

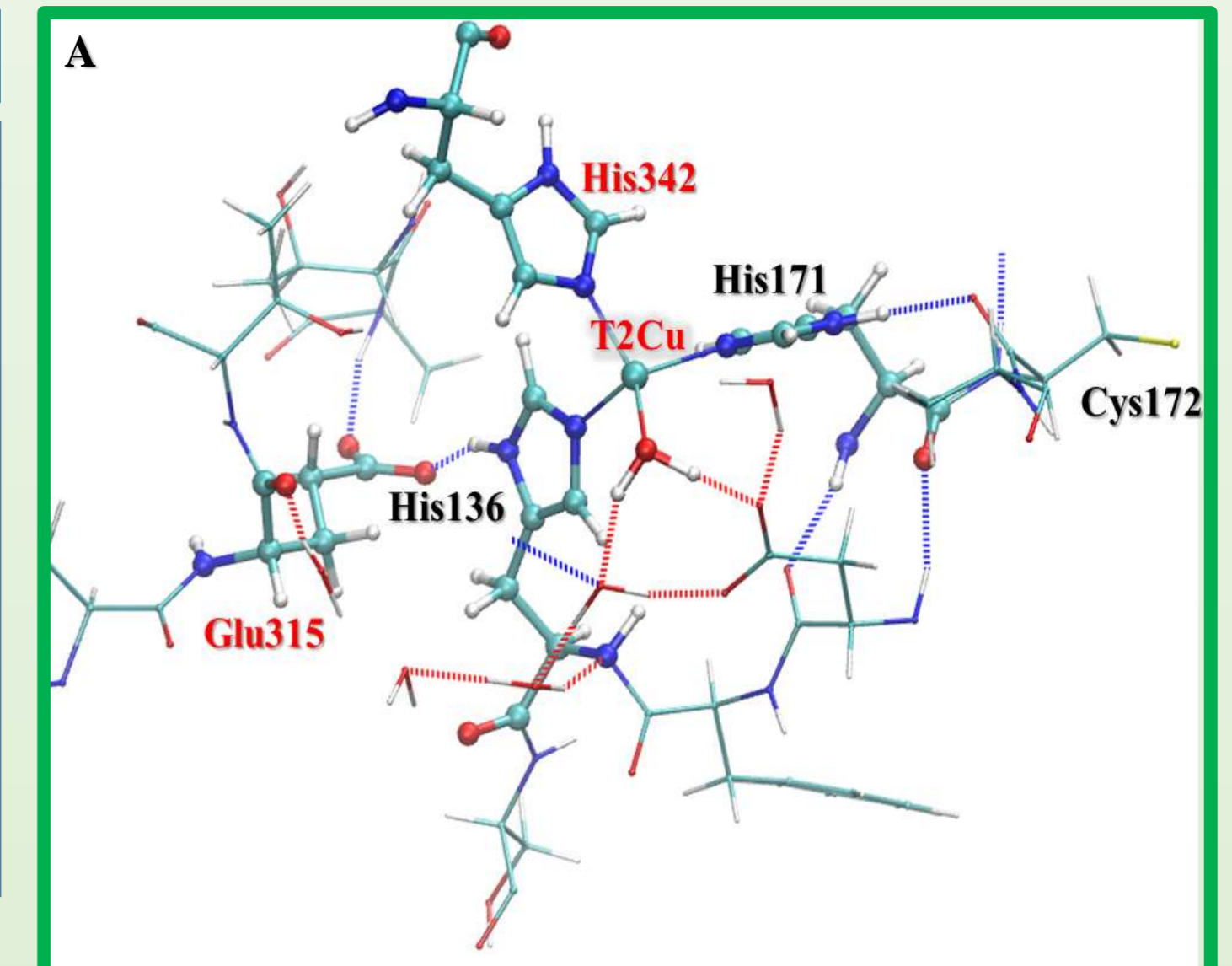
RELEVANCIA CATALÍTICA Y ESTRUCTURAL DE RESIDUOS PERTENECIENTES AL SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA NITRITO REDUCTASA DE COBRE.

