiridos con el equipo Jasco V-670, utilizando cámaras termostalizadas y celdas de cuarzo. Los experimentos de unión a ligandos se realizaron mediante agregados de ligando en exceso, verificando que no hubiera cambios de pH.

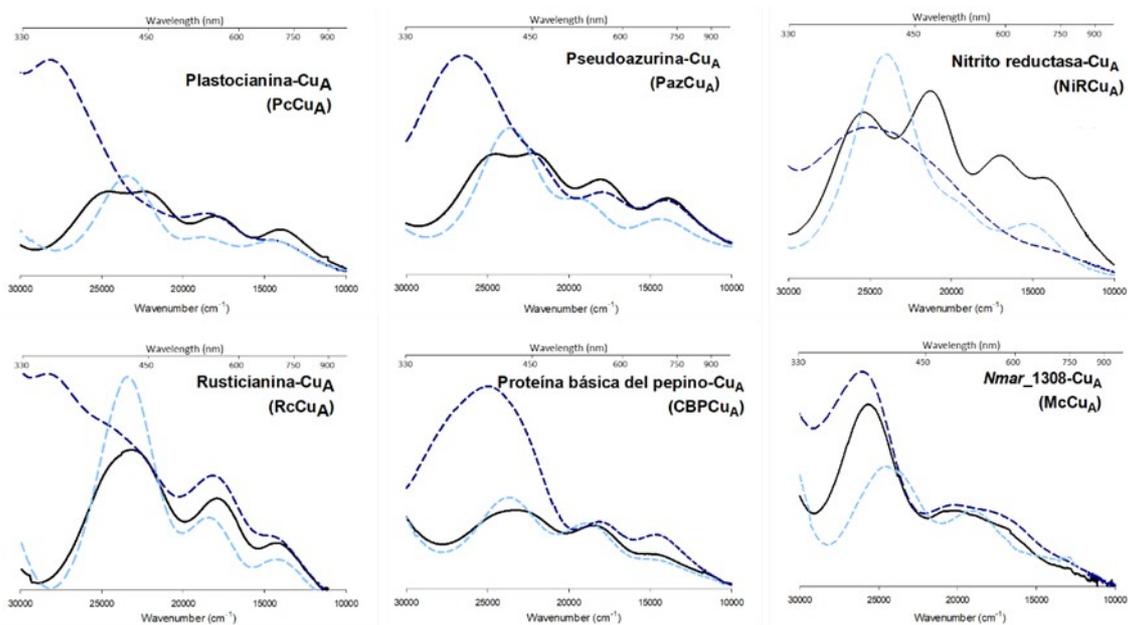
Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Daniel Murgida (Fac. Cs. Exactas y Naturales, Univ. Nac. De Buenos Aires).

## RESULTADOS

Las etapas de obtención, expresión y purificación de las proteínas en estudio pudieron desarrollarse sin problemas. Dado que dichas etapas constituyen una mera herramienta para la obtención de las proteínas, dichos resultados no se presentan en el presente resumen extendido.

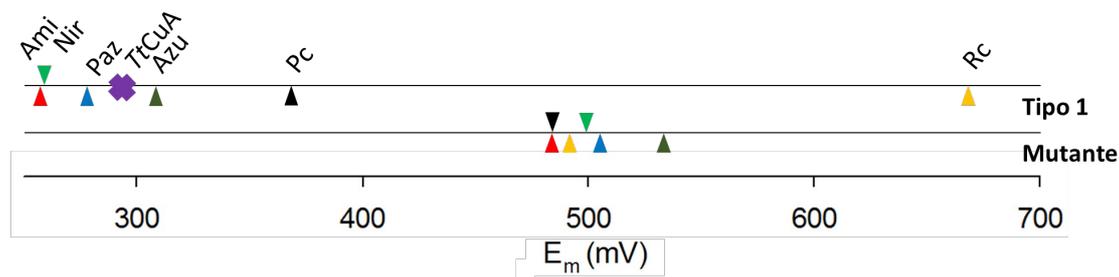
La **figura 1** muestra los resultados de las caracterizaciones espectroscópicas realizadas. Los espectros de absorción son consistentes con sitios Tipo 1 distorsionados. Esta distorsión puede evidenciarse a través del cociente entre los máximos de absorción cercanos a 450 y a 600 nm. Se considera que un sitio Tipo 1 es distorsionado cuando dicho cociente (mayor a 1 en todos los casos presentados) es mayor a 0,16. Respecto a la unión de ligandos, se observan modificaciones sustanciales en los espectros luego de la adición tanto de azida como de imidazol, indicando una modificación del sitio metálico y por lo tanto la unión de un ligando al

cobre. Luego de someter a diálisis las muestras que contenían azida o imidazol, se registraron nuevamente los espectros de absorción obteniéndose espectros idénticos a los originales. Este hecho demuestra que la unión de dichos ligandos al centro metálico es reversible.



