



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Departamento de Física

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**Propiedades Moleculares, Cinéticas y
Espectroscópicas de Proteínas Mononucleares de
Molibdeno:**

**Nitrato Reductasas de *Sinorhizobium meliloti* 2011
y Aldehído Oxidorreductasa de *Desulfovibrio
gigas*.**

Lic. Biot. Felix Martín Ferroni

Director: Dr. Carlos Dante Brondino

Co-Director: Dr. Alberto Claudio Rizzi

-2010-

.....“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer al Dr. Carlos D. Brondino y al Dr. Alberto Rizzi por su dirección, principalmente por haber confiado en mí al abrimme las puertas del Departamento de Física. Fue largo el camino recorrido y muchos tropezones mientras el laboratorio se armaba y equipaba pero el trabajo pudo llegar a buen destino. Gracias por el camino recorrido y por el que nos toca recorrer aún.

Agradezco también al Dr. Juan J.G. Moura por su dirección y colaboración durante mi estadía en las instalaciones del REQUIMTE, en la Universidad Nova de Lisboa. Hago extensivo los agradecimientos a la Dra. María G. Rivas, al Dr. Pablo González, la Dra. Marta Sofía Peixe Carepo, la Dra. Isabel Moura, la Dra. Teresa Santos-Silva y a la Dra. María J. Romão.

A la Ing. Nora Perotti, a la Dra. María Ester Lucca y a todo el personal de las instalaciones del PROIMI-CONICET, Tucumán. Todavía recuerdo las 20 horas de trabajo continuo para la optimización del crecimiento en los fermentadores; esa sí que fue una semana intensiva de trabajo, pero con la satisfacción de alcanzar buenos resultados.

Al Dr. Alejandro Beccaría, por su colaboración desinteresada en las instalaciones de la Cátedra de Microbiología Aplicada y el uso de los fermentadores.

A la Dra. Silvia Altabe por recibirnos en las instalaciones del IBR para usar la ultracentrífuga.

A mis compañeros de trabajo de laboratorio. A Guillermo y Liliana con quienes me tocó empezar este camino y compartir muchas horas de mesada y luchar contra los designios de las rizobacterias y las bacterias reductoras de sulfato. Cuantas anécdotas para contar y que quedarán en mi memoria. Guille, cuantas veces habremos pronunciado el clásico “que no te pase, fue horrible decía!!!”, mientras tropezábamos una y otra vez con las purificaciones.

A Verónica, Nicolás, Nicky, Pablo y Vanina. A todo el personal docente e investigador del Departamento de Física por su calidez y colaboración.

Todo este tiempo estuve acompañado por mis seres queridos y es por ello mi especial agradecimiento a mis padres por darme la vida y estar siempre a mi lado, apoyando cada uno de mis pasos. A mi abu por su inmenso cariño y a mis hermanos

por alimentar aquel niño que siempre fui y que aún hoy dejo salir de vez en cuando. Gracias por estar siempre, en las buenas y en las malas.

A mis amigos y familia santafesina: Maillén, Belén, Leylén, Marcelo, Claudio, Natalia, Emiliano, Franco, Raúl y Eugenia. Gracias por compartir su tiempo conmigo y levantarme en esos momentos cuando más lo necesitaba. Me han demostrado que los amigos de verdad están en las buenas y en las malas. Cuantas anécdotas para contar, cuanto compartido, cuanto viajado y cuantos cambios.

A Luciano y Javier por estar siempre, aunque sea en la distancia. Gracias muchachos por su apoyo y amistad. A mis amistades de la facu, Betiana, Diego, Gabriela, Victoria, Sonia, Guille y Pepo.

A la gente linda de otras latitudes a quienes conocí y hoy conservo su amistad: Elena, Marie, Emilia, Anita y Cathy. A toda la gente linda con quienes compartí un curso de Proteómica en Madrid en 2009; gracias por estar aunque sea a la distancia y a defragmentar.... TOF-TOF!!!! Y ya saben, a seguir manteniendo el servicio de ayuda a los proteómicos en problemas en Facebook, ja!!!!.

A todas las instituciones que me permitieron realizar este trabajo de tesis: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL, REQUIMTE- Universidad Nova de Lisboa, SECYT-GRICES (Cooperación Científica y tecnológica Argentina-Portugal), ANPCyT y CONICET por la financiación recibida mediante Proyecto de Cooperación Bilateral Argentina-Portugal PO/PA05-EVI/002 (SECYT-GRICES), Proyecto CAI+D (UNL) PI 3-22, Proyecto CAI+D (UNL) PI 3-24, CONICET PIP 5370/2005, Proyecto PICT 06-13872, Proyecto CAI+D (UNL) 2009 N°11-058, CONICET PIP 112-200801-01079 y Proyecto PICT 2006 N° 00439.

Trabajos Publicados y Comunicaciones a Congresos

Parte de este trabajo de tesis fue publicado en:

Santos-Silva, T.; Ferroni, F.M.; Thapper, A.; Marangon, J.; González, P.; Rizzi, A.C.; Moura, I.; Moura, J.J.G.; Romão, M.J. y Brondino, C.D (2009) *Kinetic, structural, and EPR studies reveal that aldehyde oxidoreductase from Desulfovibrio gigas does not need a sulfido ligand for catalysis and give evidence for a direct Mo-C interaction in a biological system*. J. Am. Chem. Soc. 131: 7990-7998.

El contenido de este trabajo de tesis también ha sido presentado en numerosas reuniones científicas que se detallan a continuación:

Ferroni, F.M.; Santos-Silva, T.; Thapper, A.; Marangón, J.; González, P.; Rizzi, A.C.; Moura, I., Moura, J.J.G.; Romão, M.J. y Brondino, C.D. Estudios cinéticos, estructurales y de RPE revelan que la enzima aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* no necesita el ligando azufre para la catálisis y muestra evidencia de una interacción directa Mo–C. Cuarto Workshop de Química Bioinorgánica. Santa Fe, Argentina, 25 y 26 de marzo de 2010.

Ferroni, F.; Rizzi, C. y Brondino, C. *Inhibición por arsenito y etilenglicol en proteínas mononucleares de molibdeno de la familia de la xantina oxidasa*. X Encuentro de Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral. Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores Universidades de Santa Fe. Santa Fe, Argentina, 25 y 26 de Octubre de 2006.

Ferroni, F.; Rizzi, C. y Brondino, C. *Inhibición por arsenito y etilenglicol en la molibdoenzima aldehído oxidorreductasa*. XV Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Tandil, Argentina, 17-20 de abril de 2007.

Ferroni, F.M.; Rizzi, A.C. y Brondino, C.D. *Cinética de inhibición de la enzima aldehído oxidorreductasa de Desulfovibrio gigas y su correlación con la estructura del sitio activo*. Tercer Workshop de Química Bioinorgánica. Buenos Aires, Argentina, 13 y 14 de marzo de 2008.

Ferroni; F.M.; Rizzi, A.C. y Brondino, C.D. Molibdoenzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en la bacteria *Sinorhizobium meliloti* 2011. XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Salta, Argentina, 18 -21 de mayo de 2009.

Resumen

El molibdeno es un elemento químico de vital importancia en muchos sistemas biológicos y es necesario para la constitución de enzimas que catalizan diversas reacciones clave en los ciclos biogeoquímicos del carbono, azufre y nitrógeno. El metal por sí sólo es biológicamente inactivo a menos que esté complejado por un cofactor especial. Con excepción de las nitrogenasas bacterianas donde el Mo forma parte del cofactor *FeMOCO* (*Fe-Mo cofactor*), el Mo se encuentra en las proteínas unido a un derivado pterina. El cofactor molibdopterina (MPT) es el sitio activo de todas las enzimas mononucleares de Mo. En esta tesis reportamos el estudio de dos tipos de enzimas mononucleares de Mo: nitrato reductasas derivadas de *Sinorhizobium meliloti* 2011 y aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*).

Se caracterizó bioquímicamente una nitrato reductasa de membrana (NR_m) involucrada en el metabolismo respiratorio de nitratos, y una enzima con actividad dual nitrato-nitrito reductasa (NR-NiR). Se reportan las condiciones óptimas para el crecimiento celular y la producción de las enzimas. El crecimiento en medios con molibdato y/o tungstato indica que el Mo es esencial para la actividad NR, lo que está en línea con los estudios cinéticos de las enzimas y sugiere que la inhibición ocurre por reemplazo del Mo por W. Las enzimas aisladas catalizan la reducción de nitratos siguiendo un mecanismo de Michaelis-Menten y son inhibidas por tungstato, azida, clorato y cianuro, mientras que el amonio no tiene efecto inhibitorio. La actividad NiR de NR-NiR muestra una cinética tipo Michaelis-Menten, es inhibida por dietilditiocarbamato y cianuro e insensible a amonio. Los estudios con inhibidores sobre las enzimas aisladas sugieren un perfil fisiológico de vías desasimilativas.

Se caracterizó la cinética de inhibición de la enzima *DgAOR* con los inhibidores cianuro, etilenglicol, glicerol y arsenito, junto con estudios cristalográficos y de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de la enzima después de la reacción con los dos alcoholes. Al contrario de lo que se ha observado en otros miembros de la familia de la xantina oxidasa (XO), cianuro, etilenglicol y glicerol son inhibidores reversibles de *DgAOR*. Los datos cinéticos de muestras nativas obtenidas por disolución de cristales, como de aquellas tratadas con cianuro, confirman que *DgAOR*

no necesita de un ligando azufre coordinado al átomo de Mo para la catálisis, lo que constituye una diferencia fundamental con la enzima xantina oxidasa (XO), y confirma la ausencia del ligando en la esfera de coordinación del átomo de molibdeno en la enzima activa. Estudios cristalográficos de muestras inhibidas con los polialcoholes confirma la evidencia de una interacción directa Mo–C, lo que constituye la primera evidencia experimental para tal tipo de enlace en sistemas biológicos. Se discute la implicancia de este resultado en el mecanismo catalítico de *DgAOR*.

Abstract

Molybdenum is of essential importance in many biological systems as it is required by enzymes catalyzing diverse key reactions in the global carbon, sulfur and nitrogen metabolism. The metal itself is biologically inactive unless it is complexed by a special cofactor. With the exception of bacterial nitrogenase, where Mo is a constituent of the FeMo-cofactor, Mo is bound to a pterin, molecule forming the molybdenum cofactor (MOCO) which is the active compound at the catalytic site of all other Mo- mononuclear enzymes. In this work we report the study of two kinds of Mo- mononuclear enzymes: nitrate reductases from *Sinorhizobium meliloti* 2011 and aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*).

We characterized biochemically the respiratory membrane-bound nitrate reductase (NR_m) and the cytoplasmic nitrate-nitrite reductase (NR-NiR) from *S. meliloti* 2011. The optimal conditions for cell growth and enzyme production are presented. The highest levels of NR activity were obtained under microaerobic conditions in presence of both nitrate and nitrite. Cell growth in presence of either molybdate or tungstate indicates that molybdenum is essential for the NR activity, which is in line with kinetic studies of the as-isolated enzymes that suggest that the inhibition occurs by replacement of W for Mo. Both NR_m and NR-NiR follow a Michaelis-Menten mechanism and NR activity is inhibited by tungstate, azide, chlorate and cyanide but not by ammonia. NiR activity of NR-NiR shows also a Michaelis-Menten mechanism and is inhibited by diethyldithiocarbamate and cyanide.

We performed also steady-state kinetic studies of *DgAOR* with the inhibitors cyanide, ethylene glycol, glycerol, and arsenite, together with crystallographic and EPR studies of the enzyme after reaction with the two alcohols. In contrast to what has been observed in other members of the XO family, cyanide, ethylene glycol, and glycerol are reversible inhibitors of *DgAOR*.

Kinetic data with both cyanide and samples prepared from single crystals confirm that *DgAOR* does not need a sulphur ligand for catalysis and confirm the absence of this ligand in the coordination sphere of the molybdenum atom in the active enzyme.

The two adducts alcohol-enzyme present a direct interaction between the molybdenum and one of the carbon atoms of the alcohol moiety, which constitutes the first structural evidence for such a bond in a biological system. The implicity of this result in the reaction mechanism of *DgAOR* is discussed.

Abreviaturas

4-HBCR	4-Hidroxi Bencil-CoA reductasa
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ANAMOX	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i>
AOR	Aldehído Oxidorreductasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
COD	CO Deshidrogenasa
DgAOR	<i>Desulfovibrio gigas</i> Aldehído oxidorreductasa
DLP	<i>Direct Linear Plot</i>
DMSOR	Dimetilsulfóxido Reductasa
EDO	Etilendiol, etilenglicol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ENDOR	<i>Electron-Nuclear Double Resonance</i>
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GOGAT	Glutamina 2-oxoglutarato Aminotransferasa
GOL	Glicerol
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
HMWM	<i>High Molecular Weight Markers</i>
LB-Glc	Luria Bertani-Glucosa
LMWM	<i>Low Molecular Weight Markers</i>
MCD	Molibdopterina Citosina Dinucleótido
MCP	<i>Molybdenum-cofactor Carrier Protein</i>
MGD	Molibdopterina Guanina Dinucleótido
Mo-bisMGD	Molibdeno-bis-Molibdopterina Guanina Dinucleótido
MOCO	<i>Molybdenum Cofactor</i>
MPT	Molibdopterina
MV	Metilviológeno
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (reducida)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (reducida)
Nap	Nitrato Reductasa Periplasmática
NaR	Nitrato Reductasa Respiratoria
Nas	Nitrato Reductasa Asimilativa
NHE	<i>Normal Hydrogen Electrode</i>
NiR	Nitrito Reductasa
NR	Nitrato Reductasa
NRm	Nitrato Reductasa De membrana
NR-NiR	Nitrato-Nitrito Reductasa
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
Q2-OR	Quinolina 2-Oxidorreductasa
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
SAM	S-adenosil Metionina
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrilamye Gel Electrophoresis</i>
SO	Sulfito Oxidasa
TTC	<i>Triphenyl Tetrazolium Chloride</i>

TY-Glc	<i>Tryptone-Yeast extract-Glucosa</i>
UV-vis	Ultravioleta-visible
XO	Xantina Oxidasa
YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i>

Indice

Agradecimientos	ii
Trabajos Publicados y Comunicaciones a Congresos	iv
Resumen.....	v
Abstract	vii
Abreviaturas	ix
Indice.....	xi

Capítulo I

I. Introducción General	2
I.1. Metales de transición y su función en los procesos biológicos: las metaloproteínas.	2
I.2. Biología del molibdeno.....	4
I.3. Proteínas mononucleares de molibdeno.	7
I.4. Mecanismo general de catálisis de las proteínas mononucleares de Mo.	9
I.5. Proteínas mononucleares de Mo: los objetivos del presente trabajo de tesis.....	10
Bibliografía	12

Capítulo II

II.1 Introducción	15
II.1.1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno llevado a cabo por microorganismos.....	15
II.1.2. Nitrato reductasas involucradas en los procesos de amonificación y desnitrificación. 17	
II.1.3 Metabolismo del nitrógeno en Rizobacterias: relevancia de las NRs.	22
II.1.4 Metabolismo del nitrógeno en <i>Sinorhizobium meliloti</i> : estado actual del tema.....	23
II.2 Materiales y Métodos	25
II.2.1 Cepas utilizada.....	25
II.2.2 Medios de cultivo.....	25
Medio YMA (<i>Yeast Mannitol Agar</i>) para el mantenimiento y conservación de cepas.	25
Medio LB (<i>Luria Bertani</i>) modificado para expansión celular e inducción de metaloenzimas (LB-Glc).	25
Medio TY (<i>Tryptone Yeast</i>) modificado para expansión celular e inducción de metaloenzimas (TY-Glc).....	25
II.2.3 Crecimiento de <i>S. meliloti</i> 2011.	26
II.2.4 Producción NRs y NiRs en <i>S. meliloti</i> 2011.....	26
II.2.5 Disrupción y subfraccionamiento de las células inducidas de <i>S. meliloti</i> 2011.	27

II.2.6 Purificación de la NR de membrana de <i>S. meliloti</i> 2011.	28
II.2.7 Purificación de la NR-NiR citoplasmática de <i>S. meliloti</i> 2011.....	29
II.2.8 Técnicas analíticas y de caracterización fisicoquímica empleadas.	30
Ensayos cinéticos.....	30
Ensayos de inhibición.	31
Espectroscopía UV-vis.	32
Determinación del contenido proteico.	32
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	32
Determinación del tamaño molecular de las muestras de enzimas <i>as-prepared</i> mediante tamiz molecular.....	32
Determinación de actividad NR/NiR en geles nativos.	33
Detección de grupos hemo en gel nativo.....	33
Determinación de actividad peroxidasa en solución asociada a grupos hemo.	34
Determinación de metales y análisis de nucleótidos sobre las muestras de enzimas <i>as-prepared</i>	34
Dependencia de Mo de la actividad NR de las enzimas <i>as-prepared</i>	35
II.3 Resultados	36
II.3.1 Optimización del cultivo de <i>S. meliloti</i> 2011.	36
II.3.2 Optimización de la producción de NRs en <i>S. meliloti</i> 2011.....	38
II.3.2 Influencia en la actividad NR de la adición de Mo a cultivos de <i>S. meliloti</i> 2011.....	39
II.3.3 Producción y purificación de la NR de membrana de <i>S. meliloti</i> 2011.	40
II.3.4 Propiedades moleculares de la NRm de <i>S. meliloti</i> 2011.....	42
II.3.5 Caracterización UV-vis de la NRm aislada.	44
II.3.6 Análisis de cofactores y contenido metálico de la NRm aislada.	45
II.3.7 Caracterización cinética de la NR de membrana aislada.	46
II.3.8 Estudios de Inhibición.	49
II.3.9 Producción y purificación de la NR-NiR citoplasmática de <i>S. meliloti</i> 2011.....	51
II.3.10 Caracterización UV-Vis de la NR-NiR aislada.....	53
II.3.11 Propiedades moleculares de la NR-NiR aislada de <i>S. meliloti</i> 2011.	54
II.3.12 Caracterización cinética de la NR-NiR de <i>S. meliloti</i> 2011 aislada.	54
II.3.9 Estudios de Inhibición.	56
II.4 Discusión	59
II.4.1 Inducción y producción de NRs en <i>S. meliloti</i> 2011.	59
II.4.2 NRm aislada de <i>S. meliloti</i> 2011.	61
II.4.3 NR-NiR aislada de <i>S. meliloti</i> 2011.	65

II.4.4 Comparación entre NRs aisladas de rizobacterias.	67
II.5 Bibliografía	70

Capítulo III

III.1.1. Familia de la Xantina Oxidasa: propiedades generales.	80
III.1.2. La técnica de la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE): fundamentos básicos.	83
III.1.3. La técnica de RPE aplicada al estudio de los miembros de la familia de la XO.	88
III.1.4. Familia de la Xantina Oxidasa: mecanismo de reacción.	92
III.1.5. Aldehído oxidorreductasa de <i>Desulfovibrio gigas</i> y la problemática del ligando azufre.	93
III.2 Materiales y Métodos	96
III.2.1 Purificación y cuantificación de <i>DgAOR</i>	96
III.2.2 Estudios cinéticos.	96
III.2.3 Preparación de las muestras para RPE.	97
Muestras inhibidas con EDO, GOL y KCN.	97
Espectros de RPE y simulación.	97
III.2.4 Procedimientos de cristalización y <i>soaking</i>	98
III.2.5 Registro de datos, determinación de estructura y refinamiento.	99
III.3 Resultados	101
III.3.1 Estudios cinéticos.	101
III.3.1.1 Estudios cinéticos en <i>DgAOR as-prepared</i>	101
III.3.1.2 Ensayos de reversibilidad de inhibición de <i>DgAOR</i>	102
III.3.1.3 Estudios del tipo de inhibición por KCN, EDO y GOL en <i>DgAOR</i>	103
III.3.1.3 Ensayos de actividad sobre muestras cristalizadas de <i>DgAOR</i>	104
III.3.2 Estudio de RPE de las formas inhibidas de <i>DgAOR</i> con EDO, GOL y KCN.	104
III.3.2.1 Ensayos de RPE sobre muestras tratadas con EDO y GOL: señal de RPE de centros [2Fe-2S].	106
III.3.2.2 Ensayos de RPE sobre muestras tratadas con EDO y GOL: señal de RPE de Mo (V).	107
III.3.3. Datos estructurales.	108
III.4 Discusión	112
III.4.1. Inhibición de <i>DgAOR</i> con KCN y la problemática del ligando azufre.	112
III.4.2. Análisis de los estudios cinéticos y cristalográficos de las muestras de <i>DgAOR</i> tratadas con EDO y GOL.	113
III.4.3. Análisis de los estudios de RPE de las muestras de <i>DgAOR</i> tratadas con EDO y GOL: estado de la cadena de transferencia electrónica y del sitio activo de Mo.	114

III.4.4. Análisis de las muestras tratadas de *DgAOR* con EDO: evidencia de enlace Mo–C. . 115

III.5 Bibliografía 117

Capítulo IV

Conclusiones y Perspectivas Futuras 123

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. Introducción General

I.1. Metales de transición y su función en los procesos biológicos: las metaloproteínas.