Cristaldi Julio¹, Duré Andrea¹, Rivas Gabriela¹, Dalosto Sergio², Gonzalez Pablo¹, Montich Guillermo³ y Brondino Carlos¹.

1-Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL), CONICET. Santa Fe, Argentina; 2- Instituto de Física del Litoral, CONICET-UNL. Santa Fe, Argentina; 3-Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), CONICET- Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La enzima nitrito reductasa (NirK) cataliza la reducción de NO_2^- a NO , en la etapa de desnitrificación del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (N). En *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*Sm*), una bacteria aislada de nódulos presentes en cultivos de alfalfa, la reducción del NO_2^- es catalizada por una NirK (*SmNirK*) verde dependiente de cobre. *SmNirK* es un homotrímero con dos sitios de Cu por monómero, uno de tipo 1 (T1Cu, sitio de transferencia electrónica) y otro de tipo 2 (T2Cu, centro activo). Ambos sitios se encuentran conectados por un puente estructural Cys-His. El mecanismo de reacción postulado implica que el NO_2^- se une al T2Cu y luego es reducido a NO por la transferencia de un electrón, el cual es cedido por el dador fisiológico a través del T1Cu.¹ En el caso de *Sm*, el dador fisiológico de *SmNirK* es una proteína monomérica de Cu llamada pseudoazurina (*SmPaz*) de ~ 13 kDa que también contiene un centro T1Cu.² De las tres His que coordinan al Cu en el T2Cu, la His342 es la única que pertenece al monómero adyacente. Este residuo podría ser clave en la estabilidad estructural de la proteína. El Glu315 es un residuo perteneciente a la segunda esfera de coordinación del T2Cu y dada su naturaleza electrostática podría tener influencia en el potencial de reducción del centro activo.



OBJETIVOS

- 1- Obtener dos variantes de *SmNirK* modificando los aminoácidos H342 y E315
- 2- Caracterizar las dos variantes mediante técnicas moleculares, espectroscópicas y ensayos cinéticos
- 3- Estudiar la relevancia estructural y catalítica de los residuo H342 y E315

RESULTADOS

Mutagenesis sitio dirigida

Se obtuvieron dos variantes de *SmNirK* a partir de la sustitución de la His342 por una Gly (**H342G**) y del Glu315 por una Ala (**E315A**). La fig. 1 muestra los modelos estructurales de las variantes obtenidas.