**Figura 1:** Espectros de absorción a 20 °C (línea negra), luego de agregar exceso de imidazol (línea punteada celeste) y luego de agregar exceso de azida de sodio (línea punteada azul).

La **figura 2** muestra de manera esquemática los valores de potencial de las proteínas Tipo 1 y de sus respectivas mutantes. Dichos resultados muestran que si bien todos los potenciales son mayores que para el centro  $\text{Cu}_A$  nativo (290mV), los mismos no dependen de la identidad del bucle Tipo 1 (por ejemplo, las proteínas Rusticianina y Nitrito Reductasa poseen potenciales de reducción muy diferentes, mientras que sus mutantes se encuentran alrededor de 500mV).



**Figura 2:** Potenciales de reducción de proteínas Tipo 1 (primera fila) y de sus respectivas mutantes de bucle (segunda fila). Se incluyen Amicianina (Ami), Azurina (Azu) y la proteína  $\text{TtCu}_A$  para comparación.

Luego de generar las mutantes de bucle, el objetivo fue optimizar las mismas mediante mutaciones puntuales tendientes a aumentar aún más los potenciales de reducción. Las mismas se generaron a partir de Amicianina- $\text{Cu}_A$  (Ami- $\text{Cu}_A$ ) y Azurina- $\text{Cu}_A$  (Azu- $\text{Cu}_A$ ). Se eligió Ami- $\text{Cu}_A$  ya que se cuenta con su estructura cristalográfica

(permitiendo realizar mejores predicciones) y Azu-CuA por ser la mutante con mayor potencial redox de todas las caracterizadas. Cabe destacar que, si bien la optimización no se realizó a partir de las mutantes generadas en el presente trabajo, el estudio de las propiedades espectroscópicas y electroquímicas de un total de 8 proteínas análogas permitió obtener un mayor entendimiento del sistema y lograr una mayor racionalización de los resultados. Se diseñaron un total de 6 mutantes puntuales (3 a partir de Ami-CuA y 3 a partir de Azu-CuA). Los espectros de absorción de estas proteínas resultaron compatibles con los de sitios Tipo 1 distorsionados, mientras que los experimentos de unión a azida e imidazol mostraron que las mutantes no unen azida mientras que cuatro unen imidazol de manera reversible y dos lo hacen irreversiblemente. Los potenciales de reducción aún no han sido determinados; en caso de obtenerse en tiempo suficiente, los mismos serán presentados en la instancia de transferencia.

## CONCLUSIONES

Se logró la generación de nuevas proteínas (el set inicial de mutantes de bucle) con potenciales de reducción elevados ( $\cong 500\text{mV}$ ) y con la capacidad de unir ligandos exógenos de manera reversible. Estas son características deseables y necesarias si se pretende obtener una proteína capaz de llevar a cabo una reacción catalítica de oxidación de manera eficiente. Se precisa de una proteína con un elevado potencial de reducción ya que la dificultad en la escisión de la molécula de agua reside principalmente en la oxidación; actualmente, en la producción de hidrógeno a partir de agua, dicha oxidación suele realizarse de manera electrolítica, lo cual implica un gran gasto en términos energéticos y monetarios.

A pesar de las características promisorias de las proteínas obtenidas, sus potenciales de reducción no lograron ser lo suficientemente altos para llevar a cabo la reacción pretendida. Aún restan por determinar los potenciales de reducción de las mutantes puntuales, valores que, de ser elevados, permitirían estar un paso más cerca de lograr el objetivo del proyecto.

Por último, es importante señalar que los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un aporte significativo a la química bioinorgánica. Por un lado, resulta novedoso ya que hasta el momento no se ha reportado la transformación de una proteína de transferencia electrónica en otra con funciones catalíticas, y por otro, debido a la potencialidad de las proteínas rediseñadas para ser utilizadas en reacciones catalíticas de óxido-reducción que requieran potenciales no tan elevados como la reacción de escisión de agua.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Dennison C.**, 2005. Investigating the structure and function of cupredoxins, *Coord. Chem. Rev.*, 249, 3025-3054.

**Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu, Y.**, 2014. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron-Sulfur, or Copper Redox Centers, *Chem. Rev.*, 114, 4366-4469.

**Marshall N. M., Garner D. W., Wilson T. D., Gao Y., Robinson H., Nilges M. J., Lu, Y.**, 2010. Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range, *Nature*, 462, 113-117.