La química inorgánica biológica o química bioinorgánica es una disciplina que se sitúa en la interfase de áreas más clásicas como la química inorgánica y la biología. Aunque históricamente la biología y la química inorgánica se desarrollaron independientemente, la identificación de elementos inorgánicos con funciones esenciales para los sistemas vivos hizo confluir naturalmente estas dos disciplinas en una única. Así, la química bioinorgánica estudia las especies inorgánicas con especial énfasis en cómo ellas funcionan *in vivo* (Lippard y Berg, 1994a; Frausto da Silva y Williams, 2001a; Atkins y col., 2006).

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026																		
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122																	boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180												
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305																	aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948												
		scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.822	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80																		
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [98]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	palladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29																		
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	57-70 * Lu	hafnium 72 Hf 178.49	tantalum 73 Ta 180.95	tungsten 74 W 183.84	rhenium 75 Re 186.21	osmium 76 Os 190.23	iridium 77 Ir 192.22	platinum 78 Pt 195.08	gold 79 Au 196.97	mercury 80 Hg 200.59	thallium 81 Tl 204.38	lead 82 Pb 207.2	bismuth 83 Bi 208.98	polonium 84 Po [209]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]																		
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	89-102 ** Lr	lawrencium 103 Lr [262]	rutherfordium 104 Rf [261]	dubnium 105 Db [262]	seaborgium 106 Sg [266]	bohrium 107 Bh [264]	hassium 108 Hs [269]	meitnerium 109 Mt [268]	ununnium 110 Uun [271]	ununium 111 Uuu [272]	ununium 112 Uub [271]	ununquadium 114 Uuq [289]																						
																		lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04				
																		actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]				

Figura I-1. Elementos químicos relevantes para la química bioinorgánica. Elementos macro (en verde), elementos traza (bordó).

Los elementos químicos biológicamente esenciales pueden dividirse en dos grandes grupos: los elementos mayoritarios y los elementos traza (Figura I-1). Los elementos químicos más abundantes en la materia biológica son O, N, C, P, S, H, Na, K, Mg y Ca y se encuentran formando parte de las estructuras básicas de toda célula. Los metales de transición se presentan en niveles de elementos traza y juegan un rol

importante, cumpliendo funciones biológicas clave al formar parte de estructuras moleculares como son las metaloproteínas. Así, las diversas formas de vida han desarrollado mecanismos de transporte para incorporar, almacenar y regular las concentraciones y disponibilidad de los diferentes metales de transición y han sabido aprovechar las propiedades químicas de cada uno de estos elementos para adaptarse a las condiciones de un medio cambiante y en constante evolución. Los metales de transición han permitido la adaptación de los microorganismos y formas de vida superiores a los distintos ambientes de la Tierra, cumpliendo funciones en el transporte de gases, en mecanismos de respiración (aeróbica y anaeróbica), en la transferencia electrónica mediante la constitución de cofactores metálicos redox, en estructuras celulares y en catálisis enzimática. Entre los metales de transición relevantes para estas funciones biológicas se pueden distinguir Zn, Mn, Co, Fe, Mo, W, V, Ni y Cu (Atkins y col., 2006).

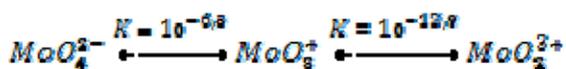
Conforme evolucionaron las condiciones geoquímicas en la Tierra, desde un ambiente anóxico (3800 millones de años atrás) a un ambiente rico en oxígeno (desde hace 400 millones de años), la utilización de los metales de transición acompañó al proceso evolutivo, llegando en la actualidad a tener gran relevancia en distintos procesos vitales para el mantenimiento de la vida (Frausto da Silva y Williams, 2001a). De todos los metales de transición, el más ampliamente utilizado por todos los seres vivos es el Fe debido a su alta biodisponibilidad y versatilidad en su química de coordinación y propiedades redox. Estas características especiales le permiten participar en procesos catalíticos redox, de transporte de gases y de transferencia electrónica.

La mayoría de los metales de transición utilizados por los seres vivos se ubican entre los elementos de la primera serie del denominado bloque *d* de los elementos de transición (Figura I-1), lo que sugiere que la naturaleza ha seleccionado los elementos metálicos con la menor masa atómica posible. Elementos más pesados no son utilizados por los seres vivos, a excepción de Mo y W que pertenecen a la segunda y tercera serie de los elementos de transición (Grupo VIB), respectivamente. En el caso particular del Mo, se puede asegurar que prácticamente no existe organismo vivo que no lo incluya en su metabolismo, lo que indica que las funciones que cumple no pueden ser substituidas por ningún otro metal (Frausto da Silva y Williams, 2001b;

Mendel y Bittner, 2006). Ya que este trabajo de tesis estará centrado en la caracterización de enzimas redox que contienen Mo en sus sitios activos, en los apartados siguientes se describirán aspectos generales de la biología del Mo, la clasificación de las enzimas de las cuales forma parte, y los mecanismos generales de catálisis en los que participa. Por último se plantean los objetivos de este trabajo y se explica brevemente como está organizada la presentación de la tesis.

1.2. Biología del molibdeno.

El molibdeno es un metal muy abundante en la Tierra ubicándose en la posición 53 respecto de la abundancia de los elementos (Frausto Da Silva y Williams, 2001b) y como se dijo anteriormente cumple funciones biológicas clave (Schwarz y col., 2009). Su concentración en la corteza terrestre es alrededor de 1,5 ppm y es uno de los metales de transición más abundantes en el océano (1×10^{-2} ppm) (Lippard y Berg, 1994b). Se presenta en las rocas como minerales tales como MoS_2 (*molybdenite*), CaMoO_4 (*powelite*) y PbMoO_4 (*wulfenite*) y está disponible para la célula como iones molibdato solubles, una de las diversas oxo-especies producidas por la hidrólisis de las sales de molibdeno a pH neutro. El equilibrio entre los productos de la hidrólisis favorece al molibdato frente a las otras especies (Pope y col., 1980; Frausto da Silva y Williams, 2001b), como se muestra en el siguiente esquema.



La incorporación de molibdato al interior celular se logra mediante diversas clases de transportadores presentes en la célula bacteriana (Maupin-Furlow y col., 1995; Self y col., 2001). Algunos de estos transportadores son del tipo ABC de tres componentes, que incorporan los iones molibdato mediante transporte activo asociado a la hidrólisis de ATP (Self y col., 2001). Los iones molibdato también pueden ser ingresados mediante un sistema de transporte del tipo ABC que se encarga del transporte de sulfatos (Maupin-Furlow y col., 1995; Self y col., 2001) y mediante un transportador de iones selenato en caso de ausencia de los otros dos sistemas de transporte (Lee y col., 1990). Una vez incorporado al interior de las células, el

molibdato es procesado y almacenado en proteínas específicas para luego ser incorporado a las molibdoenzimas (Mendel y Bittner, 2006).

El molibdeno se encuentra presente en la estructura de enzimas capaces de catalizar diversas reacciones redox que participan en los ciclos biológicos del nitrógeno, del azufre y del carbono (Hille, 1996; Zumft, 1997; Moura y col.; 2004; Brondino y col., 2006; González y col., 2006; Schwarz y col., 2009). Por ello el Mo tiene implicancias en ecología, en salud humana y en biotecnología, entre otras. Son de destacar su rol en procesos relacionados con el efecto invernadero (Zumft, 1997) y el nivel de polución de aguas subterráneas (Seitzinger y col., 2006), su potencial interés en biorremediación (Richey y col., 2009) y su participación en el metabolismo de purinas (Hille, 1996; Kisher y col., 1997; Brondino y col., 2006).

El Mo puede encontrarse en los sitios activos de enzimas formando parte de estructuras mononucleares o de estructuras multinucleares en clústeres, generalmente acompañado de otros metales como Fe (Schwarz y col., 2009). Entre las últimas, el ejemplo más estudiado corresponde al clúster complejo FeMOCO de la nitrogenasa ($\text{Fe}_7\text{S}_9\text{Mo}$) donde sólo uno de los átomos de Fe y el átomo de Mo se hallan unidos covalentemente a la cadena peptídica de la enzima (Kim y Rees, 1992). Con excepción de la nitrogenasa y de otras proteínas menos estudiadas, el Mo se incorpora como cofactor de Mo. Este cofactor contiene un átomo de Mo mononuclear coordinado a dos átomos de azufre de un ligando derivado de la pterina denominado molibdopterina (MPT), también conocido como *MOCO* (Hille, 1996; Kisher y col., 1997). La síntesis del cofactor MPT se da en diversas etapas que están altamente conservadas en los organismos vivos (Figura I-2) y se realiza a partir de guanosina trifosfato (GTP) con la incorporación de MoO_4^{2-} al final del proceso (Mendel y Bittner, 2006; Schwarz y col., 2009).

El proceso consta de cuatro etapas fundamentales:

- Etapa 1. *Conversión del GTP en el precursor Z*: Este paso es catalizado por dos proteínas y una de ellas proviene de la familia de enzimas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM). En esta familia de proteínas se generan proteínas y/o radicales sustrato por clivaje reductivo de SAM mediante un clúster [4Fe-4S].
- Etapa 2. *Síntesis de la molibdopterina (MPT)*: el precursor Z es convertido en molibdopterina a través de dos enzimas: MPT sintetasa y la MTP

sintasa sulfurilasa. El complejo heterotetramérico de la MPT sintasa transfiere dos residuos sulfidrilo, uno por vez. La enzima se regenera por acción de la MTP sintasa sulfurilasa.

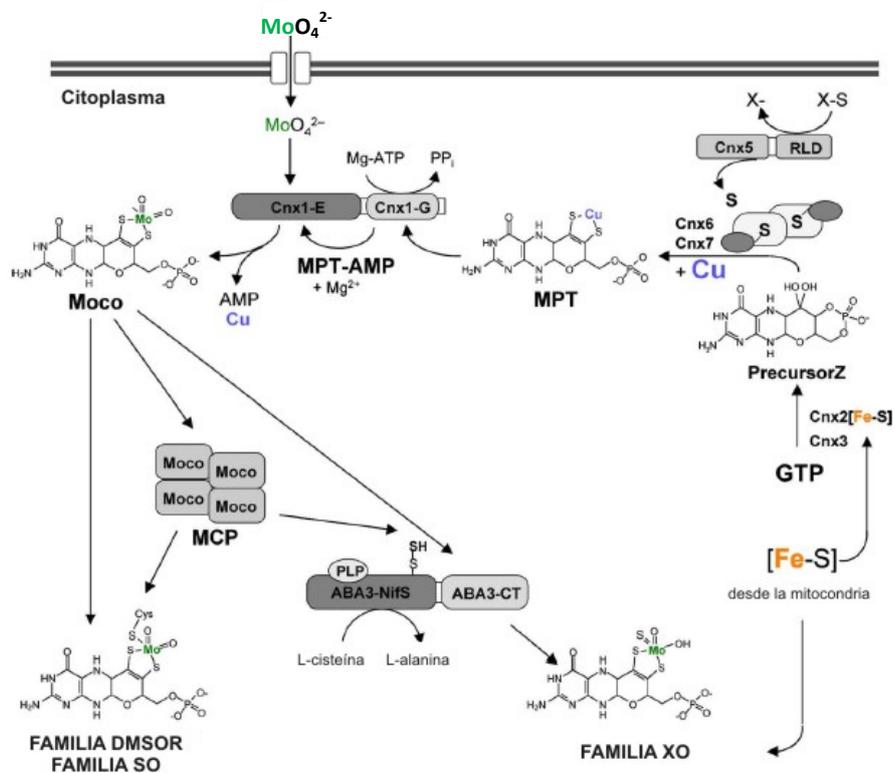


Figura I-2. Síntesis del cofactor molibdopterina en plantas y generación del cofactor de las distintas familias de proteínas mononucleares de Mo (Mendel y Bittner, 2006).

- Etapa3. *Adenilación de la MPT*: se adiciona AMP a la estructura de la MPT a partir de ATP.
- Etapa 4. *Incorporación de Mo a MPT*: los intermediarios MPT y MPT-P presentan el ditioleno asociado a Cu. En este paso se cliva el AMP y se cambia el Cu por Mo.

El cofactor generado se incorpora a las distintas proteínas mononucleares de Mo y también puede almacenarse en transportadores (MCP, *MOCO carrier protein*). Este cofactor es el que da origen a las distintas familias de las proteínas mononucleares de Mo (Mendel y Bittner, 2006; Schwarz y col., 2009).

I.3. Proteínas mononucleares de molibdeno.

Si bien las proteínas mononucleares de molibdeno son un grupo heterogéneo en cuanto a funcionalidades enzimáticas, la arquitectura del sitio activo conserva cierta homogeneidad (Hille, 1996; Kisher y col., 1997; Moura y col., 2004; Brondino y col., 2006; Schwarz y col., 2009). El sitio activo de estas enzimas (Figura I-3) posee un átomo de Mo coordinado a una o dos moléculas de piranopterina y a un número variable de ligandos tales como átomos de oxígeno (O, OH, H₂O, serina y ácido aspártico), átomos de azufre (S, cisteína) y átomos de selenio (selenocisteína). La molécula de piranopterina es un ligando orgánico que puede estar en la forma de monofosfato o tener un nucleótido adicionado al residuo pirofosfato (Hille, 1996; Kisher y col., 1997).

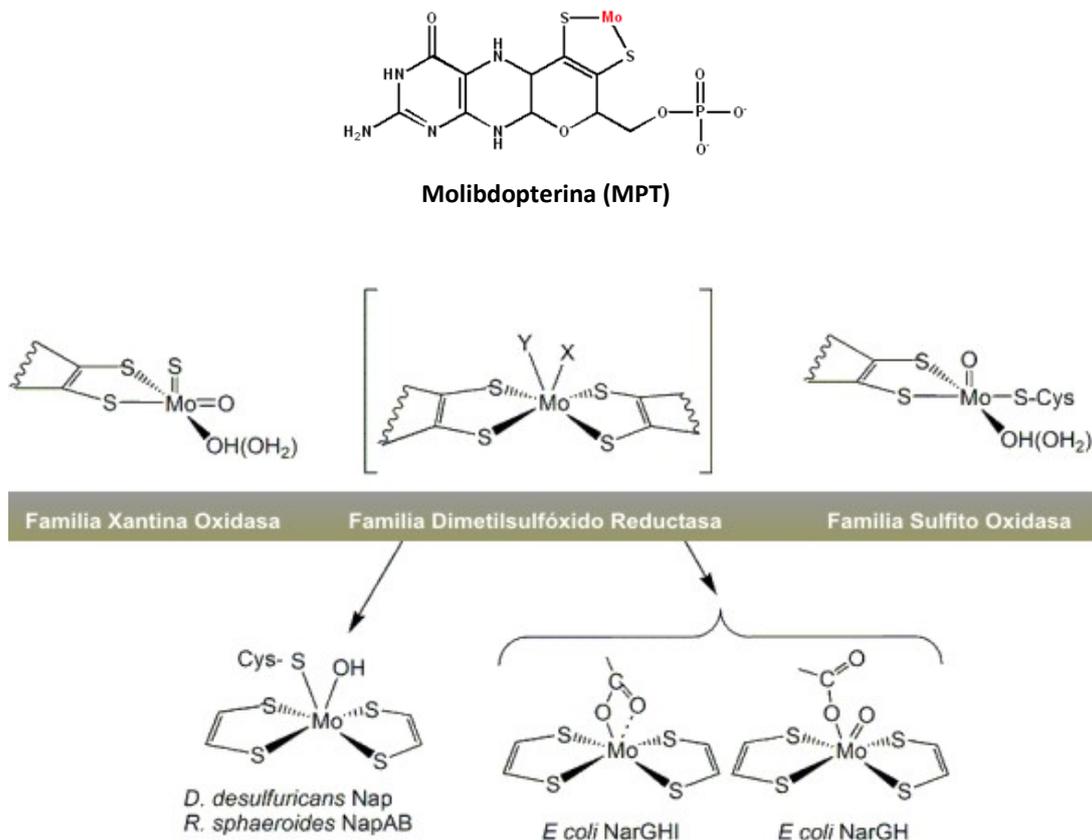


Figura I-3. Estructura del sitio activo de las distintas familias de proteínas mononucleares de Mo. El panel inferior muestra ejemplos de ligandos x e y para la familia de la dimetilsulfóxido reductasa. El grupo fosfato de la molécula de molibdopterina puede estar sustituido con nucleótidos (guanina o citosina) según el tipo de familia de enzimas.

En la tabla I-1 se exponen algunas de las molibdoenzimas y las reacciones que catalizan. Estas proteínas normalmente tienen además otros cofactores metálicos tales

como centros hierro-azufre (FeS) y grupos hemo, y cofactores orgánicos como FAD, los cuales están involucrados en los procesos intra- e intermoleculares de transferencia electrónica (Rothery y col., 2008; Schwarz y col., 2009).

Enzima	Reacción catalizada
Xantina Oxidasa	$xantina + H_2O \rightarrow \text{ácido úrico} + 2H^+ + 2e^-$
Aldehído oxidorreductasa	$\text{aldehído} + H_2O \rightarrow \text{ácido carboxílico} + 2H^+ + 2e^-$
Nitrato reductasa	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$
Dimetilsulfóxido reductasa	$(CH_3)_2SO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow (CH_3)_2S + H_2O$
Formato deshidrogenasa	$HCOOH \rightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$
Sulfito oxidasa	$SO_3^- + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^-$

Tabla I-1. Distintos tipos y funcionalidades dentro de las proteínas mononucleares de Mo. Se describen las reacciones catalizadas por algunas de estas enzimas.

Como puede observarse en la figura I-3, las proteínas mononucleares de molibdeno se dividen en tres grandes familias de acuerdo a la arquitectura del sitio activo: familia de la xantina oxidasa (XO), familia de la dimetilsulfóxido reductasa (DMSOR) y familia de la sulfito oxidasa (SO). Estas tres familias incluyen no solo las enzimas que dan nombre al grupo sino a un gran número de enzimas, las cuales han sido agrupadas por homología de estructura de sitio activo y otras propiedades fisicoquímicas (Tabla I-2).

Familia XO	Familia DMSOR	Familia SO
Xantina Oxidasa	Dimetilsulfóxido reductasa	Sulfito oxidasa
Aldehído oxidorreductasas	Nitrato reductasas	Nitrato reductasas eucariotas
Alcohol deshidrogenasa	procariotas	
	Formato deshidrogenasa	

Tabla I-2. Ejemplos de proteínas mononucleares de Mo pertenecientes a las distintas familias de proteínas mononucleares de molibdeno (Hille, 1996; Kisher y col., 1997).

De todas las familias de proteínas mononucleares de molibdeno, las proteínas de la familia de la XO son las únicas que no poseen unión covalente del cofactor con algún aminoácido de la estructura proteica (Figura I-3) (Hille, 1996; Kisher y col., 1997; Brondino y col., 2006).

I.4. Mecanismo general de catálisis de las proteínas mononucleares de Mo.

Las proteínas mononucleares de molibdeno catalizan diversas reacciones e intervienen en procesos metabólicos troncales (Schwarz y col., 2009). Salvo pocas excepciones, estas enzimas catalizan la transferencia de un átomo de oxígeno de la molécula de agua al producto (o viceversa), en reacciones que implican un intercambio neto de dos electrones entre la enzima y el sustrato, en las cuales el ión metálico cicla entre los estados redox Mo (VI) y Mo (IV) (Moura y col., 2004; Brondino y col., 2006).

En la Figura I-4 se muestra un esquema general de los procesos redox involucrados en una reacción típica catalizada por estas enzimas. En reacciones de oxidación, el sustrato reacciona con el centro de molibdeno que se encuentra en el estado de Mo (VI) y es reducido a Mo (IV), mientras que en procesos de reducción la interacción sustrato-Mo se da en el estado de Mo (IV) el cual se oxida a Mo (VI). Los dos equivalentes de reducción generados en el transcurso de la reacción son cedidos a aceptores de electrones u obtenidos de donadores de electrones según se trate de procesos de oxidación o de reducción, respectivamente (Figura I-4).