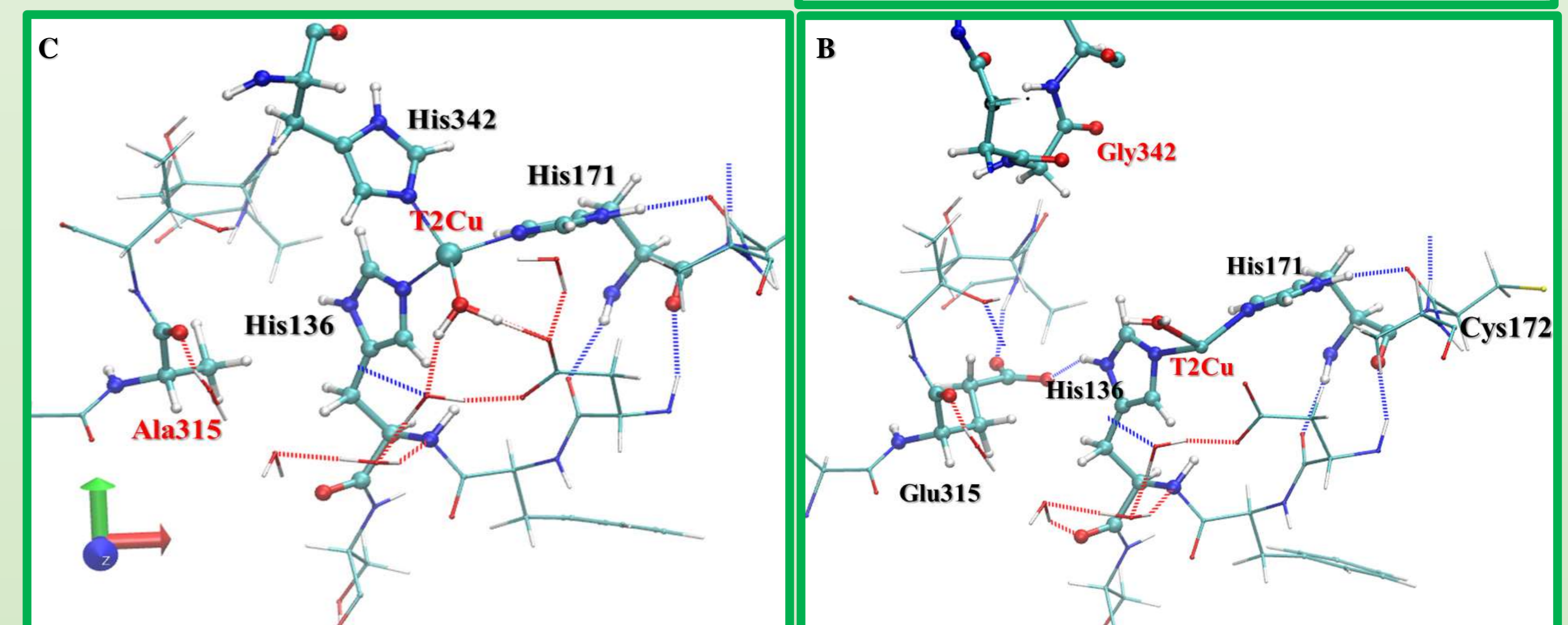


Fig. 1 Modelos estructurales del centro T2Cu de *SmNirK* (A), H342G (B) y E315A (C).

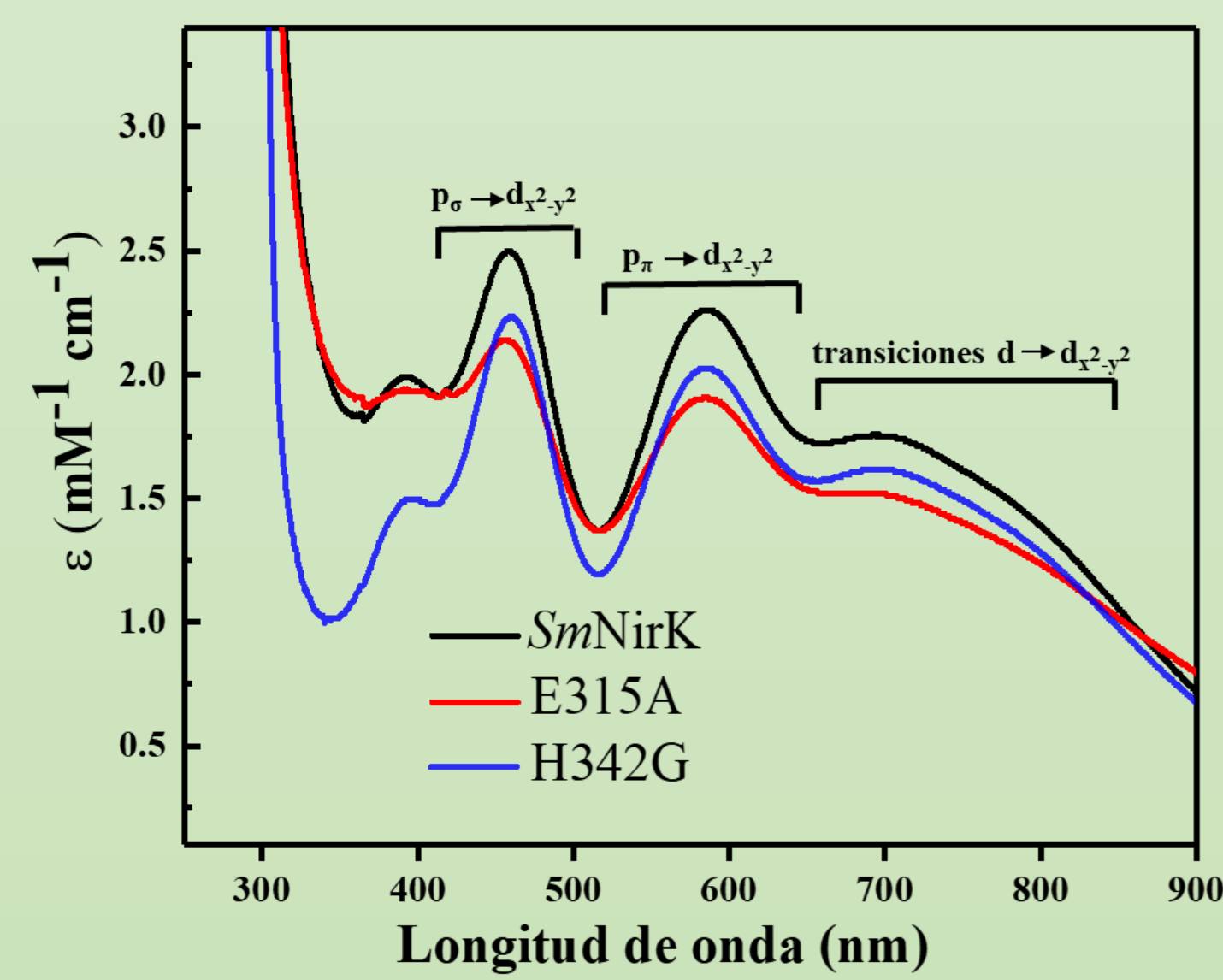


Fig. 2 espectros de absorción UV-Vis a pH 6 de *SmNirK*, H342G y E315A

Caracterización molecular

Ambas variantes presentan una estructura homotrimerica con 2 átomos de Cu por monómero, resultados similar a los obtenidos para *SmNirK*.

Caracterización espectroscópica

Las Fig. 2 muestra los espectro de absorción UV-vis de las dos variantes junto con *SmNirK*. Las bandas de transferencia de cargas señaladas se deben a la unión Cis- Cu del T1Cu. Ambas variantes presentan espectros UV-vis similares a los de la enzima *wild type*. En la Fig. 3 se presentan los espectros de EPR para las tres proteínas. Se observan señales de EPR de los dos sitios de Cu en ambas variantes. En la figura solo se presentan los parámetros de simulación obtenidos para el T2Cu, la simulación de los T1Cu arrojaron parámetros idénticos al T1Cu de *SmNirK*. En las dos variantes los centros T1Cu no sufrieron modificaciones apreciables (UV-vis y EPR), mientras que los T2Cu presentan características espectroscópicas con leves modificaciones (EPR).

Actividad catalítica

El ensayo se realizó a pH 6, condición de actividad máxima para *SmNirK*, y utilizando a *SmPaz* como dador electrónico. Ambas variantes presentan actividad catalítica. E315A presenta niveles de actividad similares a los de la enzima *wild type*, mientras que H342G presenta actividad reducida.

Relevancia estructural de la His342

La Fig. 4 muestra ensayos de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para *SmNirK* y H342G. Ambas proteínas presentan dos transiciones. Una transición menor entre los 55 y 60 °C y otra a mayor temperatura. Para H342G la transición a mayor temperatura se observa unos 10 grados por debajo de la temperatura de transición para *SmNirK*. La estabilidad estructural de la proteína resultó afectada por la mutación. Actualmente estamos enfocando nuestros estudios empleando espectroscopía CD para revelar el origen molecular de las dos transiciones.