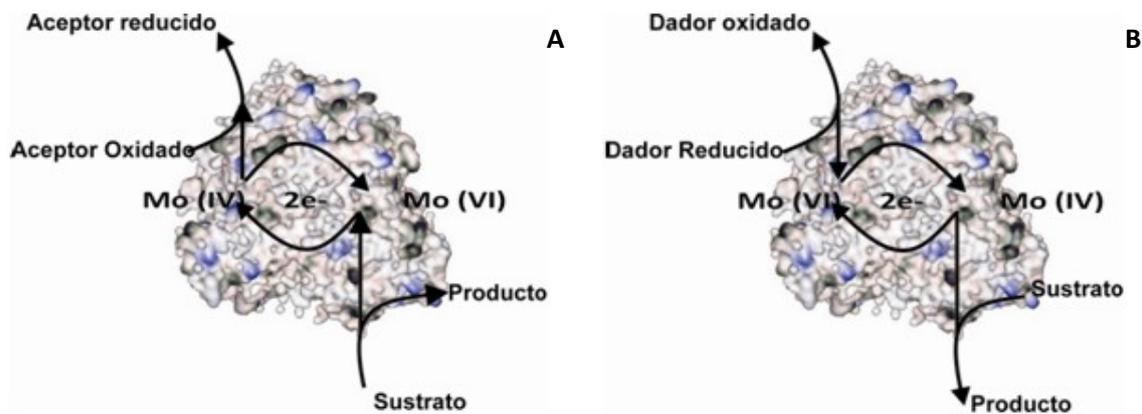


Figura I-4. Mecanismo general de reacción de las enzimas mononucleares de molibdeno. A) Reacción de oxidación. B) Reacción de reducción. El sitio activo de Mo puede estar en sus estados de oxidación (IV) o (VI) y cambiar entre estos según transcurre el proceso de catálisis enzimática.

El transporte de electrones desde el dador al sitio activo o del sitio activo al aceptor, está mediado por un camino químico establecido por distintos tipos de cofactores redox (cofactores metálicos y/u orgánicos) y ciertos componentes estructurales de la proteína (aminoácidos) como se detallará en los capítulos siguientes. El camino químico responsable de este transporte de electrones es lo que se conoce como cadena de transferencia electrónica (Moser y col., 2000).

I.5. Proteínas mononucleares de Mo: los objetivos del presente trabajo de tesis.

El estudio de las proteínas mononucleares de Mo es actualmente un campo de investigación básica muy activo de la química bioinorgánica a nivel mundial (Rothery y col., 2008; Schwarz y col., 2009). Actualmente las líneas de trabajo en la temática están orientadas a profundizar el conocimiento de los sistemas más estudiados y por ende mejor caracterizados, y a explorar nuevos horizontes en sistemas aún no caracterizados o con caracterizaciones fisicoquímicas y bioquímicas parciales. En línea con estos dos grandes enfoques, este trabajo persigue dos objetivos principales. Uno de ellos está focalizado en la caracterización de enzimas mononucleares de molibdeno en microorganismos de relevancia para aplicaciones biotecnológicas y que tengan reportado en su genoma sistemas putativos de Mo que permitan aportar no sólo nuevos conocimientos al entendimiento de la problemática sino que también incluyan eventuales aplicaciones. El segundo, está orientado a entender detalles finos a nivel molecular que son relevantes en el entendimiento del proceso catalítico de una de las enzimas mejor caracterizadas de la familia de la XO.

Los resultados de este trabajo de tesis se presentan en dos secciones principales que están asociadas con los dos tipos de problemática planteadas en el párrafo anterior. En una primera parte (Capítulo II) se reportan los resultados obtenidos en nitrato reductasas aisladas de *Sinorhizobium meliloti* 2011, una bacteria del suelo capaz de establecer relaciones simbióticas con especies de plantas leguminosas y de gran impacto en los ecosistemas del suelo y el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Dado que nuestro grupo no tenía infraestructura experimental acorde a este tipo de tareas, esta parte del trabajo tuvo una alta componente experimental e implicó poner a punto técnicas de crecimiento del microorganismo y manejo de biorreactores, producción y purificación de enzimas y dosaje de la actividad enzimática.

Posteriormente, en el Capítulo III se resuelven aspectos estructurales y funcionales de la enzima aldehído oxidoreductasa del microorganismo reductor de sulfatos *Desulfovibrio gigas*. La enzima cumple funciones en el metabolismo energético anaeróbico de este tipo de microorganismos, pero además tiene particularidades muy especiales respecto del resto de los miembros de esta familia de enzimas como se

demuestra en el desarrollo del trabajo. En un último capítulo (Capítulo IV) se describen las conclusiones generales y perspectivas futuras de trabajo.

Las tablas y figuras de este trabajo se enumeran de forma correlativa y por capítulos, mientras que las referencias bibliográficas se incluyen al final de cada capítulo.

Bibliografía

- Atkins, P.; Overton, T.; Rourke, J.; Weller, M. y Armstrong, F. (2006) *Chapter 26: Biological inorganic chemistry*. En: *Shriver & Atkins Inorganic Chemistry*, 4th Edition. Oxford University Press, New York, p 712-768.
- Brondino, C.D.; Romão, M.J; Moura, I. y Moura, J.J. (2006) *Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 109-114.
- Frausto Da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P. (2001a) *Chapter 1: The chemical elements in biology*. En: *The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*, 2nd Edition. Oxford University Press, New York, p 3-22.
- Frausto Da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P. (2001b) *Chapter 17: Molybdenum, vanadium y tungsten*. En: *The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*, 2nd Edition. Oxford University Press, New York, p 412-427.
- González, P.J.; Correia, C.; Moura, I.; Brondino, C.D. y Moura, J.J.G. (2006) *Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction*. *J. Inorg. Biochem.* 100: 1015-1023.
- Hille, R. (1996) *The mononuclear molybdenum enzymes*. *Chem. Rev.* 96: 2757-2816.
- Kim, J. y Rees, D.C. (1992) *Structural models of the metal centres of nitrogenase*. *Science* 257: 1677-1681.
- Kisher, C.; Schindelin, H. y Rees, D.C. (1997) *Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism*. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 233-266.
- Lee, J.H.; Wendt, J.C. y Shanmugam, K.T. (1990) *Identification of a new gene, molR, essential for utilization of molybdate by Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 2079-2087
- Lippard, S. y Berg, J.M. (1994a). *Chapter 1: Overview of bioinorganic chemistry*. En: *Principles of bioinorganic chemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA. USA, p 1-20.
- Lippard, S. y Berg, J.M. (1994b). *Chapter 5: Choice, uptake and assembly of metal containing units in biology*. En: *Principles of bioinorganic chemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA. USA, p 103-137.
- Maupin-Furlow, J.A.; Rosentel, J.K.; Lee, J.H.; Deppenmeier, U.; Gumsalus, R.P. y Shanmugam, K.T. (1995) *Genetic analysis of the modABCD (molybdate transport) operon of Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 4851-4856.
- Mendel, R.R. y Bittner, F. (2006) *Cell biology of molybdenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 621-635.
- Moser, C.C.; Page, C.C.; Chen, X. y Dutton, L. (2000) *Chapter 1: Electron transfer in natural proteins. Theory and design*. En: *Subcellular biochemistry, Vol. 35: Enzyme-catalyzed electron and radical transfer*. (Eds.: Holzenburg y Scrutton). Kluwer Academic, New York, p 1-28.
- Moura, J.J.; Brondino, C.D.; Trincao, J. y Romão, M.J. (2004) *Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9: 791-799.

Pope, M.T.; Still, E.R. y Williams, J.P. (1980) *A comparison between the chemistry and biochemistry of molybdenum and related elements*. En: *Molybdenum and molybdenum-containing enzymes*. (Ed.: Coughland, M.) Oxford, Pergamon Press, p 3-40.

Richey, C.; Chovanec, P.; Hoeft, S.E.; Oremland, R.S.; Basu, P. y Stolz, J.F. (2009) *Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 382: 298-302.

Rothery, R.A.; Workun, G. y Weiner, J.H. (2008) *The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family*. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1897-1929.

Schwarz, G.; Mendel, R.R y Ribbe, M.W. (2009) *Molybdenum cofactors, enzymes and pathways*. *Nature* 460: 839-847.

Seitzinger, S.; Harrison, J.A.; Böhlke, J.K.; Bowman, A.F.; Lowrance, R.; Peterson, B.; Tobias, C. y Van Drecht, G. (2006) *Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis*. *Ecol. Appl.* 16: 2064-2090.

Self, W.T.; Grunden, A.M.; Hasona, A. y Shanmugam, K.T. (2001) *Molybdate transport*. *Res. Microbiol.* 152: 311-321.

Zumft, W.G. (1997) *Cell biology and molecular basis of denitrification*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

Capítulo II

Estudios de proteínas mononucleares de molibdeno que intervienen en el ciclo del nitrógeno en bacterias del orden *Rhizobiales*: Nitrato Reductasas de *Sinorhizobium meliloti* 2011.

II.1 Introducción

II.1.1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno llevado a cabo por microorganismos.

El nitrógeno es un elemento básico esencial para la vida debido a que es constituyente de macromoléculas biológicamente relevantes como proteínas y ácidos nucleicos. Existe en la biósfera en varios estados de oxidación, desde N (+V) a N (-III). Las interconversiones de las especies nitrogenadas constituyen el ciclo global biogeoquímico del nitrógeno (Figura II-1) el cual es sostenido por procesos biológicos en los cuales intervienen las enzimas de numerosos microorganismos (Richardson y Watmough, 1999).

Este ciclo puede dividirse en cuatro procesos fundamentales: i) *nitrificación*, ii) *desnitrificación*, iii) *amonificación* y iv) *fijación del nitrógeno atmosférico*. Existen un proceso adicional llamado *ANAMOX* sobre el cual no existe todavía mucha información (Van De Graff y col., 1995) y, procesos de detoxificación de compuestos nitrogenados nocivos (Radionov y col., 2005).

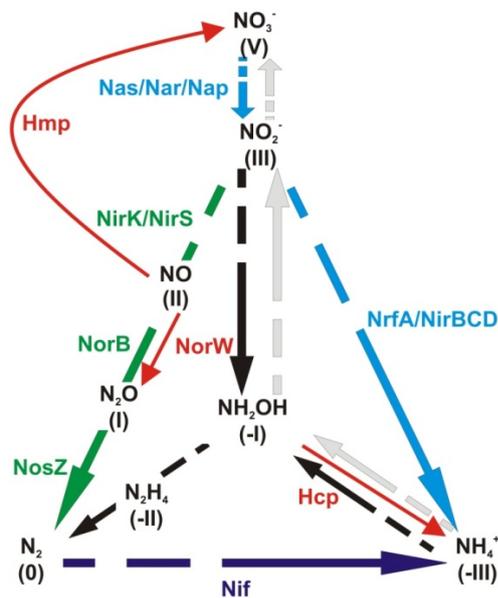
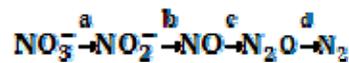


Figura II-1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno llevado a cabo por microorganismos. Cian: amonificación; Verde: desnitrificación; Azul: fijación de nitrógeno; Gris: nitrificación; Negro: proceso ANAMOX; Rojo: procesos de detoxificación.

El proceso de *amonificación* involucra la conversión de NO_3^- a NH_4^+ . El primer paso catalítico es la reducción de nitrato a nitrito. Posteriormente el nitrito es reducido

a amonio, el cual puede ser asimilado en forma de nitrógeno orgánico. Este proceso se llama *amonificación asimilativa* porque el nitrógeno se acumula en la forma de biomoléculas. La misma serie de reacciones, aunque a menudo catalizada por distintas enzimas, puede también ocurrir como parte de procesos de *amonificación desasimilativa*, donde el amonio producido es excretado en vez de asimilarse (Moreno-Vivián y col., 1999; Richardson y Watmough, 1999).

En el proceso de *desnitrificación*, el nitrato también sirve como sustrato. Este proceso involucra las reacciones catalizadas por las enzimas: a) nitrato reductasa (NR), b) nitrito reductasa (NiR), c) NO reductasa y d) N₂O reductasa.



El nitrato se reduce vía nitrito, a óxido nítrico, luego a monóxido de dinitrógeno y finalmente a nitrógeno molecular. Este proceso, también conocido como respiración, conserva la energía, la cual se almacena como ATP (Radionov y col., 2005).

El proceso de *fijación de nitrógeno*, es decir la conversión de N₂ atmosférico a NH₄⁺, es catalizado por la enzima nitrogenasa (Dos Santos y col., 2005). El proceso de *nitrificación* es el único segmento oxidativo del ciclo y en él el amonio se oxida a hidroxilamina, ésta a nitrito y por último a nitrato (Richardson y Watmough, 1999).

El estudio de los procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno tiene importancia de tipo ecológico-ambiental, agronómico y en salud humana, por citar algunos de los aspectos más destacables. Hay acuerdo en todo el mundo que el uso de fertilizantes en la agricultura conduce a la acumulación de nitratos en las napas de agua subterráneas y, que el consumo de agua potable con alto contenido en nitratos se ha asociado con cáncer gástrico y con metahemoglobinemia debido a la formación de compuestos genotóxicos N-nitroso mediante el accionar de bacterias del tracto intestinal (Van Mannen y col., 1996). El mayor impacto para el medioambiente proviene del proceso de eutrofización de los sistemas acuáticos, a la vez que los óxidos de nitrógeno generados mediante procesos de *desnitrificación* se asocian con el efecto invernadero y con la disminución del ozono estratosférico (Zumft, 1997).

II.1.2. Nitrato reductasas involucradas en los procesos de amonificación y desnitrificación.

En los procesos de *desnitrificación* y *amonificación* están involucradas diversas clases de NRs que presentan una diversidad de cofactores y de mediadores fisiológicos (dadores de electrones) relacionados con su función biológica. Se han descrito hasta el momento tres tipos de NRs: i) NR respiratoria, Nar, ii) NR periplasmática, Nap, y iii) NR asimilativa, Nas (Radionov y col., 2005; González y col., 2006). Todas son enzimas mononucleares de Mo (Hille, 1996). Según Hille, las NRs procariotas se agrupan dentro de la denominada familia de la dimetilsulfóxido reductasa, mientras que las derivadas de organismos eucariotas dentro de la familia de la sulfito oxidasa (González y col., 2006). Según el proceso en el cual intervienen, las NRs pueden dividirse en desasimilativas-respiratorias y asimilativas (Tabla II-1).

Característica	Vía Asimilativa	Vía Desasimilativa-Respiratoria	
		Respiración de NO_3^-	Reducción NO_3^-
Genes	<i>nasCA^a/narB^b</i>	<i>narGHI</i>	<i>napAB</i>
Localización	Citoplasma	Membrana	Periplasma
Reacción	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$
Grupos prostéticos	FAD ^c , centro [FeS],	Grupos hemo <i>b</i> , centro [FeS], MGD	Grupos hemo <i>c</i> , centro [FeS], MGD
Transporte	Si	Si	No
Función	Asimilación	Fuerza protomotriz	Disipación de poder
Regulación	NH_4^+ , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	respiración de nitratos O_2 , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	reductor y O_2 , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$

Tabla II-1. Reducción de nitratos en procariotas. ^a siguiendo la designación de NADH-NR en *Klebsiella oxytoca*. ^b siguiendo la designación de ferredoxina-NR de cianobacterias. ^c FAD está presente en la subunidad diaforasa de NADH-NR pero está ausente en ferredoxina-NR de cianobacterias.

Las primeras actúan en procesos respiratorios o de amonificación y las segundas se encuentran asociadas con cadenas enzimáticas para la generación de amonio y su posterior incorporación en material celular (Zumft, 1997; Radionov y col., 2005). Las enzimas asimilativas reciben ese nombre porque su función primaria es la

de generar moléculas o iones factibles de ser incorporados en material celular. Más complicado resulta distinguir entre procesos desasimilativos y respiratorios. Aunque generalmente se asume que la respiración y la reducción desasimilativa de nitratos son el mismo proceso, el concepto “desasimilativo” no distingue entre el modo de reducción de nitratos: respiratorio (conservación de la energía) u otros modos desasimilativos. Los últimos incluyen balance redox para disipar el exceso de poder reductor bajo ciertas condiciones metabólicas sin la generación de una fuerza protomotriz (Moreno-Vivián y Ferguson, 1998). La Figura II-2 muestra la estructura de una de las NRs desasimilativas encontradas, Nar, constituida por el heterooligómero NarGHI.

La enzima Nar se ha estudiado en numerosos microorganismos, entre ellos *Pseudomonas aeruginosa* (Carlson y col., 1992), *Paracoccus denitrificans* (Craske y Ferguson, 1986; Berks y col., 1995a), *Pseudomonas stutzeri* (Blümle y Zumft, 1991), *Pseudomonas fluorescens* (Philipot y col., 1997), y principalmente en *Escherichia coli* (Zumft, 1997). Consta de tres subunidades: α , β y γ . Las subunidades presentan diferentes tamaños y composición de cofactores. La subunidad α o NarG es la subunidad mayor (112-140 kDa) y presenta el cofactor bis-molibdopterina guanina dinucleótido (bis-MGD). La subunidad β o NarH tiene centros FeS que se encargan de la transferencia electrónica y su tamaño varía entre 54-64 kDa. El polipéptido γ o NarI (19-25 kDa) es la subunidad anclada a membrana de cara al citoplasma y contiene grupos hemo tipo *b*. Los tres polipéptidos están codificados por el arreglo común de genes *narGHI* (Zumft, 1997; Richardson y col., 2001). La reducción del nitrato ocurre de cara al citoplasma. La enzima recibe el aporte de electrones a través del sistema ubiquinoles de membrana de cara al periplasma, con liberación concomitante de protones hacia el espacio periplasmático y generación de una fuerza protomotriz. Así, su función puede definirse como de respiración anaeróbica con transducción de energía y puede categorizarse como respiratoria a la vez que como desasimilativa (Philipot y Højberg, 1999).

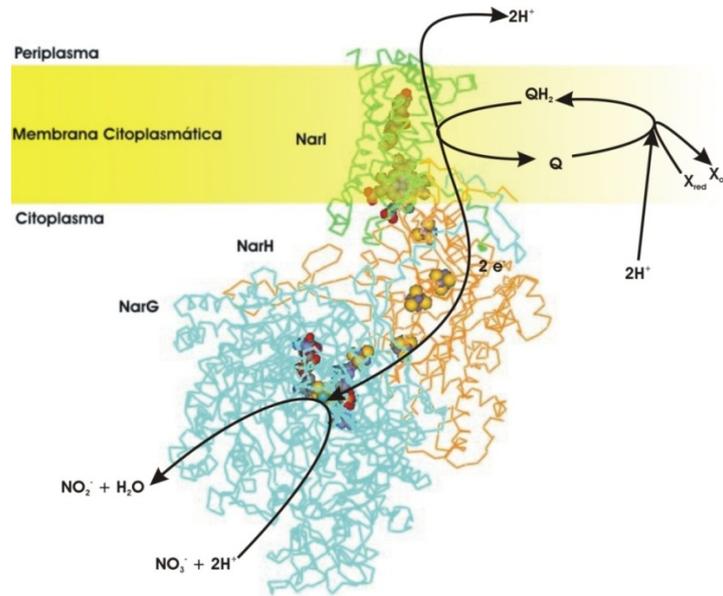


Figura II-2. Estructura cristalina y función de la enzima NarGHI (NRA) de *E. coli*. La enzima convierte el nitrato en nitrito, mediante el consumo de $2 e^-$ cedidos por el pool de quinoles reducidos, el cual se regenera por acoplamiento con otros sistemas de membrana como por ejemplo el sistema de la formato deshidrogenasa (FdhGHI). Se constituye lo que se conoce como translocación de protones por *loop* redox. Para construir la figura se usó el archivo PDB 1Q16.

La Figura II-3 muestra otra NR desasimilativa, la enzima Nap que consta de dos subunidades: NapA y NapB (Zumft, 1997; Moreno-Vivián y col., 1999; González y col., 2006).

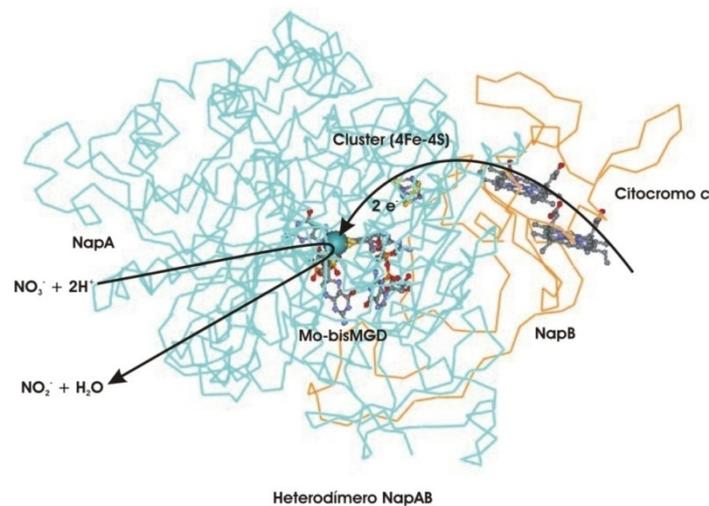


Figura II-3. Estructura cristalina y función de la enzima NapAB de *Rhodobacter sphaeroides*. La enzima convierte el nitrato en nitrito, mediante el consumo de $2e^-$ cedidos posiblemente por NapC o por NapHG a los grupos hemo c de NapB, que posteriormente los transfieren al Mo vía el clúster [4Fe-4S] de NapA. Para construir la figura se usó el archivo PDB 1OGY.

Existen algunas Nap, como las de *Desulfovibrio desulfuricans* y de *Desulfitobacterium hafniense*, que son homodiméricas y están solamente constituidas por NapA (Dias y col., 1999). NapA es la subunidad mayor con el cofactor Mo-bisMGD y un centro [4Fe-4S], con un tamaño de 80-90 kDa. NapB (~17 kDa) contiene dos grupos hemo c que se encargan de la transferencia de electrones vía el centro [4Fe-4S] al Mo para la reducción del nitrato. Los dos polipéptidos están codificados por un clúster de genes *nap* que ha sido caracterizado en un número de bacterias desnitrificantes, incluyendo *Ralstonia eutropha* (Berks y col., 1995b) y *Pa. denitrificans* (Siddiqui y col., 1993) y que a diferencia del operón de genes *nar*, presenta una mayor heterogeneidad. Nueve genes diferentes han sido identificados como componentes de los operones que codifican Naps en diferentes microorganismos. En el operón de genes *nap*, existen otros elementos como proteínas ancladas a membrana (NapC), proteínas integrales de membrana (NapH) y proteínas periplasmáticas (NapG) que interaccionan con los quinoles, siendo las posibles fuentes de electrones para NapB (Roldán y col., 1998; Brondijk y col., 2004). Otros genes como *napD*, *napE*, *napF*, *napK* y *NapL*, codifican para diferentes proteínas que no están directamente involucradas con la reducción de nitratos. NapD es una proteína de naturaleza citoplasmática que actúa como chaperona en el plegamiento de molibdoenzimas y NapF es una proteína que contiene 4 clústeres [4Fe-4S] lábiles y que participa en el ensamble de los centros FeS de NapA (Ilbert y col., 2003; Olmo-Mira y col., 2004).

Dos clases de NRs asimilativas, Nas, se han encontrado en bacterias: una tipo flavodoxina o ferredoxina-dependiente y otra NADH-dependiente (Figura II-4).

Ambos tipos de Nas contienen el cofactor Mo-bisMGD y un centro [4Fe-4S] hacia el extremo N-terminal de la subunidad catalítica pero carecen de los grupos hemo encontrados en otras NRs procariontas y en la de origen eucariota (Zumft, 1997). Las Nas ferredoxina/flavodoxina-dependientes se han aislado de *Clostridium perfringens*, *Azotobacter chroococcum*, *Ectothiorhodospira shaposnikovii* y de cianobacterias, mientras que las NAD(P)H-dependientes se han purificado a partir de células de *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodobacter capsulatus*, y *Bacillus subtilis* (Philipot y col., 1997; Radionov y col., 2005).

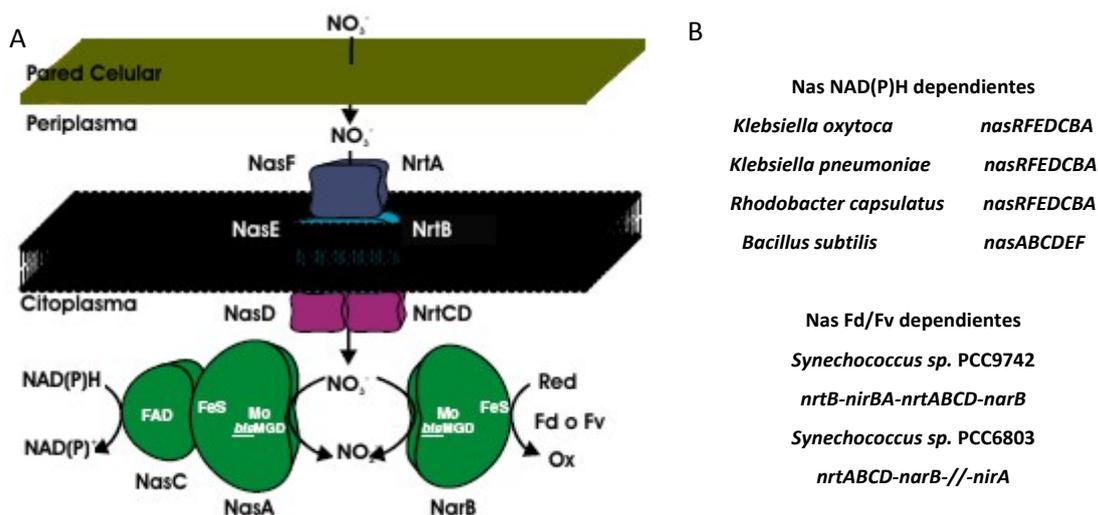


Figura II-4. Esquema para la asimilación de nitratos mediante las enzimas Nas. A) La figura compara las enzimas de *Klebsiella/Rhodobacter* (NasCA) y las de cianobacterias (NarB). B) organización del clúster de genes Nas para los casos citados en el texto. Símbolos: “-” distancia corta entre genes; “-/-” distancia larga entre genes (adaptado de González y col., 2006).

Las Nas NAD(P)H-dependientes son heterodímeros constituidos por una subunidad mayor (90-105 kDa) y una subunidad menor (~45 kDa). La subunidad mayor presenta un cofactor Mo-*bis*MGD y un centro [4Fe-4S] y dos centros [2Fe-2S] en *K. pneumoniae* y en *R. capsulatus*, pero carece de estos dos últimos en *B. subtilis*. La subunidad menor presenta FAD en su estructura en *K. pneumoniae* y en *R. capsulatus*, y además, 2 centros [2Fe-2S] en *B. subtilis* (Ogawa y col., 1995; Blasco y col., 1997).

Las Nas Ferredoxina/flavodoxina-dependientes son monoméricas con pesos moleculares en el rango de 75-105 kDa y contienen el cofactor Mo-BisMGD y un centro [4Fe-4S]. El dador de electrones fisiológico es una flavodoxina en *Azotobacter vinelandii* y, una flavodoxina y una ferredoxina en *Cyanobacteria* (Gangeswaran y col., 1993; Rubio y col., 1996).

Debido a la localización citoplasmática de este tipo de enzimas, la reducción de nitratos se lleva a cabo exclusivamente en el citoplasma y por ende este debe ser transportado al interior de la célula. El transporte de nitratos es llevado a cabo por transportadores específicos, usualmente codificados por genes arreglados en operones junto con los genes que codifican para las Nas. Una vez en el citoplasma, el nitrato es reducido en el sitio activo y liberado como nitrito. Una NiR localizada en el citoplasma o en el periplasma se encarga de transformar el nitrito liberado en amonio, el cual es tomado por el sistema de la glutamina sintetasa y glutamina 2-oxoglutarato

Si bien se sabe del efecto inhibitorio de los nitratos sobre la actividad nitrogenasa en los nódulos, el principal factor regulador de la actividad es el nivel de O_2 . La principal actividad del nitrato se daría entonces a nivel de los cambios que este provoca sobre la resistencia a la difusión del O_2 y la cantidad de nitrato que puede permanecer dentro del nódulo depende de la actividad NR en el bacteroide (Luciński y col., 2002). Se pueden observar dos comportamientos contrapuestos en cuanto a la actividad NR y la actividad nitrogenasa:

- **I:** Un aspecto antagónico relacionado al consumo competitivo del poder reductor por parte de los dos sistemas y la inhibición que produce el nitrito sobre el sistema nitrogenasa (Becana y Sprent, 1987; Becana y col., 1989; Arrese-Igor y col., 1997).
- **II:** Una acción sinérgica entre la actividad NR y el sistema nitrogenasa. Hay varios trabajos que demuestran que el incremento de la fijación de N_2 es debido a la presencia de actividad NR en el bacteroide y esto se debe fundamentalmente a la existencia del sistema desnitrificante en estas cepas de rizobacterias. Así, por un lado el sistema desnitrificante elimina el nitrito tóxico y, por otro genera ATP en ausencia de O_2 mediante la respiración de nitratos (García-Plazaola y col., 1993; Chamber-Perez y col., 1997).

La importancia de estudiar las enzimas derivadas de ambientes microaeróbicos radica en poder tener un perfil similar al que se encuentra dentro del bacteroide, es decir de la célula en estado de simbiote.

En la base de datos *RhizoBase* están cargados todos los genomas de rizobacterias reportados hasta el momento (<http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase>). En ella se encuentran reportados genes *nap*, *nas* y *narB*.

II.1.4 Metabolismo del nitrógeno en *Sinorhizobium meliloti*: estado actual del tema.

La secuencia del genoma completo de *S. meliloti* 1021 permite identificar varias proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno. El material genético de *S. meliloti* 1021 se distribuye en un genóforo y dos megaplásmidos, pSymB y pSymA. (Galibert y col., 2001) El megaplásmido pSymB posee genes que codifican para potenciales reguladores frente a iones nitrato/nitrito, transportadores de nitrato y nitrato y nitrito reductasas involucradas con procesos asimilativos (Finan y col., 2001).

Los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) y aquellos que intervienen en el proceso de desnitrificación (*azu*, *nap*, *nir*, *nor* y *nos*) se encuentran localizados en pSymA (Barnett y col., 2001). Sólo algunos pocos genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno se encuentran en el genóforo (Capela y col., 2001).

Solo se han llevado a cabo algunos pocos trabajos acerca del metabolismo del nitrógeno en *S. meliloti*: un estudio de la reducción asimilatoria de nitrato en *Rhizobium meliloti* (actualmente, *S. meliloti*) donde se aisló una NR soluble (Sekiguchi y Maruyama, 1988), un estudio de capacidades de desnitrificación (García-Plazaola y col., 1993) y, más recientemente, un estudio de cambios en la expresión de genes en condiciones de microaerobiosis y simbióticas (Becker y col., 2004).

En este capítulo de la tesis se presenta el estudio de enzimas NRs derivadas de *S. meliloti* 2011 en condiciones microaeróbicas. Las condiciones microaeróbicas son las que se dan cuando este tipo de microorganismo se encuentra en estado de endosimbionte dentro de las células de la raíz de leguminosas y no existen reportes previos de estos sistemas de enzimas en este microorganismo y en estas condiciones. Se reporta la caracterización cinética, espectroscópica y molecular de dos especies de NRs: una NR aislada de la fracción de membranas (NRm) y otra de naturaleza citoplasmática, con actividad dual NR y NiR (NR-NiR). Estas enzimas derivadas de *S. meliloti* 2011 aportan información relevante acerca de NRs en rizobacterias y son compatibles con lo reportado para estudios llevados a cabo en especies de *Bradyrhizobium*.

II.2 Materiales y Métodos

II.2.1 Cepas utilizada.

Para la producción de las metaloenzimas se utilizó *S. meliloti* 2011, cedida por el Dr. Antonio Lagares de la Universidad Nacional de La Plata.

II.2.2 Medios de cultivo.

Medio YMA (*Yeast Mannitol Agar*) para el mantenimiento y conservación de cepas.

Las distintas cepas fueron mantenidas a 4 °C en heladera en medio YMA (placas de Petri, tubos pico de flauta y eppendorfs). El medio posee por litro 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 53 mg de CaCl₂.2H₂O, 6 mg de FeCl₃.6H₂O, 50 mg de NaCl, 10 g de manitol, 0.5 g de KH₂PO₄, 0.57 g de ácido glutámico, 1 g de extracto de levadura, y 20 g de agar-agar.

Medio LB (*Luria Bertani*) modificado para la producción de biomasa e inducción de metaloenzimas (LB-Glc).

Las rizobacterias de crecimiento rápido como *S. meliloti* 2011 son capaces de desarrollar en medio LB modificado. El medio posee por litro 10 g de tripteína, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 2 g de glucosa, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 53 mg de CaCl₂.2H₂O, y 6 mg de FeCl₃.6H₂O. Cuando se evaluaron las condiciones de inducción de las enzimas el medio se adicionó de 89 mg de CuCl₂.2H₂O y/o 24 mg de Na₂MoO₄.2H₂O.

Medio TY (*Tryptone Yeast*) modificado para la producción de biomasa e inducción de metaloenzimas (TY-Glc).

Las rizobacterias son capaces de desarrollar en medio TY modificado. A menudo desarrollan con una apariencia más seca y fácil de recuperar por centrifugación comparada con el medio YMA donde producen más exopolisacárido. El medio posee por litro 5 g de tripteína, 3 g de extracto de levadura, 2 g de glucosa, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 0.7 g de CaCl₂.2H₂O, y 6 mg de FeCl₃.6H₂O.

II.2.3 Crecimiento de *S. meliloti* 2011.

Se evaluó el crecimiento y generación de exopolisacáridos (no deseables porque dificultan la recuperación celular por centrifugación) en medios *YMA*, LB-Glc y TY-Glc.

Para la producción de biomasa susceptible de inducción para la obtención de NRs y NiRs, *S. meliloti* 2011 se cultivó en medio LB-Glc líquido en aerobiosis y en agitación a 200 rpm en agitador orbital Boeco PSU20. Se repicó desde placa de medio semisólido *YMA* a un cultivo líquido de 5 mL de medio LB-Glc. El cultivo se repicó sucesivamente en proporción 1:9 (inóculo: medio fresco).

Se ensayaron las siguientes formas de producción: i) en Erlenmeyer 1 L en agitador orbital, ii) en biorreactor de 2 L Inteltech LH series 210 para la variable de producción por lotes y iii) en biorreactor de 2 L Inteltech LH Series 210 para la producción en lote alimentado con glucosa. Los ensayos se realizaron a 30 °C en aerobiosis y con agitación a 200 rpm en los tres casos. Para la variante en Erlenmeyer se inocularon 800 mL de medio fresco con 100 mL de cultivo saturado *over night*. Para las variantes en biorreactor, se trabajó sobre un volumen final de 1 L (900 mL medio fresco adicionado de 100 mL de inóculo) y con un caudal de aireación de 1 L h⁻¹. El cultivo en biorreactor por lote alimentado se adicionó de glucosa una vez que el nivel bajó a 0,5 g L⁻¹ y se mantuvo durante todo el crecimiento en 2 g L⁻¹ para evitar la formación de exopolisacárido. Se registraron los datos de A₆₀₀ a lo largo del proceso de producción de biomasa en los tres sistemas.

II.2.4 Producción NRs y NiRs en *S. meliloti* 2011.

Para evaluar las condiciones de inducción de NRs y NiR se realizaron cultivos en Erlenmeyers de 150 mL. Para ello, 22,5 mL de medio LB-Glc fresco adicionado de Cu²⁺ y MoO₄²⁻ se inocularon con la décima parte de inóculo. También se procesó un control sin adición de metales. El crecimiento se realizó en aerobiosis, en agitación a 200 rpm en agitador orbital a 30 °C. Cuando el cultivo llegó a saturación, se procedió a la inducción de las enzimas con 2 mM NO₃⁻, 2 mM NO₂⁻ y 2 mM NO₃⁻/ 2 mM NO₂⁻. Se procesaron tres muestras en condiciones aeróbicas y tres en presencia de N₂ para generar una microaerobiosis. Así se cubrieron todas posibilidades en aerobiosis y microaerobiosis, con uno de los inductores y con los dos inductores a la vez.

Finalmente se recolectaron las células por centrifugación (6000 rpm durante 10 min en centrífuga Hermle Z323K a 4 °C). Luego, se efectuaron dos lavados con *buffer* 50 mM Tris-HCl pH: 7,8 y centrifugaciones sucesivas. Por último las células se resuspendieron en 5 mL de *buffer* 50 mM Tris-HCl pH: 7,8 y se procedió a la disrupción de las células mediante sonicación. El extracto resultante se sometió a evaluación de contenido proteico y nivel de actividad.

Para evaluar la naturaleza del sitio activo de las NRs obtenidas también se realizaron cultivos de 25 mL en Erlenmeyers de 150 mL en aerobiosis y agitación en agitador orbital a 30 °C. El medio LB-Glc se adicionó de 1 mM MoO_4^{2-} , 1 mM WO_4^{2-} , y 1 mM MoO_4^{2-} / 1 mM WO_4^{2-} en ensayos independientes y se inoculó con el mismo cultivo saturado en medio LB-Glc sin agregado alguno de dichos metales. La inducción de las enzimas se realizó por adición de 2 mM NO_3^- y 2 mM NO_2^- y burbujeo con N_2 durante 10 min. Los cultivos se dejaron proseguir 24 h en condiciones de inducción y se procesaron de la misma manera que en el ensayo anterior. Finalmente se evaluó el contenido proteico y la actividad NR total (particulada y soluble).

Para la producción de las NRs y NiRs en *S. meliloti* 2011 se procedió a la obtención de biomasa en 2 fermentadores de 10 L Microferm[®] New Brunswick Scientific CO INC operados a 200-400 rpm, a 30 °C y con un flujo de aire de 1 vvm. Los biorreactores se operaron en modo de lote alimentado con glucosa. Para ello, 5 L de cultivo fresco inoculado se alimentaron con una solución de glucosa 26 g L⁻¹ a razón de 0,25 L h⁻¹ hasta un volumen de 7,5 L, manteniendo un nivel de glucosa de 2 g L⁻¹ a lo largo del proceso. Para 15 L de cultivo se utilizaron 130 g de glucosa. La inducción de las enzimas se realizó una vez alcanzada una $A_{600} \sim 8$ por adición de 2 mM NO_3^- y 2 mM NO_2^- y un burbujeo con N_2 por espacio de 30 min. Se realizaron medidas de actividad a las 8 h y a las 16 h de inducción.

II.2.5 Disrupción y subfraccionamiento de las células inducidas de *S. meliloti* 2011.

Luego de la inducción de las metaloenzimas, las células se colectaron por microfiltración tangencial de 15 L a 5 L. Finalmente las células se centrifugaron a 6000 rpm a 4°C y se lavaron con *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 hasta que no se detectaron restos de nitrito en el sobrenadante.

Las células (100 g en masa húmeda) se resuspendieron en 300 mL de *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 8,0 suplementado con 25 % p/v sacarosa, 1mM fenilmetanosulfonil fluoruro (*PMSF*), 20 µg/ mL Lisozima (Fluka) para permitir la generación de esferoplastos. La suspensión se dejó 30 min a temperatura ambiente y, luego se adicionó 1 mM EDTA y se la dejó durante 30 min. El periplasma se obtuvo a partir de los esferoplastos por centrifugación a 6000 rpm a 4 °C durante 90 min y se conservó a -80 °C hasta su uso.

Los esferoplastos se resuspendieron en *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 y se sometieron a disrupción en sonicador SONICS en ciclos de 40 s a 300 Watt de potencia durante 8 min en baño de hielo. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm por espacio de 10 min a 4 °C para eliminar los esferoplastos no disruptos. El sobrenadante (membranas y citoplasma) se centrifugó 45 min a 45000 rpm en ultracentrífuga Beckman Coulter Optima LE-80K (rotor 90Ti). El *pellet* constituyó la fracción de membrana y el sobrenadante el extracto citoplasmático. El sobrenadante se dializó contra el mismo *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 y se preservó a -80 °C hasta su uso.

La fracción de membranas se resuspendió con *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 adicionado de 2,5 % v/v Triton X-100 y 1 mM (*PMSF*) y se llevó a una concentración final cercana a los 10 mg proteína mL⁻¹. La mezcla se mantuvo en agitación suave a 4 °C. El extracto de proteínas de membrana solubilizadas con Triton X-100 se recuperó por ultracentrifugación a 45000 rpm durante 45 min a 4 °C. El extracto de membrana se dializó contra *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 -1% Triton X-100 y se conservó a -80 °C hasta su uso.