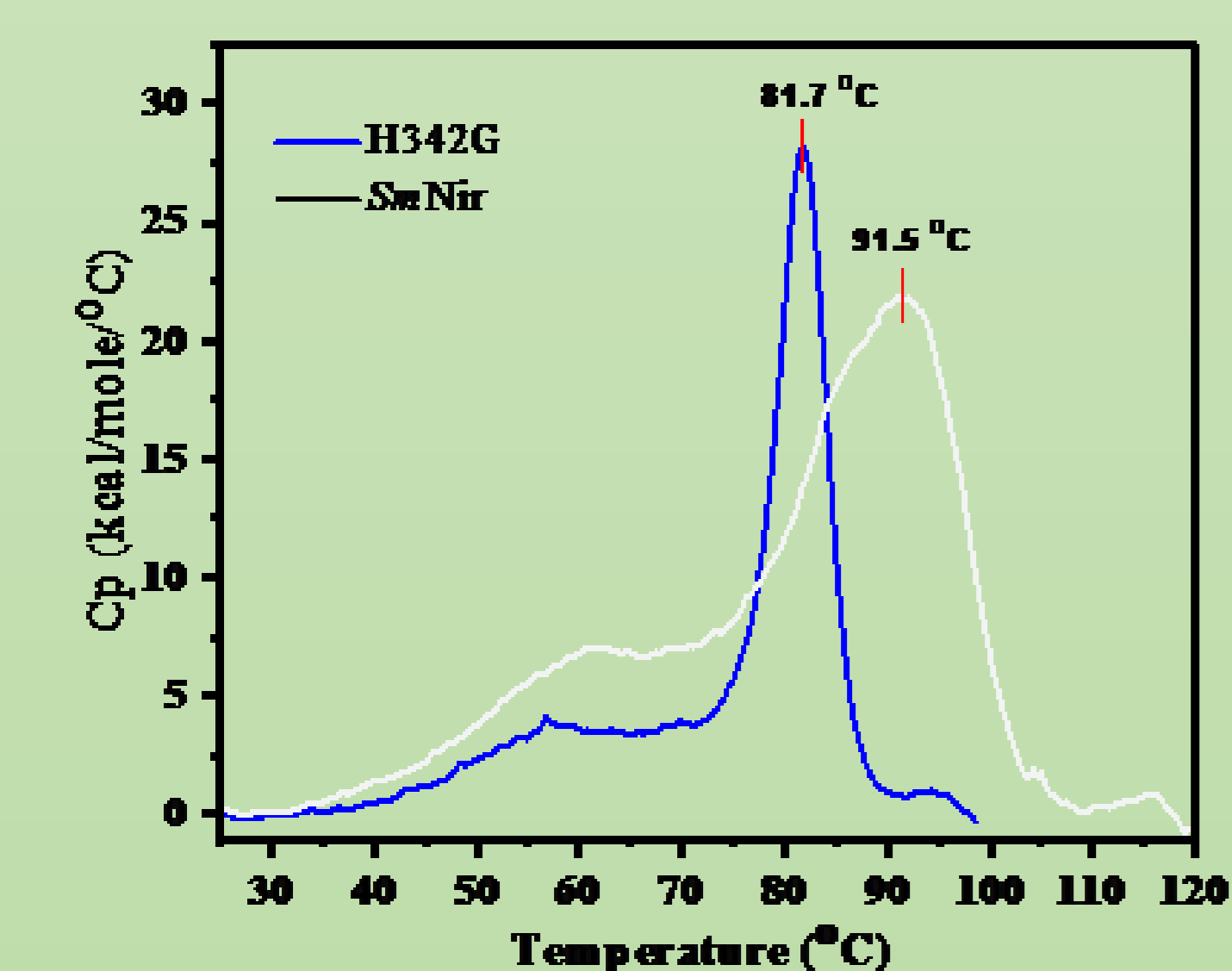


Fig. 4 Ensayo de DSC para *SmNirK* y H342G a pH 6

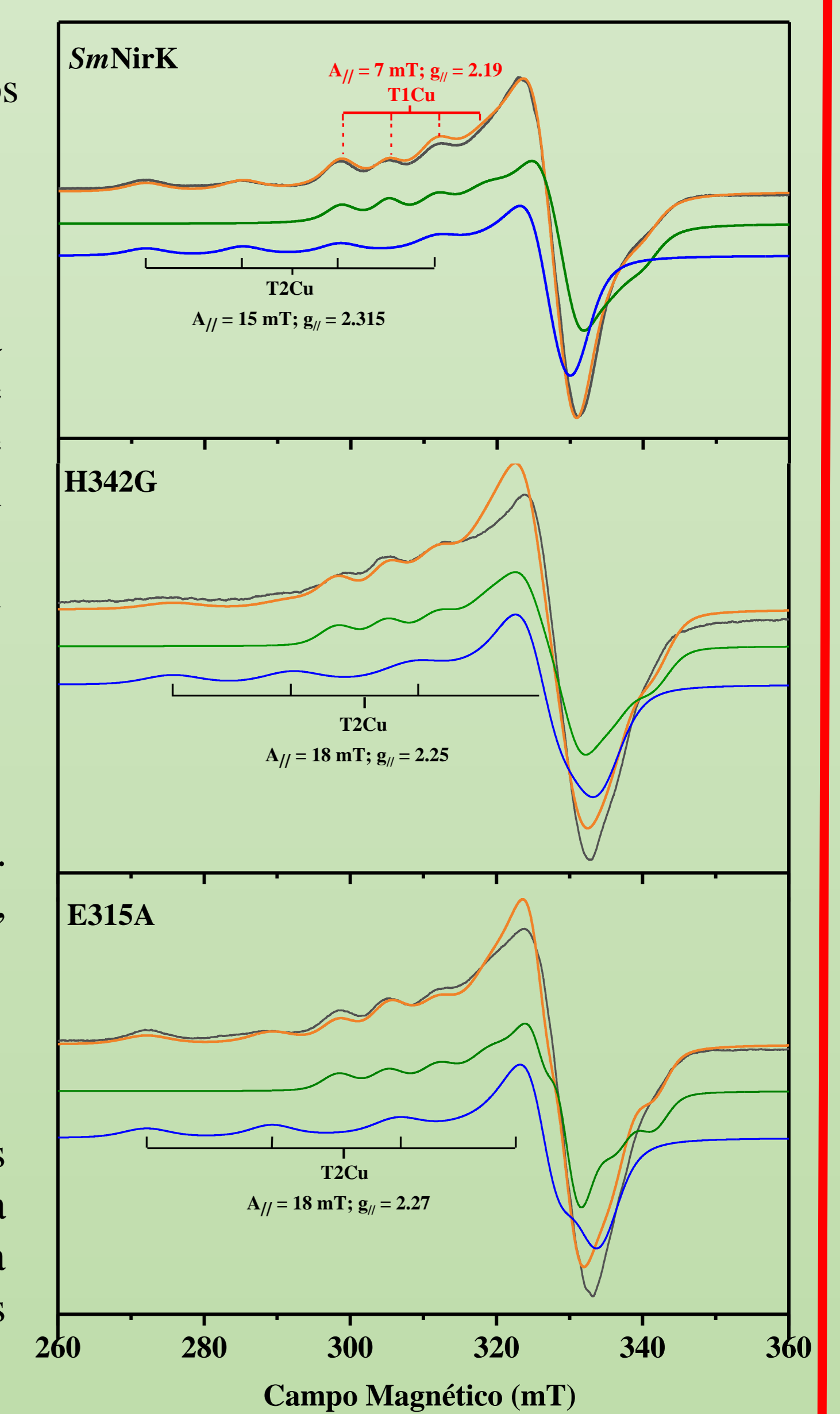


Fig. 3 Espectros de EPR a pH 6 para *SmNirK* (superior), H342G (medio) y E315A (inferior). En colores se presentan simulaciones obtenidas de los espectros. Naranja: simulación T1Cu + T2Cu, verde: T1Cu y azul T2Cu.