II.2.6 Purificación de la NR de membrana de *S. meliloti* 2011.

La fracción de proteínas de membrana solubilizadas con Triton X-100 se sembró en una columna *DEAE-Sepharose Fast Flow* (2,6 x 45,5 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB) equilibrada con *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 plus 1 % Triton X-100. Una vez sembrada la muestra, la columna se lavó con 2 volúmenes de *buffer* de equilibrado y se procedió a la elusión por aplicación de un gradiente de 0-500 mM NaCl en *buffer* de equilibrado (4 volúmenes de columna). Las fracciones con actividad NRm se

juntaron y dializaron contra *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 0,1 % Triton X-100-50 mM NaCl. Luego se concentraron por ultrafiltración (30K Amicon[®] Ultra).

Las fracciones concentradas de NRm del primer intercambiador aniónico, se cargaron en una columna *Source15Q* (1,6 x 13 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB) equilibrada con *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 0,1 % Triton X-100-50 mM NaCl. Luego del lavado con dos volúmenes de columna con *buffer* de equilibrado, se procedió a la remoción de las proteínas por aplicación de un gradiente 50-500 mM NaCl en 4 volúmenes de columna. La fracción NRm activa se dializó contra *buffer* 100 mM Tris-HCl pH: 8,0 0,1 % Triton X-100 y luego se concentró por ultrafiltración. La fracción de NRm enriquecida se sembró en un tercer intercambiador aniónico (*DEAE-Sepharose Fast Flow*, 1,0 x 16 cm, Amersham Pharmacia Biotech) equilibrado con *buffer* 100 mM Tris-HCl pH: 8,0 0,1 % Triton X-100. Las proteínas se liberaron por aplicación de un gradiente 100-500 mM Tris-HCl en *buffer* de equilibrado (120 mL). La fracción NRm activa se dializó y concentró contra *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 0,1 % Triton X-100. La fracción activa enriquecida en NRm se sembró en un gel nativo preparativo (8 %, 33 min a 25 mA) en condiciones no desnaturalizantes y se la recuperó mediante electroelución de las bandas de actividad (ElectroEluter 422, Biorad; 6 h a 8-10 mA por tubo cargado). Finalmente, las bandas electroeluidas se dializaron contra *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 0,1% Triton X-100 y se concentraron por ultrafiltración. La fracción NRm electroeluida se conservó a -80 °C.

II.2.7 Purificación de la NR-NiR citoplasmática de *S. meliloti* 2011.

Las proteínas del extracto soluble de *S. meliloti* 2011 se sembraron en un intercambiador aniónico *DEAE-Sepharose Fast Flow* (2,6 x 34,5 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB) equilibrada con *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna y luego se procedió a la elución de las proteínas retenidas por aplicación de un gradiente 0-500 mM NaCl en *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6 (2 mL min⁻¹). Las fracciones activas se juntaron y concentraron en unidades de ultrafiltración 30K Amicon[®] Ultra por centrifugación a 5500 rpm a 4 °C y luego se desalaron en columna Biogel P6-DG (1,5 x 20 cm, Biorad). La fracción activa desalada equilibrada en *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6, se cargó en un segundo intercambiador, *Source15Q* (1,6 x 13 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB). La elución se llevó a cabo

con un gradiente de 20-500 mM Tris-HCl pH: 7,6 distribuido en 5 volúmenes de columna. Las fracciones activas se juntaron, se equilibraron contra *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 suplementado con 200 mM NaCl y se concentraron por ultrafiltración. Alícuotas de 500 μ L se inyectaron en una columna *Superdex* 200 (1,5 x 42 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB). Las fracciones se recolectaron por elusión con el *buffer* de equilibrado. Las fracciones con actividad NR-NiR se equilibraron en *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 y se concentraron por ultrafiltración. Las fracciones activas enriquecidas derivadas del paso de tamiz molecular se sometieron a electroforesis preparativa en geles nativos al 8 % (33 min, 25 mA). Luego se cortaron las bandas de actividad y se electroeluyeron según se indicó para NRm. Finalmente, las fracciones electroeluidas se dializaron contra *buffer* 20 mM Tris-HCl pH: 7,6 y se concentraron por ultrafiltración. Las fracciones NR-NiR citoplasmática activas se conservaron a -80 °C.

II.2.8 Técnicas analíticas y de caracterización fisicoquímica empleadas.

Ensayos cinéticos.

La actividad NR/NiR se determinó usando el método de Ida con leves modificaciones introducidas por nosotros. (Ida, 1977) La actividad NR/NiR-metilviológeno dependiente se ensayó en micro volúmenes de 250 μ L. La mezcla de reacción contenía: 30 mM pH: 7.0 *buffer* fosfato, 0,3 mM metilviológeno (MV), 5 mM ditionito de sodio (solución fresca preparada en 10 mM NaHCO₃), y la cantidad adecuada de enzima y nitrato/nitrito como se describe más adelante en cada apartado. La reacción se inició por adición de la mezcla ditionito-NaHCO₃ y mantenido a 30°C durante el tiempo necesario (15-30 min). La reacción se terminó por agitación vigorosa en *vortex* hasta la oxidación completa del exceso de reductor (desaparición de color azul).

La aparición/desaparición de nitritos una vez finalizada la reacción se determinó mediante la adición consecutiva de dos reactivos: 1 % p/V sulfanilamida (3 M HCl) y 0.01 % p/V clorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina y lectura posterior de la absorbancia a 540 nm. Se realizaron las curvas de calibrado pertinentes para evaluar la linealidad en la respuesta a la concentración de nitritos. Se efectuaron diluciones

adecuadas en caso de desviación de la linealidad para mantenerse dentro del rango lineal de detección del nitrito generado, en caso de ser necesario.

Para ensayos de *screening* de actividad NR y NiR, ya sea en el extracto crudo o en fracciones durante la purificación, se utilizaron 25-50 μL de muestra y 20 mM nitrato o 5 mM nitrito respectivamente. Se ensayaron los blancos pertinentes.

Para los estudios cinéticos se empleó una cantidad adecuada de enzima purificada (ver más adelante en cada apartado) y 5-900 μM nitrato o 50-3500 μM nitrito según sea el ensayo de NR o NiR respectivamente.

En el caso del ensayo continuo para la detección de actividad enzimática se procedió al seguimiento de la oxidación del MV en condiciones anaeróbicas a 600 nm (Tan y col., 1994). Se evaluó la actividad sulfito reductasa y NiR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. La reacción se ensayó en cubetas semimicro de vidrio con septo de goma. Se partió de 1.6 mL de mezcla de reacción 30 mM pH:7.0 *buffer* fosfato, cantidad suficiente de MV para alcanzar un $A_{600} \sim 0,55$ (solución madre de MV, 0,8 mg mL^{-1}), 5 mM ditionito de sodio (solución fresca preparada en 10 mM NaHCO_3) y 1,2 μg de enzima. La mezcla se adicionó con sulfito de sodio hasta una concentración final de 1 mM y se evaluó la actividad sulfito reductasa en volumen final de 1,8 mL. Luego la mezcla se adicionó con nitrito hasta una concentración de 1 mM y se evaluó la actividad NiR en volumen final de 2 mL. Todas las soluciones empleadas y la mezcla inicial se desgasificó con argón durante 15 min. El agregado de sulfito y nitrito se realizó con microjeringas Hammliton sin volumen muerto.

Ensayos de inhibición.

Las muestras activas se sometieron a inhibición con azida, cianuro, clorato y amonio en ensayos independientes. La reacción se llevó a cabo después de 10 min de incubación con cada uno de los inhibidores. Los ensayos se llevaron a cabo con la cantidad adecuada de enzima y a una concentración saturante de sustrato como se describe en cada apartado más adelante. La azida sódica (NaN_3) se empleó en el rango 12.5-500 μM y el cianuro de potasio se adicionó en el rango 0.6-12 mM. El clorato de sodio, un inhibidor característico de las NRs de membrana, se ensayó sobre las muestras puras en el intervalo de concentraciones 50-3500 μM . El dietilditiocarbamato de sodio, un inhibidor de las NiRs de cobre, se usó a una concentración de 1 mM. El

cloruro de amonio, un inhibidor de NR y NiR asimilatorias se ensayó en concentraciones del orden de 1-10 mM.

Espectroscopía UV-vis.

Los espectros UV-vis de las muestras purificadas y las distintas fracciones a lo largo de la purificación se tomaron con espectrofotómetro Perkin Elmer 20 UV-Vis. Se efectuaron barridos en el rango de 250 a 800 nm. Las lecturas del ensayo de actividad también se realizaron con este equipo.

Determinación del contenido proteico.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford modificado (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como estándar. Las lecturas se realizaron a 595 nm. Cuando fue necesario se realizaron ajustes para determinación de proteínas de membrana extraídas con Triton X-100.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (*PAGE*) nativos en geles verticales no desnaturizantes según lo descrito por Davis (Davis, 1964). Las muestras activas (solubles) se sembraron en geles nativos al 8 % acrilamida-bisacrilamida, mientras que las muestras derivadas de la extracción de membranas fueron sembradas en geles nativos adicionados de 0.05 % Triton X-100.

También se realizaron geles desnaturizantes (*SDS-PAGE*) según lo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida desnaturizantes (12-15 %) luego del tratamiento a 100 °C durante 3 min en buffer de siembra 1X. Para evitar el agregado de las proteínas de membrana, las muestras extraídas con Triton X-100 se trataron en *buffer* 1X a 40 °C durante 30 min.

Determinación del tamaño molecular de las muestras de enzimas *as-prepared* mediante tamiz molecular.

El tamaño molecular de las enzimas aisladas se estimó mediante cromatografía de filtración por geles. Una columna preempaquetada Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) conectada a un equipo HPLC se equilibró con *buffer* 300 mM Tris-HCl pH:

7,6 adicionado de 0,2 % V/V Tween 80. La elusión isocrática se realizó a un flujo de 0,4 mL min⁻¹ y se detectaron a 280 nm las proteínas eluidas. Para la calibración se emplearon marcadores de alto peso molecular (*HMWM*, Pharmacia). Los marcadores empleados fueron: ferritina (440 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa).

Determinación de actividad NR/NiR en geles nativos.

La determinación de actividad NR/NiR en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes se llevó a cabo luego de correr las muestras activas en geles nativos al 8 %. El gel se incubó en 8 mL de buffer fosfato pH: 7.0 adicionado de 64 mg ditionito de sodio, 68 mg NaHCO₃ y 4 mg metilviológeno. El tubo de reacción se burbujeó con N₂ durante 15 min. El gel se tiñó de un color azul intenso debido a la presencia de metilviológeno reducido. La reacción se inició por agregado de nitrato o nitrito (10 mM final saturado en N₂). La mezcla se incubó en leve agitación a 30 °C hasta la aparición de las bandas de actividad incoloras, lo que indica la oxidación local del MV reducido. Las bandas de actividad se fijaron removiendo la mezcla en atmósfera de N₂ y adicionando posteriormente una solución al 2.5 % de *TTC* (*Triphenyl Tetrazolium Chloride*) saturado en N₂. El fondo con metilviológeno reducido se tiñó de color rojo. Luego el gel se lavó en agua y se conservó en etanol al 50 % antes de ser secado.

Detección de grupos hemo en gel nativo.

Para la tinción de proteínas con grupos hemo, se corrieron geles nativos y luego se incubaron durante 10 min en mezcla metanol:acetato de sodio (0.25 M, pH: 5.0) en proporción 3:7 (V:V). A continuación el gel se colocó en una solución de o-dianisidina (Fluka) 6 mM en metanol y 0.25 M acetato de sodio pH: 5.0 en proporción 3:7, en oscuridad durante 20 min. La actividad peroxidasa se dejó evolucionar durante 1 h después del agregado de 60 mM H₂O₂. Finalmente se lavó durante 30 min en H₂O: metanol: ácido acético (8:1:1, V:V:V) para fijar las bandas de actividad de color pardo. Una metaloproteína roja con grupos hemo *c* aislada de *S. meliloti* 2011 se empleó como control positivo.

Determinación de actividad peroxidasa en solución asociada a grupos hemo.

La actividad peroxidasa asociada a hemo en geles de poliacrilamida es adecuada para la detección de hemo *c*, aún en condiciones desnaturalizantes (Francis y Becker, 1984), mientras que el hemo *b* rara vez se detecta, dado que suele perderse durante la corrida electroforética (Chaudhry y MacGregor, 1983; Craske y Ferguson, 1986). Para ello se diseñaron experimentos de detección en solución, utilizando la enzima *as-prepared*. Se realizaron ensayos de oxidación de *o*-dianisidina mediante H_2O_2 acoplada a la actividad peroxidasa de los grupos hemo. Se disolvió *o*-dianisidina en ácido acético a una concentración de $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ y luego se la diluyó con agua destilada (1/8). Los ensayos de actividad peroxidasa asociada a hemo se realizaron en cubetas de 1 mL. Cantidades adecuadas de enzima y H_2O se adicionaron a $965 \mu\text{L}$ de la solución de *o*-dianisidina y la reacción se inició por adición de $10 \mu\text{L}$ de H_2O_2 (30 %, Merck). La oxidación de la *o*-dianisidina se siguió espectrofotométricamente mediante barridos (250-800 nm) durante el transcurso del tiempo de reacción (0-30 min).

Determinación de metales y análisis de nucleótidos sobre las muestras de enzimas *as-prepared*.

El análisis del contenido de Fe y Mo en las muestras de enzimas purificadas se derivó al SECEGRIN-CONICET y se lo determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer Analyst 800. La determinación de Fe se realizó por atomización por llama y la de Mo por atomización electrotérmica. Se empleó el método de curva de calibrado con estándares acuosos certificados.

El análisis de mononucleótidos se llevó a cabo según Correia y colaboradores (Correia y col., 2008). La extracción de molibdopterina se llevó a cabo principalmente según el método descrito por Kretzer y col. (Kretzer y col., 1993) y Gremer y Meyer (Gremer y Meyer, 1996). Los residuos pterina se extrajeron a partir de la proteína con H_2SO_4 concentrado en una proporción 3 % V/V. La muestra se calentó a $96 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min y se centrifugó 10 min a $18000 \times g$. El sobrenadante se aplicó a una columna Supersher100 RP-18 *end-capped* (Merck) conectado a un equipo HPLC (L-7400, D-7000 y L-7100, Merck) equilibrada con *buffer* 50 mM acetato de amonio pH: 6,8. La elusión isocrática se realizó con el mismo *buffer* a un flujo de 1 mL min^{-1} con detección a 254 nm. Las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo por inyección de

cantidades conocidas de patrones de nucleótidos (CMP y GMP, Sigma) sujetas al mismo tratamiento.

Dependencia de Mo de la actividad NR de las enzimas *as-prepared*.

El tungstato es un inhibidor bien conocido de muchas molibdoenzimas dado que substituye al molibdeno ligado a la piranopterina, dando lugar a una forma inactiva (Amy y Rajagopalan, 1979). Los efectos inhibitorios pueden ocurrir a concentraciones submilimolares, pero concentraciones de 1-10 mM son necesarias para la máxima inhibición (Enoch y Lester, 1972). Las muestras de enzimas purificadas se sometieron a inhibición con tungstato 0,5 mM y 5 mM. Las condiciones del ensayo de actividad enzimática son similares a las descritas en dosaje de actividad NR y ensayos de inhibición.

II.3 Resultados

II.3.1 Optimización del cultivo de *S. meliloti* 2011.

S. meliloti (De Lajudie y col., 1990) es una bacteria Gram negativa que posee un metabolismo respiratorio con O₂ como aceptor final y que se desarrolla en condiciones óptimas en el rango de temperaturas de 25-30°C. Quimiorganotrófico, es capaz de utilizar una amplia variedad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como fuentes de carbono. Asimismo, las sales de amonio, nitratos y nitritos sirven como fuente de nitrógeno. Su desarrollo en medio con manitol produce una reacción ácida y la producción de exopolisacáridos.

S. meliloti 2011 se mantuvo en medio *YMA* semisólido, por espacio de 5 meses a 4 °C en heladera. Conservada de esa manera, la cepa no mostró cambios morfológicos durante el tiempo de conservación. Los repiques se realizaron frecuentemente de medio semisólido a medio semisólido y luego se incubaron por espacio de 5 días en estufa a 30 °C (Figura II-6A). Se utilizaron variantes de placa, cultivo en pico de flauta y minicultivos por punción en *ependorfs*. Adicionalmente la cepa también se conservó en crioviales en *freezer* a -20 °C o -70 °C, adicionando un cultivo saturado en medio *YM* (medio *YMA* sin agar-agar) líquido con glicerol 20-50 %.

Se realizaron pruebas de crecimiento en distintos medios en condiciones aeróbicas y en agitación en agitador orbital a 200 rpm, en volúmenes de 25 mL de medio. Los medios se inocularon con 2,5 mL de cultivo saturado en medio *YM*. Al cabo de 8 h, el crecimiento fue lento y con producción de exopolisacárido en el medio *YM* ($A_{600} = 0,30 \pm 0,05$) (Figura II-6B). Los medios LB-Glc y TY-Glc permitieron el desarrollo adecuado del cultivo en tiempo y forma ($A_{600} = 0,80 \pm 0,05$ y $0,60 \pm 0,04$, respectivamente). El medio LB-Glc permitió obtener un mayor rendimiento de biomasa y una menor producción de exopolisacárido, lo que facilita la recolección posterior de las células por centrifugación.

Como el medio LB-Glc resultó ser el más propicio para la producción de biomasa de *S. meliloti* 2011, se decidió avanzar en estudios de producción a mayor escala en *agitador orbital* y fermentadores (por lote y lote alimentado con glucosa), utilizando este medio de cultivo.

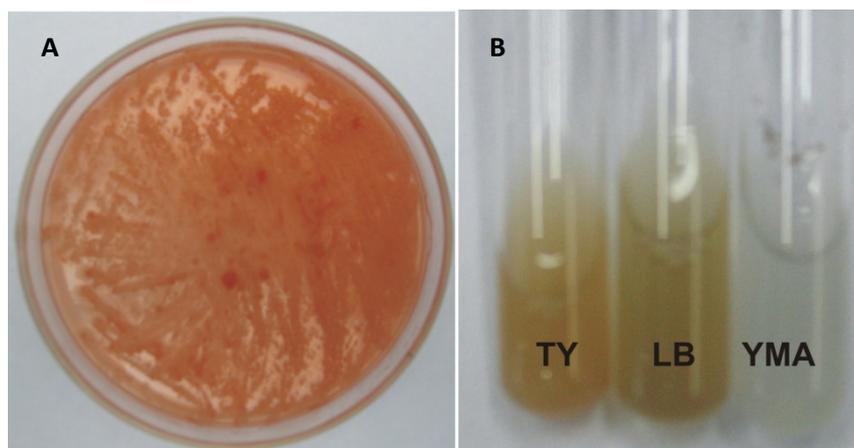


Figura II-6. Crecimiento de *S. meliloti* 2011. A) Cultivo en placa de medio YMA para mantenimiento luego de 5 días de incubación a 30 °C; B) Cultivos en medio líquido luego de 1 día de cultivo aerobio a 200 rpm en estufa a 30 °C.

La Figura II-7 muestra los resultados obtenidos para la caracterización del crecimiento *S. meliloti* 2011 en medio LB-Glc en diversas formas operacionales.

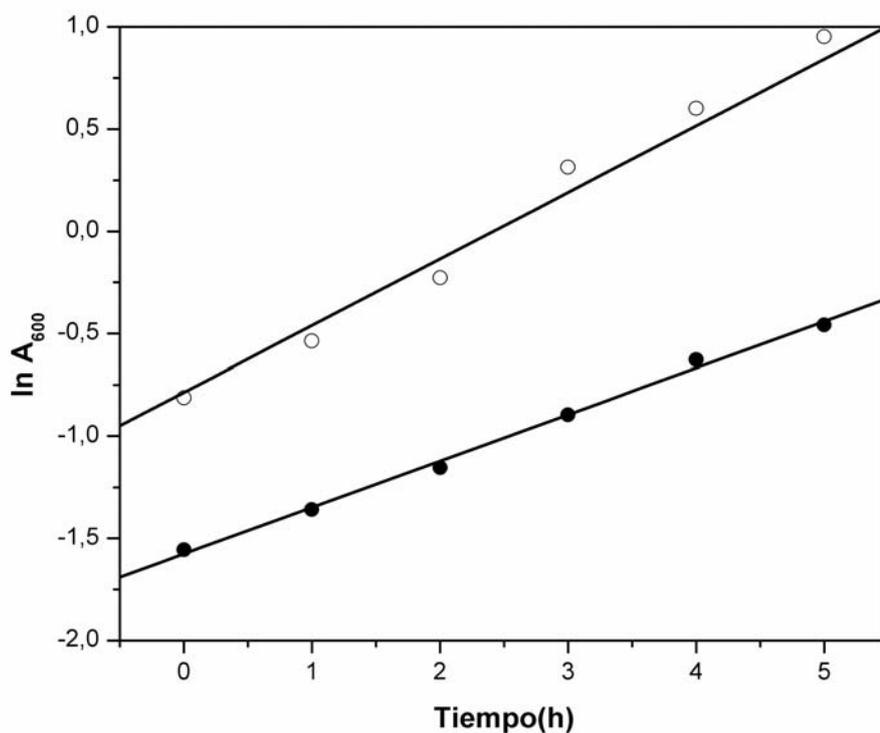


Figura II-7. Crecimiento aeróbico de *S. meliloti* 2011 en medio LB-Glc. (●) Crecimiento en reactor por lote. (o) Crecimiento en reactor por lote alimentado con glucosa.

Los niveles de producción de células, evaluados en términos de A_{600} en fase estacionaria fueron los siguientes: 0,8, 2,0 y 8,0 para cultivos en agitador orbital, lote y lote alimentado, respectivamente. La aireación fue fundamental para mantener el cultivo en crecimiento acoplado al consumo de glucosa y, la agitación para evitar asociaciones en *biofilm* que estimularan la producción de exopolisacárido.

La velocidad de crecimiento (μ) se calculó por regresión lineal de $\ln A_{600}$ vs tiempo. Los valores obtenidos para un cultivo por lotes y un cultivo por lote alimentado con glucosa fueron $0,21 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ y $0,33 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura II-7). Un cultivo en fermentador operado en la forma de lote alimentado con glucosa es la opción más adecuada para obtener mayor concentración de biomasa. La biomasa recuperada a partir de 10 L de cultivo en un fermentador *fed-batch* operado en 24 horas, rinde lo mismo que 32 L de cultivo operados en agitador orbital (en lotes de 3,6 L), consumiendo 2 meses de recolecciones.

II.3.2 Optimización de la producción de NRs en *S. meliloti* 2011.

Nuestro primer objetivo fue producir NRs y NiRs en condiciones de microaerobiosis de la célula en estado libre y por ende, la expansión celular se realizó en aerobiosis mientras que la inducción de las enzimas debió realizarse en condiciones microaeróbicas en atmósfera de nitrógeno. En estas condiciones, las vías susceptibles de ser estimuladas son la desnitrificación y la respiración de nitratos.

Para optimizar la producción de NRs en *S. meliloti* 2011 se realizaron cultivos en condiciones aeróbicas, y microaeróbicas, en presencia y ausencia de nitratos y nitritos y en presencia de ambos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II-8. Se observa claramente que el desarrollo de la actividad NR en un buen nivel luego de 16 horas de inducción de un cultivo de *S. meliloti* 2011 se obtiene en condiciones de microaerobiosis y en presencia de nitrato y nitrito (2 mM cada uno). Este resultado indica que tanto la adición de nitrato y nitrito como la condición de microaerobiosis son necesarias para lograr un nivel máximo de actividad NR en *S. meliloti* 2011.

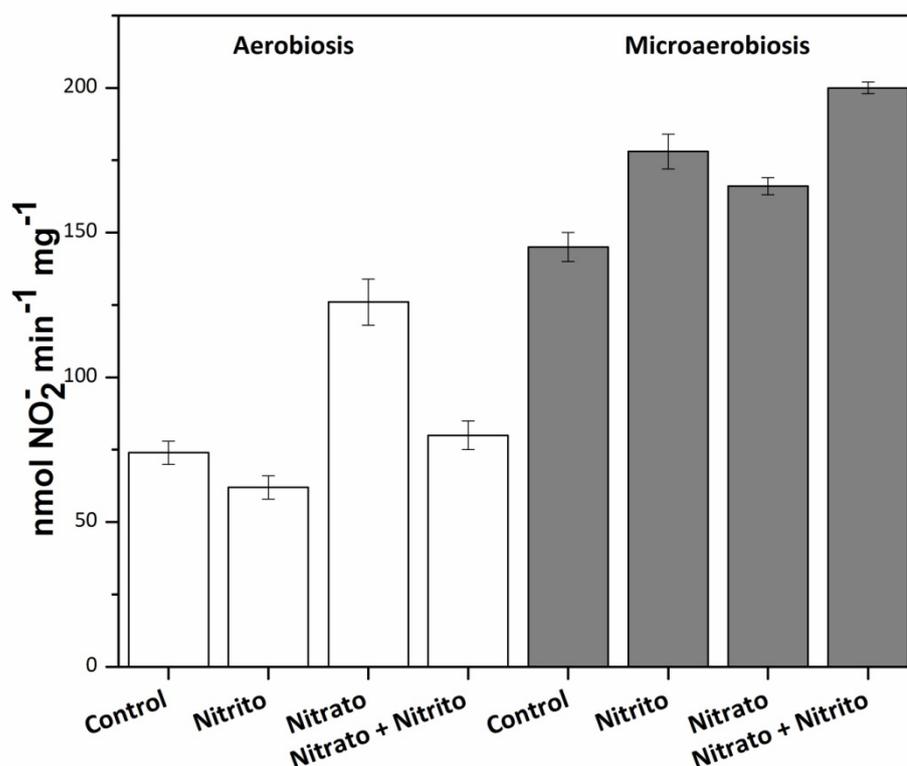


Figura II-8. Actividad NR total de *S. meliloti* 2011 en medio LB-Glc: niveles de actividad frente a agentes de inducción en el medio. El valor de actividad es el promedio de tres determinaciones independientes \pm SE. Se cultivó *S. meliloti* 2011 hasta saturación y luego se fraccionó en volúmenes de 10 mL para inducción de la actividad durante 16 h. Para el experimento se manejaron varias condiciones de cultivo: en aerobiosis con y sin agregado de inductores, y en microaerobiosis con y sin agregado de inductores. Condiciones del ensayo de actividad NR: 1 mM NO₃⁻, 10 min a 30 °C.

II.3.2 Influencia en la actividad NR de la adición de Mo a cultivos de *S. meliloti* 2011.

Como se mencionó anteriormente en el apartado de materiales y métodos, el tungsteno es un inhibidor bien conocido de varias molibdoenzimas involucradas con el metabolismo del nitrógeno en plantas y bacterias. Este sustituye el molibdeno en la piranopterina dando lugar a formas inactivas de las enzimas (Takahashi y Nason, 1957; Notton y Hewit, 1971; Amy y Rajagopalan, 1979).

Se evaluó la actividad NR desarrollada por *S. meliloti* 2011 en condiciones de inducción, luego de haber sido crecida en aerobiosis en presencia de 1 mM MoO₄²⁻, 1 mM WO₄²⁻ y 1mM MoO₄²⁻ / 1 mM WO₄²⁻. Cultivos de células de *S. meliloti* 2011 crecidas en ausencia de ambos iones se ensayaron como controles. Las actividades NR desarrolladas se muestran en la tabla II-2. Los mayores niveles de actividad en

presencia de molibdato claramente indican que el molibdeno es esencial para la actividad NR y que el tungstato conduce a una disminución de la actividad.

Muestra	Actividad NR (nmol NO ₂ ⁻ min ⁻¹ mg ⁻¹)
Control	360 ± 8
1 mM MoO ₄ ²⁻	488 ± 7
1 mM MoO ₄ ²⁻ / 1 mM WO ₄ ²⁻	88 ± 6
1 mM WO ₄ ²⁻	67 ± 2

Tabla II-2. Actividad NR total de *S. meliloti* 2011 en medio LB-Glc: actividad frente a Mo o W adicionado. El valor de actividad es el promedio de tres determinaciones independientes ±SE. Condiciones del ensayo de actividad: 10 mM NO₃⁻, 15 min a 30 °C.

II.3.3 Producción y purificación de la NR de membrana de *S. meliloti* 2011.

A lo largo de este trabajo hemos podido extraer una NR de membrana a partir de *S. meliloti* 2011 por tratamiento con Triton X-100. Luego del proceso de subfraccionamiento de los esferoplastos disruptos por sonificado, se logró extraer un extracto crudo marrón rojizo por tratamiento con 2,5 % v/v Triton X-100, mediante ultracentrifugación.

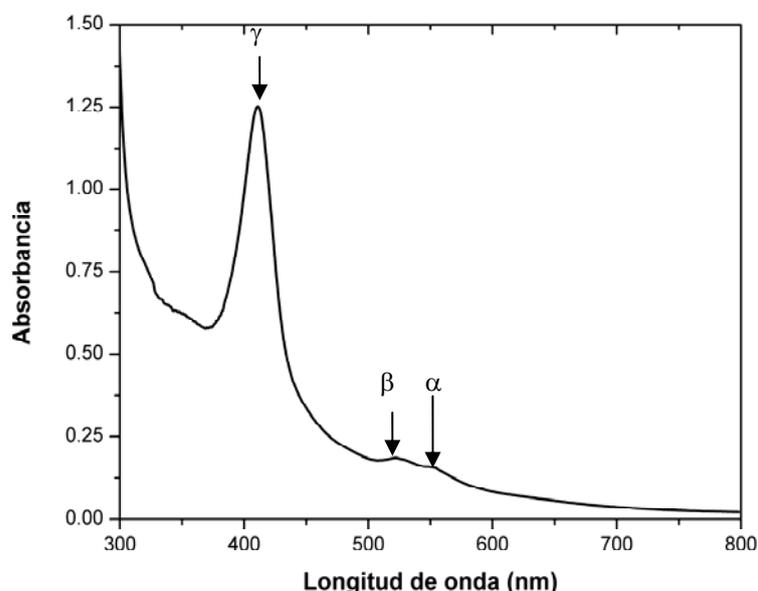


Figura II-9. Extracto crudo de membrana de *S. meliloti* 2011 con Triton X-100. Pueden observarse las tres bandas típicas de los grupos hemo c ($\alpha = 552$ nm, $\beta = 525$ nm y $\gamma = 407$ nm). Los citocromos constituyen la principal de las impurezas detectable a nivel espectroscópico.

Como puede observarse en la figura II-9, el espectro del extracto crudo de membrana presenta un importante nivel de citocromos lo cual los convierte en las principales impurezas a eliminar. Puede observarse la banda típica de los grupos hemo $c: \alpha \sim 550 \text{ nm}$ (Nelson y Cox, 2005).

La bibliografía muestra la utilización de diversas técnicas cromatográficas para la purificación de NRs de membrana (Fernández-López y col., 1996; Hettmann y col., 2003; Pinho y col., 2005; Polcyn y Luciński, 2006; Correia y col., 2008). Conforme prosigue la purificación los niveles de detergente deben reducirse al mínimo, más aún si se van a utilizar técnicas de interacción hidrofóbica (O'Farrell, 2004) o de tamiz molecular (Cutler, 2004).

El extracto se purificó y enriqueció en actividad NRm de *S. meliloti* 2011 mediante varios pasos cromatográficos y un proceso de electroelución final. El extracto crudo mostró una actividad enzimática específica de $232 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Finalmente, luego de la electroelución se logró obtener una muestra que desarrolló una actividad enzimática específica de $1934 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Al final del proceso se obtuvo un rendimiento del 22 %. En la figura II-10 puede observarse el enriquecimiento en la banda proteica correspondiente a la actividad NRm.

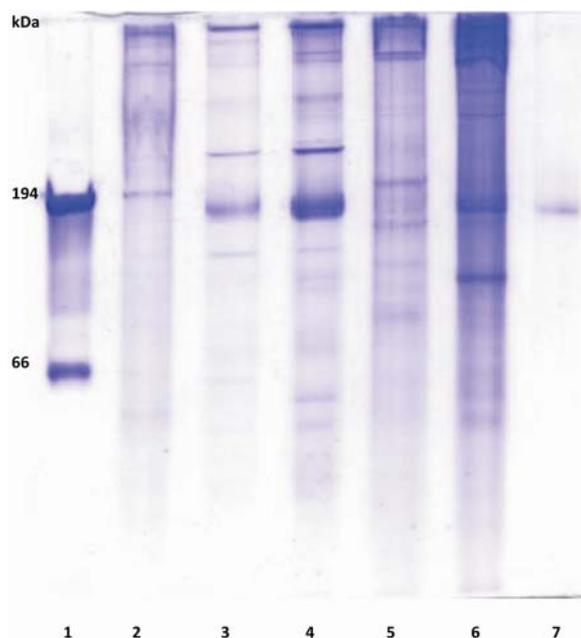


Figura II-10. Seguimiento de los procesos de purificación, gel nativo 8 %. 1) Marcadores: Aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* (194 kDa) y BSA (66 kDa). 2) Fracción de membrana solubilizada con Triton X-100. 3) y 5) Fracciones de la primera columna con actividad NR. 4) y 6) Fracción con actividad NR de la tercera columna cromatográfica. 7) Fracción electroeluida.

La enzima nativa aislada presentó una elevada pureza a nivel electroforético. Esto se logró después de tres pasos cromatográficos de intercambio iónico y un proceso de electroelución final. También se utilizaron técnicas de tamiz molecular, pero no fueron eficientes a la hora de eliminar las impurezas de mayor tamaño molecular, las cuales copurificaban con la muestra; además la resolución se veía afectada por la presencia de detergente en las muestras tratadas y por ello se decidió realizar el último paso de la purificación mediante una electroelución.

II.3.4 Propiedades moleculares de la NRm de *S. meliloti* 2011.

La muestra electroeluída se observó como una única banda en gel nativo al 8%, tanto en geles de tinción con *Coomasie Blue* como en geles de tinción específica para actividad NR (Figura II-11A, calle 3).

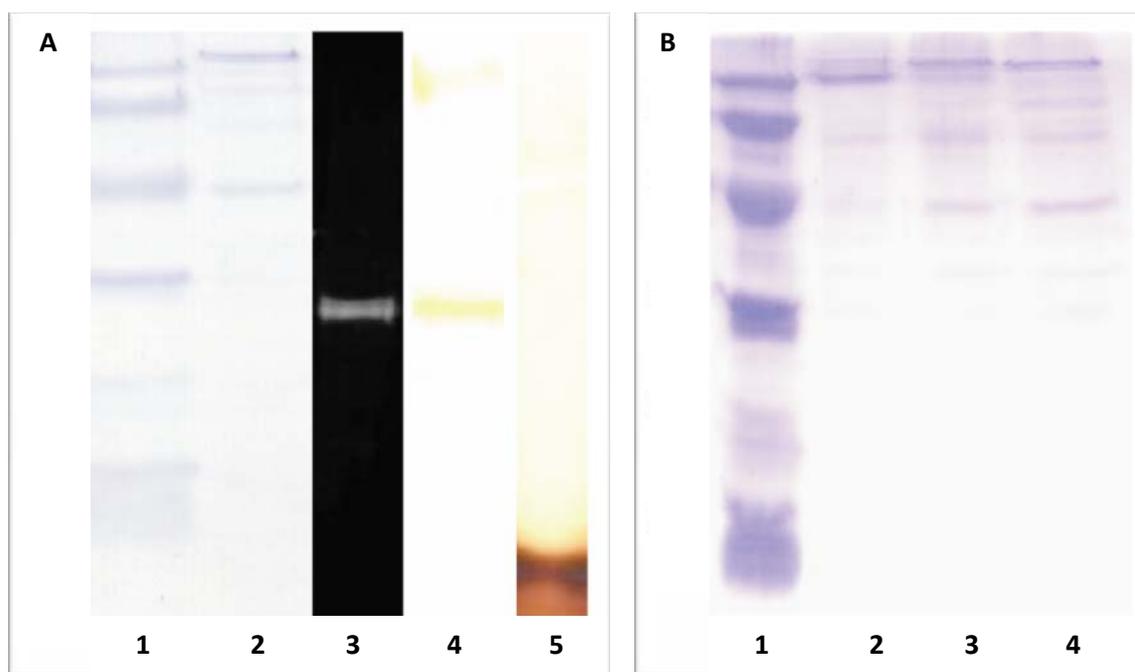


Figura II-11. Caracterización molecular en geles de poliacrilamida de la NRm de *S. meliloti* 2011. A) Gel desnaturante: 1) Marcadores (fosforilasa b, 97 kDa; albúmina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; inhibidor de tripsina, 22,1 kDa y α -lactalbúmina, 14,4 kDa) y 2) NRm de *S. meliloti* 2011. Gel nativo: 3) Actividad NR en gel, 4) ensayo de detección de hemo en gel y 5) control de detección de hemo, Hemo c aislado de *S. meliloti* 2011. B) Estudio de composición de subunidades en diferentes condiciones de tratamiento: 1) Marcadores, 2) 4 °C *over night*, 3) 30 min 40 °C y 4) 2 min 100 °C.

En geles desnaturantes se observaron dos subunidades con tamaños de 118 y 45 kDa, respectivamente (Figura II-11A, calle 2). Los valores de masa molecular

relativa fueron obtenidos en base a la curva de calibrado obtenida para los marcadores de bajo peso molecular. De acuerdo con los resultados descritos para las NaRs purificadas de *E. coli* (MacGregor, 1975; Chaudry y MacGregor, 1983), *Pa. pantotrophus* (Ballard y Ferguson, 1988), *Ps. aeruginosa* (Carlson y col., 1982) y *Ps. stutzeri* (Blümle y Zumft, 1991) estas bandas fueron atribuidas a NarG y NarH, respectivamente.

Como el análisis de nitrato reductasas de membrana es dificultoso en cuanto a la determinación de composición de subunidades en geles desnaturizantes por agregado de la subunidad pequeña (NarI) (Chaudhry y MacGregor, 1983; Craske y Ferguson, 1986; Correia y col., 2008), se realizaron diversos tratamientos previos al análisis en geles en condiciones desnaturizantes: desnaturizante 4 °C, desnaturizante a 40 °C 30 min y desnaturizante a 100 °C 2 min. En ningún caso se pudo observar la banda correspondiente a NarI (ver Figura II-11B, calles 2,3 y 4), por lo que el complejo aislado de *S. meliloti* 2011, sólo cuenta con dos subunidades. Luego del tratamiento en condiciones desnaturizantes no se observó banda de actividad NR alguna en los geles, como era de esperarse, debido a la pérdida del cofactor responsable de la catálisis.

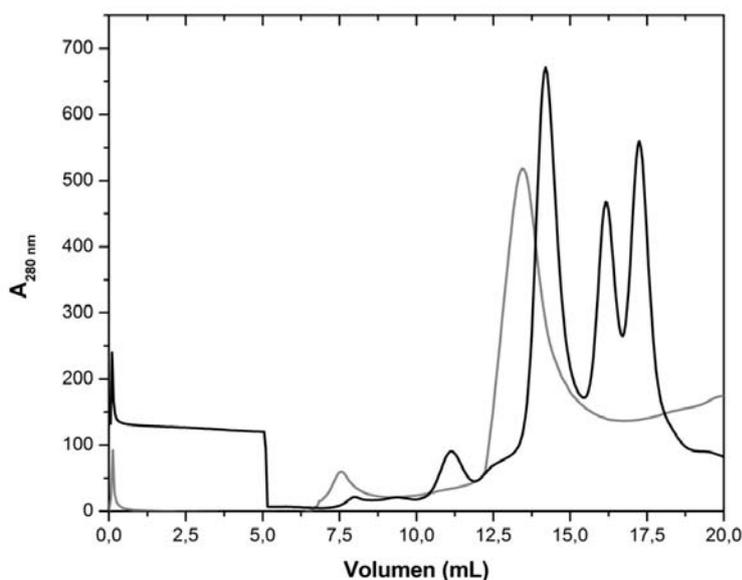


Figura II-12. Determinación del tamaño molecular de NRm de *S. meliloti* 2011 mediante filtración por geles. En negro los estándares de calibrado: ferritina (440 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa), y en gris la muestra de NRm de *S. meliloti* 2011.

La determinación del tamaño molecular mediante filtración por geles permitió observar un pico a los 125 kDa (Figura II-12), sugiriendo una relación estequiométrica de 1:1, considerando los errores inherentes a cada técnica. El gel nativo también evidenció la banda proteica y de actividad cercana al marcador de aldehído oxidoreductasa de *D. gigas* (194 kDa) lo cual sugiere una composición de subunidades 1:1.

II.3.5 Caracterización UV-vis de la NRm aislada.