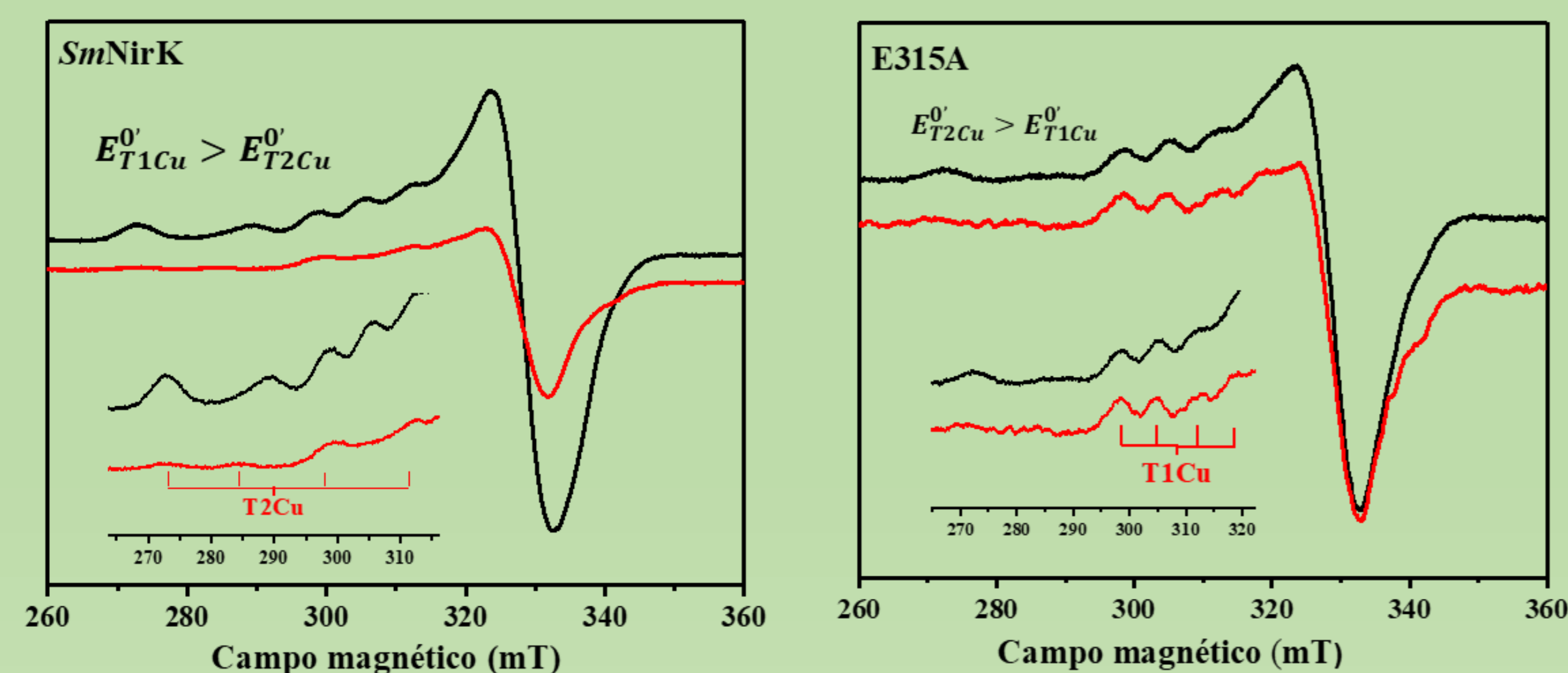


Fig. 6 Reducción controlada monitoreada por EPR para *SmNirK* (izquierda) y E315A (derecha). Espectro negro corresponde a las proteínas *as-purified* y el rojo a las proteínas reducidas.

Relevancia catalítica de E315A

La Fig. 6 muestra el ensayo de reducción con ácido ascórbico (espectro rojo) a pH 6 monitoreado por EPR para *SmNirK* y E315A. Para la proteína *wild type* se observa la reducción del T1Cu y con dificultad se logra reducir el T2Cu. E315A presenta un comportamiento diferente, se reduce en primera instancia el T2Cu. El ensayo evidencia un cambio de potencial de reducción del T2Cu para la mutante. Teniendo en cuenta que el potencial de reducción del T1Cu es mayor al T2Cu en *SmNirK*, la transferencia electrónica (TE) T1Cu → T2Cu se produciría en contra gradiente de potencial. Se ha propuesto que la unión del sustrato al sitio activo favorece la TE entre los dos sitios.² En la Fig. 6 se observa que la mutación invirtió los valores de los potenciales de reducción de los centros. Actualmente estamos trabajando en el efecto de esta mutación en la TE.

CONCLUSIONES

Las mutaciones no modificaron la estructura global de la proteína ni la capacidad de coordinar el Cu en los sitios. Solo los T2Cu sufrieron modificaciones espectroscópicas. Los cambios estructurales implicados en estas modificaciones espectroscópicas afectaron la capacidad catalítica de H342G. La His 342 es un residuo relevante para la estabilidad estructural de la proteína. El Glu 315 tiene implicancias en el potencial de reducción del sitio activo.