La fracción de NRm de *S. meliloti* 2011 pura presentó un color marrón dorado. El espectro de la enzima pura nativa (Figura II-13) exhibe las bandas características de dos grupos prostéticos: una banda ancha, 400-500 nm típica de los centros FeS (Lippard y Berg, 1994) y la banda de Soret característica de los grupos hemo a 407 nm (Nelson y Cox, 2005). Este espectro es similar al reportado para otras NaRs (Blümle y Zumft, 1991) y la razón de pureza (A_{280}/A_{410}) es de 7.4 y está en el orden de lo reportado para otras NaRs (Ballard y Ferguson, 1988; Blümle y Zumft, 1991; Correia y col., 2008). La adición de ditionito de sodio reduce ambos componentes: la banda ancha de los centros FeS decrece y la banda de Soret se traslada hacia longitudes de onda mayores.

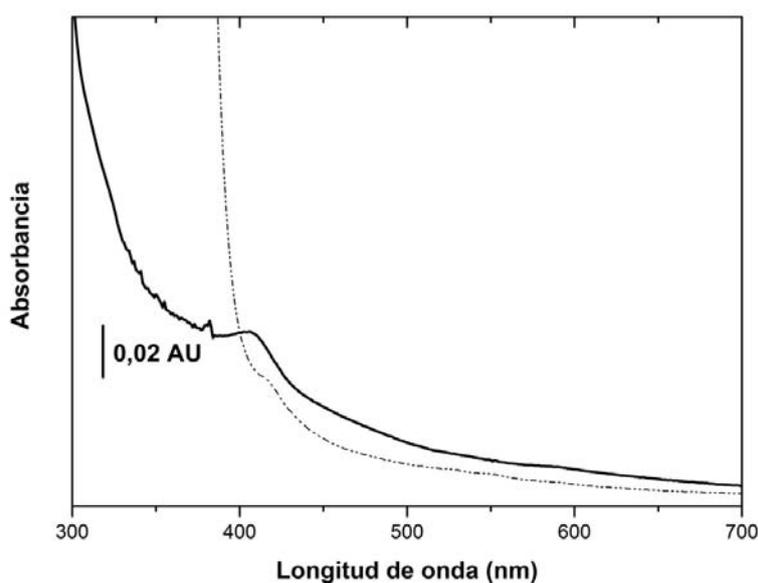


Figura II-13. Espectro UV-visible de NRm de *S. meliloti* 2011. Forma nativa (línea gruesa) y forma reducida con ditionito (línea punteada). El espectro se registró en *buffer* 10 mM Tris-HCl (pH: 7.6) plus 0.05 % v/v Triton X-100.

No se observaron bandas adicionales correspondientes a los grupos hemo *c* (525 y 552 nm) (Smith, 1978) como así también a la de los grupos hemo *b* (Chaudhry y McGregor, 1983) (Figura II-13).

II.3.6 Análisis de cofactores y contenido metálico de la NRm aislada.

El análisis de metales permitió detectar Mo y Fe en una relación 1:20. Las proporciones de moles de Mo y Fe referidos al mol de proteína fueron de $0,4 \pm 0,1$ y 9 ± 1 , respectivamente.

Para evaluar la dependencia de Mo por parte de la NRm de *S. meliloti* 2011, se desarrollaron dos experimentos: uno sobre cultivo activo de *S. meliloti* 2011 como se indicó más arriba (Tabla II-2) y otro sobre muestras de la enzima aislada. Como se indicó con anterioridad, los efectos inhibitorios ocurren a concentraciones submilimolares, pero niveles de 1-10 mM WO_4^{2-} son necesarios para un máximo de inhibición (Enoch y Lester, 1972). Efectivamente, la NRm aislada de *S. meliloti* 2011 se inhibió por tungstato. Las muestras en 0,5 mM WO_4^{2-} mostraron un nivel de actividad del 44 ± 7 %, mientras que aquella tratada con 5 mM WO_4^{2-} desarrolló un $8,9 \pm 0,9$ %. Estos resultados sugieren la dependencia de Mo en la NRm de *S. meliloti* 2011.

En la Figura II-14 puede observarse el análisis de pterinas de la NRm aislada de *S. meliloti* 2011.

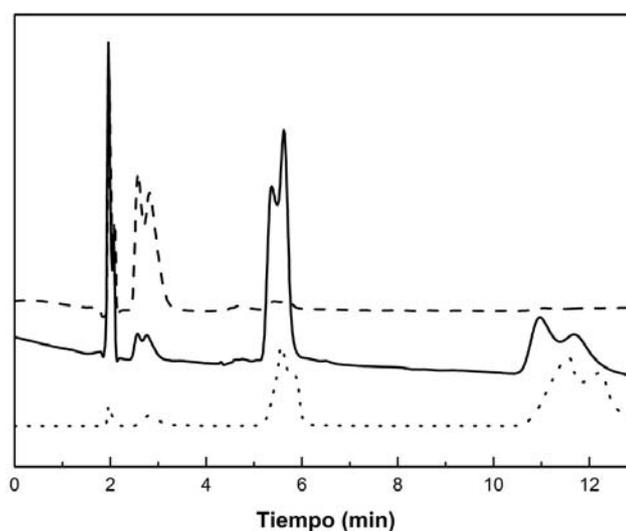


Figura II-14. Análisis de pterinas de NRm de *S. meliloti* 2011. Forma nativa (línea gruesa). Patrones: CMP (línea discontinua) y GMP (línea punteada).

El análisis del componente pterina permitió determinar la presencia de GMP (Figura II-14) como nucleótido constituyente en una proporción de 1,6 mol de molibdopterina guanina dinucleótido (MGD) por mol de proteína.

El espectro UV-vis muestra bandas de absorción característicos de cofactores de Fe (Figura II-13). El ensayo de actividad peroxidasa en geles nativos permite observar bandas positivas de color marrón rojizo a la altura de la banda correspondiente a NRm (Figura II-11A, líneas 4 y 5). En solución, la exposición de o-dianisidina a NRm y H₂O₂, mostró un comportamiento similar al observado para la reacción del citocromo *c* con o-dianisidina en presencia de H₂O₂. En geles desnaturizantes no se observó banda de actividad peroxidasa lo que sugiere la presencia de grupos hemo *b*, los cuales no están unidos a la estructura proteica y suelen perderse a lo largo de los pasos de purificación (Chaudhry y McGregor, 1983; Craske y Ferguson, 1986).

II.3.7 Caracterización cinética de la NR de membrana aislada.

Los datos cinéticos fueron analizados teniendo en cuenta el modelo de Michaelis-Menten (Ecuación II-3.1) donde v es la velocidad, V es la velocidad máxima, $[S]$ es la concentración de sustrato y K_M la constante de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Ecuación II-3.1}$$

Previamente se realizó un análisis de la linealidad en la respuesta a la concentración de nitrito, al tiempo de incubación y a la cantidad de enzima adicionada para tomar los recaudos pertinentes. El método empleado para la cuantificación de la actividad enzimática es un método colorimétrico discontinuo que mide la cantidad de nitrito generado en un lapso de tiempo de reacción dado (Ida, 1977). Para ello primero se debe evaluar la linealidad del método frente a la concentración de nitritos en las condiciones del ensayo. El rango lineal correspondió a concentraciones 0-250 μM de nitrito.

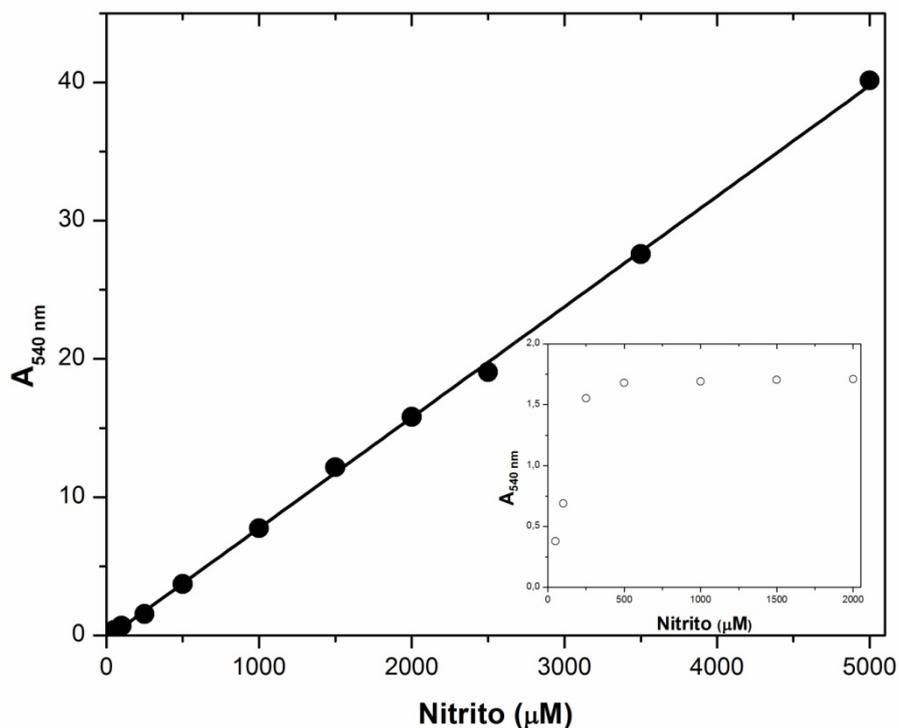


Figura II-15. Estudio de la linealidad de la detección del nitrito generado en la reacción. El método se basa en la detección del nitrito generado mediante una reacción de diazotación que genera un compuesto de color fucsia (Ida, 1977). En círculos vacíos puede observarse que la respuesta es lineal hasta cierta concentración de nitrito generado (*inset*). La linealidad se conserva hasta los 250 μM de nitrito. En círculos llenos la respuesta efectuando las diluciones pertinentes y los recálculos en zonas donde hay desviaciones de la ley de Beer.

Como puede observarse en la figura II-16A la respuesta fue lineal en el rango de enzima ensayado (0,14-0,81 μg de proteína), incubando la mezcla de reacción 10 min a 30 $^{\circ}\text{C}$. Para evaluar la linealidad frente al tiempo, la mezcla de reacción se incubó 5, 10, 15, 20 y 30 min a 30 $^{\circ}\text{C}$ con una concentración de enzima de 0,4 μg de proteína (Figura II-16B).

Las propiedades cinéticas de la NRm de *S. meliloti* 2011 se determinaron usando concentraciones de nitrato en el rango de 5-900 μM . Las velocidades iniciales se graficaron vs la concentración respectiva de nitrato y luego se ajustaron a un modelo de Michaelis-Menten utilizando la ecuación II-3.1. Cada punto se realizó por triplicado.

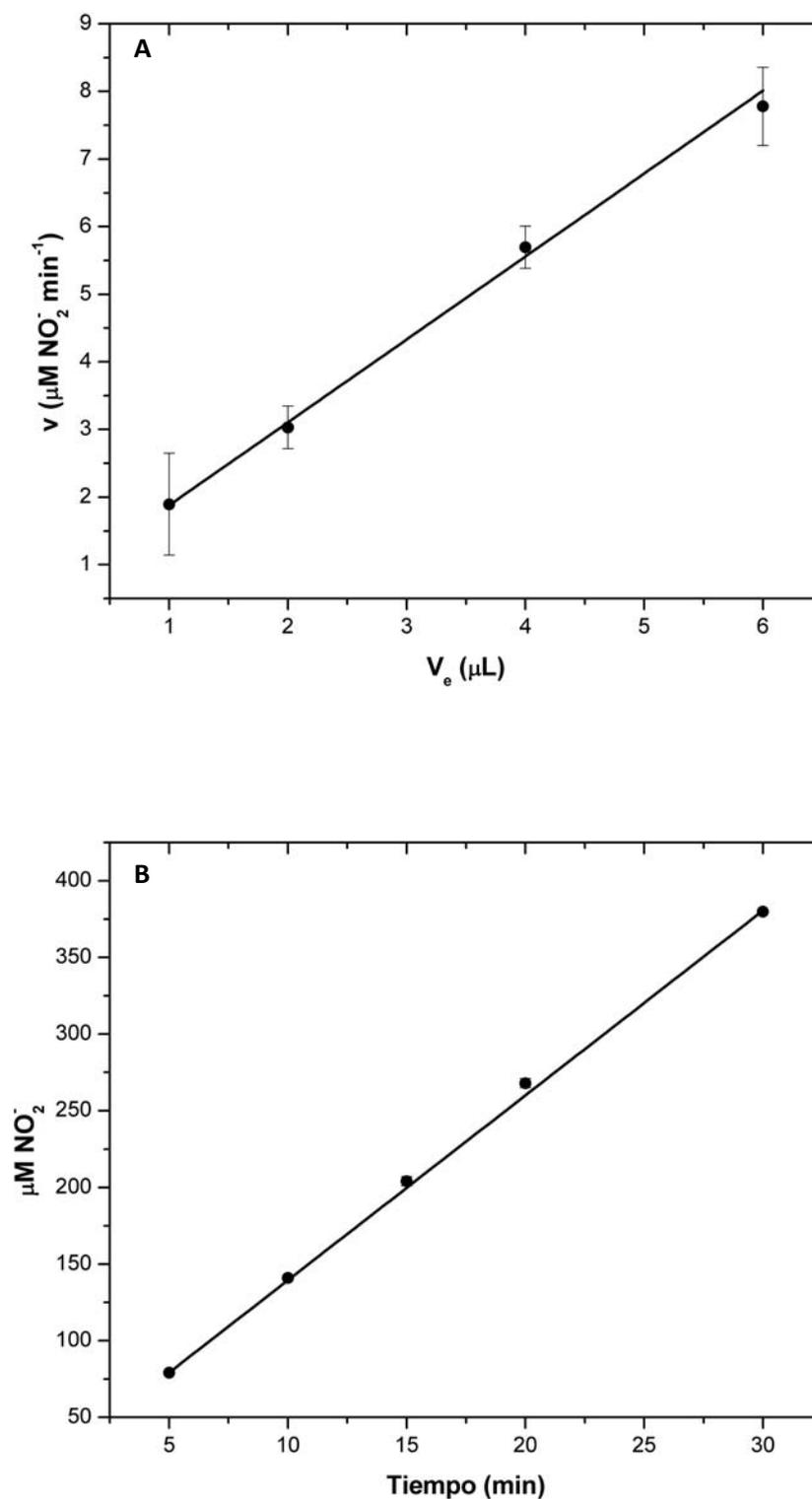


Figura II-16. Estudio de la linealidad de la respuesta del dosaje enzimático al tiempo de incubación y a la cantidad de enzima. A) respuesta a la cantidad de enzima agregada en el volumen de reacción. B) respuesta al tiempo de incubación.

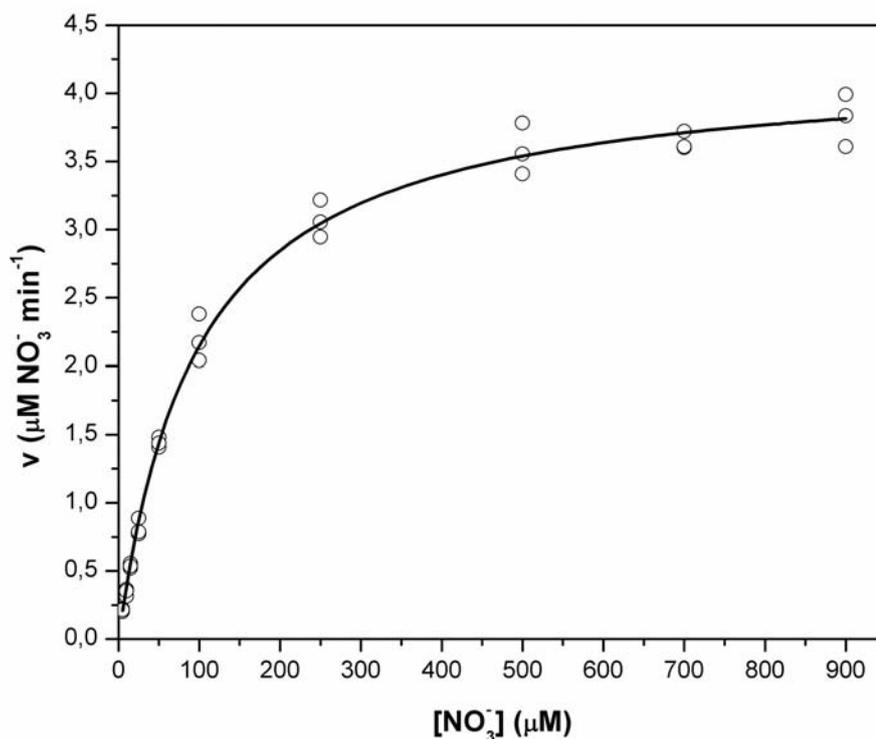


Figura II-17. Caracterización cinética de la NRm aislada de *S. meliloti* 2011. La figura muestra el ajuste a un modelo de Michaelis-Menten. El ajuste al modelo arrojó un $R = 0,994$.

Del ajuste mostrado en la figura II-17 se pueden extraer los siguientes parámetros cinéticos: K_M : $97 \pm 5 \mu\text{M}$ nitrato y V : $4,22 \pm 0,05 \mu\text{M NO}_2^- (\text{formado}) \text{ min}^{-1}$ ($0.2 \mu\text{g}$ proteína en $250 \mu\text{L}$ de volumen de reacción).

II.3.8 Estudios de Inhibición.

Los resultados de los ensayos de inhibición indican claramente que NRm de *S. meliloti* 2011 es inhibida por azida y cianuro como se observa en la figura II-19A. Los $I_{0.5}$ fueron de 25.9 y $550 \mu\text{M}$ para azida y cianuro, respectivamente (Figura II-19A). Estos resultados están en línea con lo observado en otras molibdoenzimas (Berks y col., 1995a; Berks y col., 1995b). La enzima también mostró inhibición por clorato (Figura II-19A), inhibición característica de las NRs respiratorias (Rusmana y Nedwell, 2004).

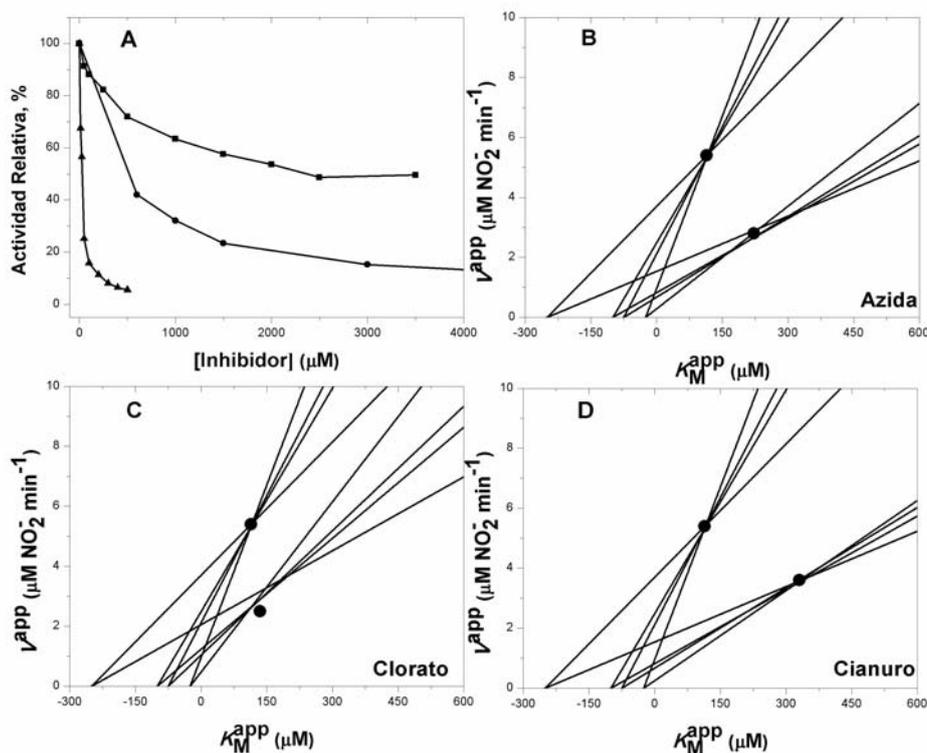


Figura II-18. Ensayos de inhibición en NR de membrana aislada de *S. meliloti* 2011. A) Inhibición a diferentes concentraciones de inhibidor (% de actividad remanente vs [I]: (■) clorato de sodio, (▲) azida sódica, y (●) cianuro de potasio. Gráficos *DLP*: el ramillete superior de curvas corresponde al control y el inferior a las muestras inhibidas. B) 0.5 μM azida sódica. C) 0.5 mM clorato de sodio. D) 25 μM cianuro de potasio.

Las figuras II-18B, II-18C and II-18D muestran los gráficos obtenidos mediante *DLP* (*Direct Linear Plot*) (Eisenthal y Cornish-Bowden, 1974; Cornish-Bowden y Eisenthal, 1974) de la inhibición con azida (0,5 μM), clorato (0,5 mM) y cianuro (25 μM), respectivamente. En los tres gráficos puede observarse una inhibición del tipo mixto del que pueden extraerse los valores de las constantes de inhibición competitiva (K_{IC}) y la constante de inhibición acompetitiva (K_{IU}). Para ello se pueden emplear las siguientes ecuaciones.

$$V = v + \frac{v}{[S]} K_M \quad \text{Ecuación II-3.2}$$

$$V^{app} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{IU}}} \quad \text{Ecuación II-3.3}$$

$$K_M^{app} = \frac{K_M(1 + K_{ic})}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \quad \text{Ecuación II-3.4}$$

$$\frac{V^{app}}{K_M^{app}} = \frac{\frac{V}{K_M}}{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}} \quad \text{Ecuación II-3.5}$$

donde V^{app} y K_M^{app} son los valores aparentes de V y K_M , $[I]$ es la concentración de inhibidor, K_{ic} y K_{iu} son las constantes de inhibición competitiva y acompetitiva, respectivamente. El procedimiento para evaluar las constantes cinéticas (K_{ic} y K_{iu}) puede resumirse como sigue. Los valores de V^{app} y K_M^{app} fueron obtenidos por los puntos de intersección de *DLP*. Luego, estos fueron utilizados para estimar la relación

de constantes $\frac{V^{app}}{K_M^{app}}$ y así K_{ic} se calculó a partir de la ecuación II-3.5. La K_{iu} se estimó mediante las ecuaciones II-3.3 y II-3.4. Los valores se encuentran reportados en la Tabla II-3.1. Estos valores representan la mediana y el intervalo con una confianza del 95 % (Eisenthal y Cornish-Bowden, 1974; Cornish-Bowden y Eisenthal, 1974). Se estimó la mediana en lugar de la media porque las intersecciones en *DLP* no se cruzan exactamente en el mismo punto debido a los errores experimentales.

	K_{ic} (μM)	Intervalo de confianza (95%)	K_{iu} (μM)	Intervalo de confianza (95%)
Azida	0.18	0.15-0.20	0.04	0.03-0.05
Cianuro	22.3	21.7-25.8	153.1	69.9-237.5
Clorato	360	310-470	440	360-740

Tabla II-3. Constantes de inhibición obtenidas de las gráficas de Cornish-Bowden (*DLP*).

II.3.9 Producción y purificación de la NR-NiR citoplasmática de *S. meliloti* 2011.

En este trabajo hemos podido también extraer una NR citoplasmática con actividad dual NR-NiR a partir de *S. meliloti* 2011. Luego del proceso de subfraccionamiento de los esferoplastos disruptos por sonicado mediante ultracentrifugación, se logró obtener un extracto crudo de color marrón rojizo con actividad dual NR-NiR (Figura II-19). El extracto enriquecido en actividad fue cambiando del rojo, al naranja y finalmente se obtuvo una fracción NR-NiR activa de color dorado claro. Las dos actividades copurificaron a lo largo de los pasos

cromatográficos. Se utilizaron dos pasos de intercambio aniónico y uno de tamiz molecular y un proceso final de electroelusión de las bandas de actividad.

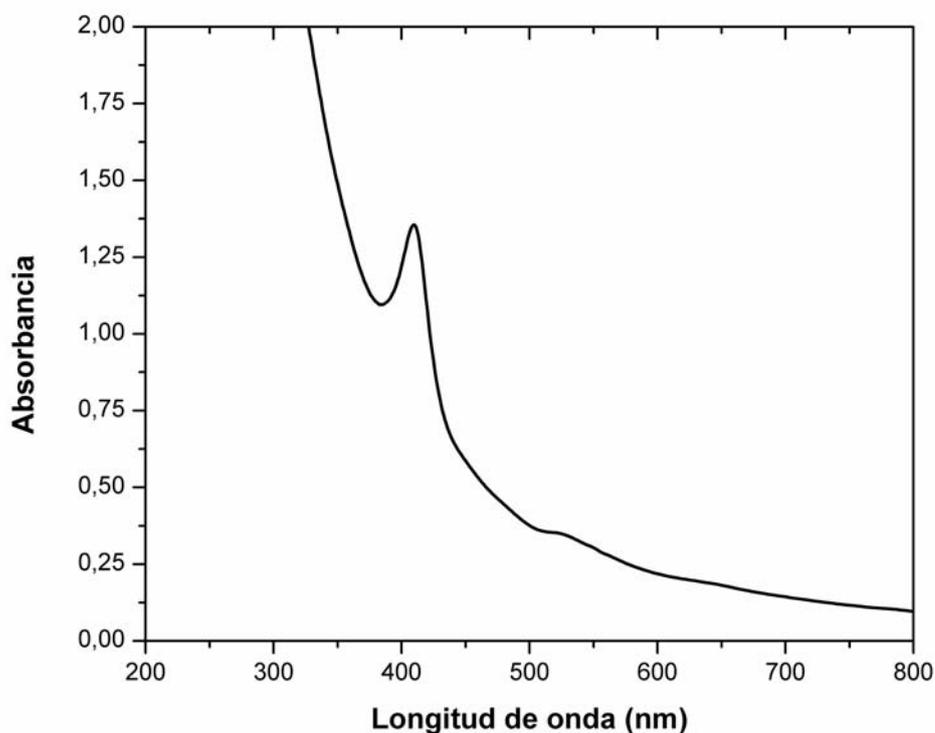


Figura II-19. Espectro UV-vis del extracto crudo citoplasmático *S. meliloti* 2011. Puede observarse la banda típica de los citocromos *c* ($\alpha \sim 550$ nm). De este modo los citocromos constituyen la principal de las impurezas detectable a nivel espectroscópico.

El extracto crudo mostró una actividad enzimática específica de $169 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (NR) y $35 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (NiR). Finalmente, luego de la electroelusión se logró obtener una muestra que desarrolló una actividad enzimática específica de $1816 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (NR) y $1367 \text{ nmol NO}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (NiR).

Por otro lado a lo largo de la purificación se lograron aislar otras proteínas de interés como mediadores fisiológicos de este tipo de enzimas, citocromos, flavodoxinas y ferredoxinas (Figura II-20).

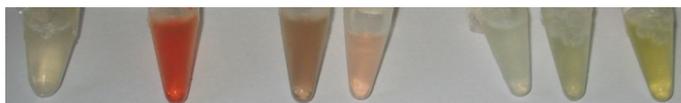


Figura II-20. Distintas fracciones obtenidas a lo largo del proceso de purificación de las actividades NR-NiR. Las fracciones de colores rojos, pardos y rosados corresponden a muestras con citocromos. Las muestras doradas-amarillentas, a muestras con actividad NR-NiR.

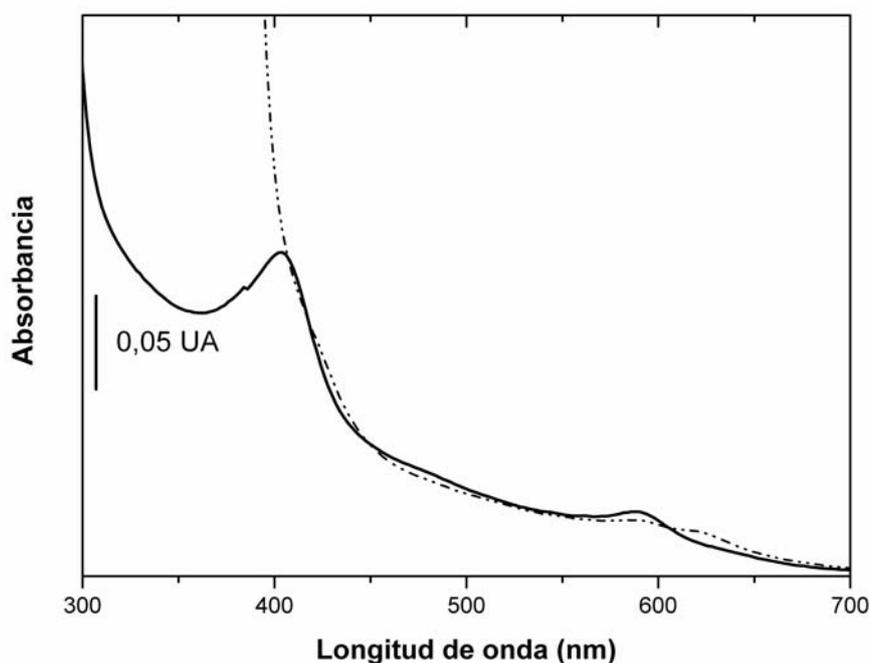


Figura II-21. Espectro UV-visible de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. Forma nativa (línea gruesa) y forma reducida con ditionito (línea punteada). El espectro se registró en *buffer* 10 mM Tris-HCl (pH: 7,6).

II.3.10 Caracterización UV-Vis de la NR-NiR aislada.

La fracción de NR-NiR citoplasmática de *S. meliloti* 2011 pura presentó un color dorado claro. El espectro de la enzima pura nativa (Figura II-21) exhibe las bandas características de dos grupos prostéticos: una banda ancha, 400-500 nm típica de los centros FeS y la banda de Soret característica de los grupos hemo a 407 nm. Además aparece una banda a los 590 nm que podría deberse a un sirohemo cuya actividad se relaciona con nitrito y sulfito reductasas (Murphy y col., 1974). No se observan las bandas de transición $S_{Cys} \rightarrow Cu$ de Cu-NiRs (454-463 nm) (Solomon y col., 1992). La adición de ditionito de sodio reduce los tres componentes espectrales principales: la banda ancha de los centros FeS decrece y la banda de Soret se traslada hacia longitudes de onda mayores. En las muestras reducidas no se observan las bandas características de las NiRs cuyo cofactor es el citocromo cd_1 (418, 460, 521, 547, 554 y 625-655 nm) (Zumft, 1997). La banda de absorción a 593 nm se desdobra en dos hombros a 592 y 622 nm.

II.3.11 Propiedades moleculares de la NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011.

La muestra electroeluída se observó como una única banda en gel nativo al 8%, tanto en geles nativos de tinción con *Coomasie Blue* como en geles de tinción específica para actividad NR (Figura II-22, calles 4 y 5). En geles desnaturizantes se observaron dos subunidades con tamaños de 52 y 37 kDa, respectivamente (Figura II-22, calle 2).

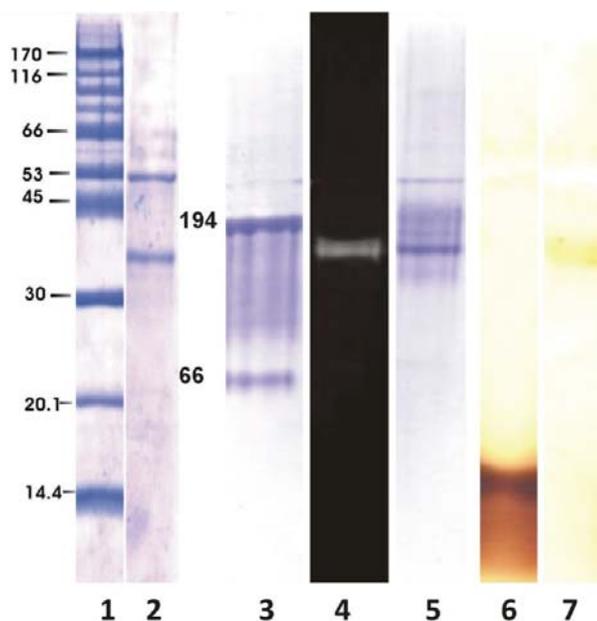


Figura II-22. Caracterización de la NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011 en gel de poliacrilamida. Gel desnaturizante: 1) Marcadores, 2) NR-NiR de *S. meliloti* 2011. Gel nativo: 3) Marcadores, 4) actividad NR-NiR en gel, 5) NR-NiR electroeluída, 6) control de detección de hemo, citocromo c aislado de *S. meliloti* 2011 y 7) ensayo de detección de hemo en gel en NR-NiR.

II.3.12 Caracterización cinética de la NR-NiR de *S. meliloti* 2011 aislada.

La enzima aislada del extracto citoplasmático presentó actividad dual NR-NiR lo que rara vez se da en la naturaleza. Sólo existe el reporte de actividad dual en una enzima de naturaleza hémica aislada de una bacteria extremófila (Martínez-Murillo y col., 1994). Las figuras II-23 y II-24 muestran los ajustes a un modelo de Michaelis-Menten de las actividades NR y NiR. Los valores de K_M obtenidos, $127 \pm 8 \mu\text{M}$ (nitrato) y $1,2 \pm 0,1 \text{ mM}$ (nitrito), denotan una mayor afinidad por el nitrato. Si se compara la afinidad de esta enzima por el nitrato es muy próximo al que mostró la NRm de *S. meliloti* 2011.

La presencia de bandas de absorción características de los sirohemos en el espectro UV-Vis de NR-NiR de *S. meliloti* 2011 hacía suponer posibilidad de actividad

sulfito reductasa. Como se muestra en la figura II-25 la actividad sulfito reductasa no se manifiesta; sólo puede observarse la actividad NiR en ensayos de actividad continuos (ver ensayos cinéticos en II-2) en condiciones anaeróbicas.

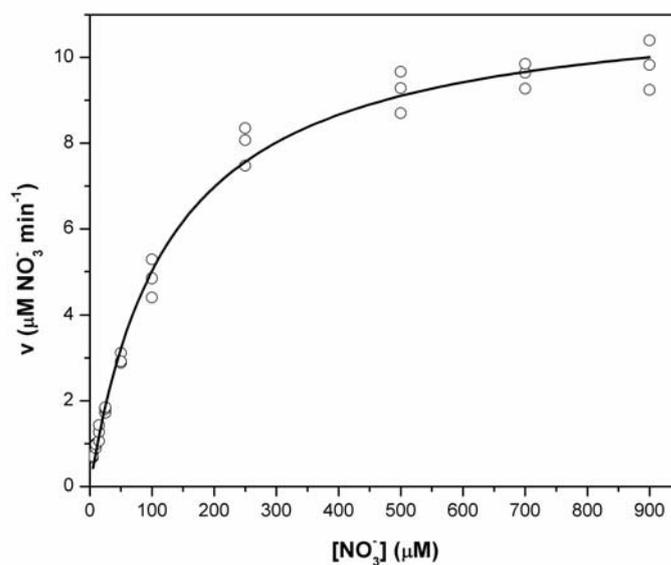


Figura II-23. Caracterización cinética de la NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011: actividad NR. La figura muestra el ajuste a un modelo de Michaelis-Menten. El ajuste al modelo arrojó un $R = 0,991$ y los parámetros obtenidos fueron: $K_M = 127 \pm 8 \mu\text{M NO}_3^-$ y $V = 11,7 \pm 0,2 \mu\text{M NO}_3^- \text{ min}^{-1}$.

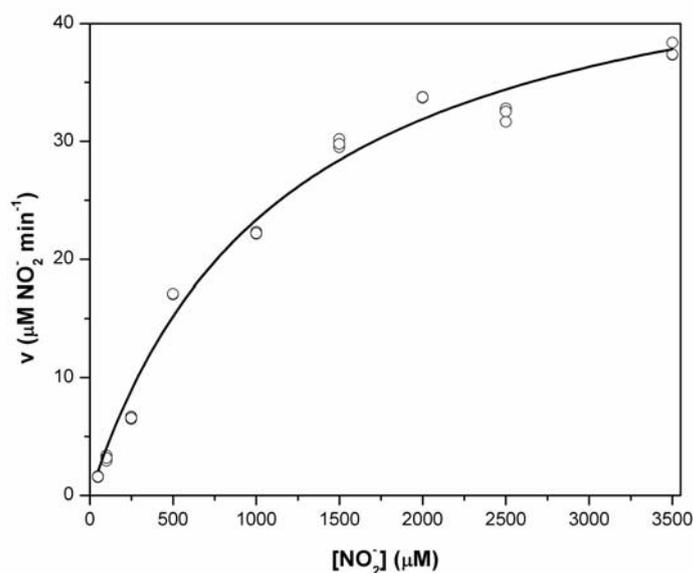


Figura II-24. Caracterización cinética de la NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011: actividad NiR. La figura muestra el ajuste a un modelo de Michaelis-Menten. El ajuste al modelo arrojó un $R = 0,986$ y los parámetros obtenidos fueron: $K_M = 1,2 \pm 0,1 \text{ mM NO}_2^-$ y $V = 50 \pm 2 \mu\text{M NO}_2^- \text{ min}^{-1}$.

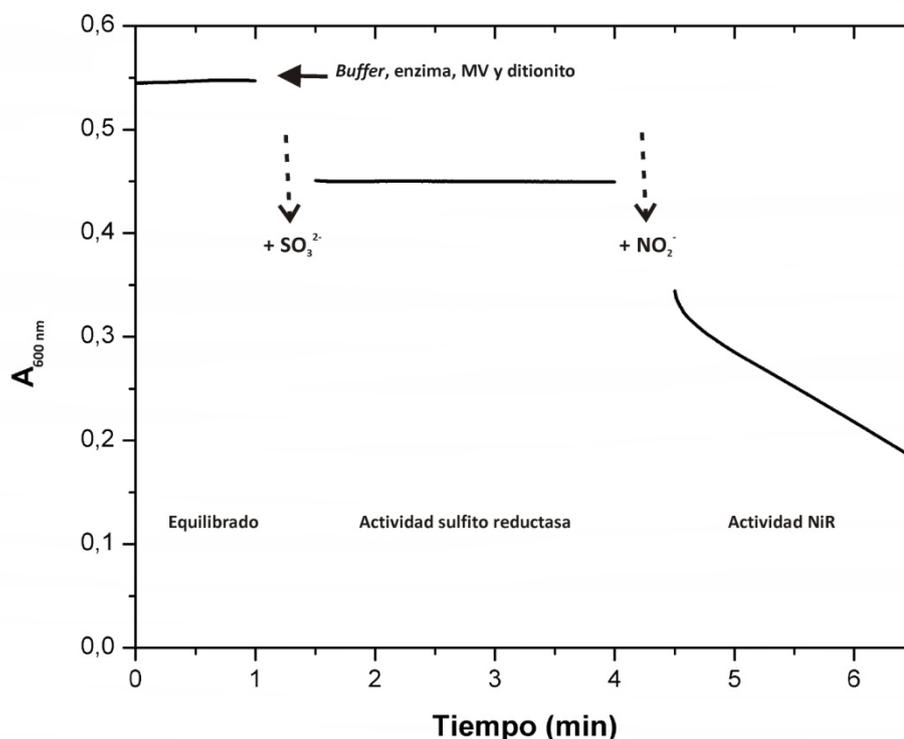


Figura II-25. Caracterización cinética de la NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011: evaluación de la actividad sulfito reductasa. El ensayo se realizó en cubeta de cuarzo en espectrofotómetro siguiendo la oxidación de MV a 600 nm, el cual cambia de azul a incoloro. El ensayo se realizó en anaerobiosis en celda UV-vis con cierre hermético, utilizando todos los reactivos y soluciones desaireadas 30 min con argón. Las flechas con líneas punteadas indican el agregado de sulfito y nitrito y delimitan las etapas de equilibrado, actividad sulfito reductasa y actividad NiR.

Como muestra la figura II-25 el ensayo para la detección de la actividad sulfito reductasa resultó negativo. En una celda anaeróbica con los componentes agregados y listos para reacción, la adición de sulfito no condujo a oxidación alguna de MV (no se observa decaimiento de la absorbancia a 600 nm). Cuando a la misma mezcla se le adicionó de nitrito el MV comenzó a oxidarse, tal cual se observa en la figura. Esto demuestra que la enzima tiene actividad NiR pero no sulfito reductasa.

II.3.9 Estudios de Inhibición.

Al igual que para la NRm de *S. meliloti* 2011, se ensayaron inhibiciones con tungstato de sodio, azida sódica, cianuro de potasio, clorato de sodio y cloruro de amonio sobre la actividad NR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011.

El tungstato tuvo el mismo efecto sobre la actividad NR citoplasmática que sobre la actividad NRm aislada de *S. meliloti* 2011. Las muestras en 0,5 mM WO_4^{2-} mostraron un nivel de actividad del 43 ± 2 %, mientras que aquellas tratadas con 5 mM WO_4^{2-} desarrollaron un 10 ± 1 %. Estos resultados sugieren la dependencia de Mo en la actividad NR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011.

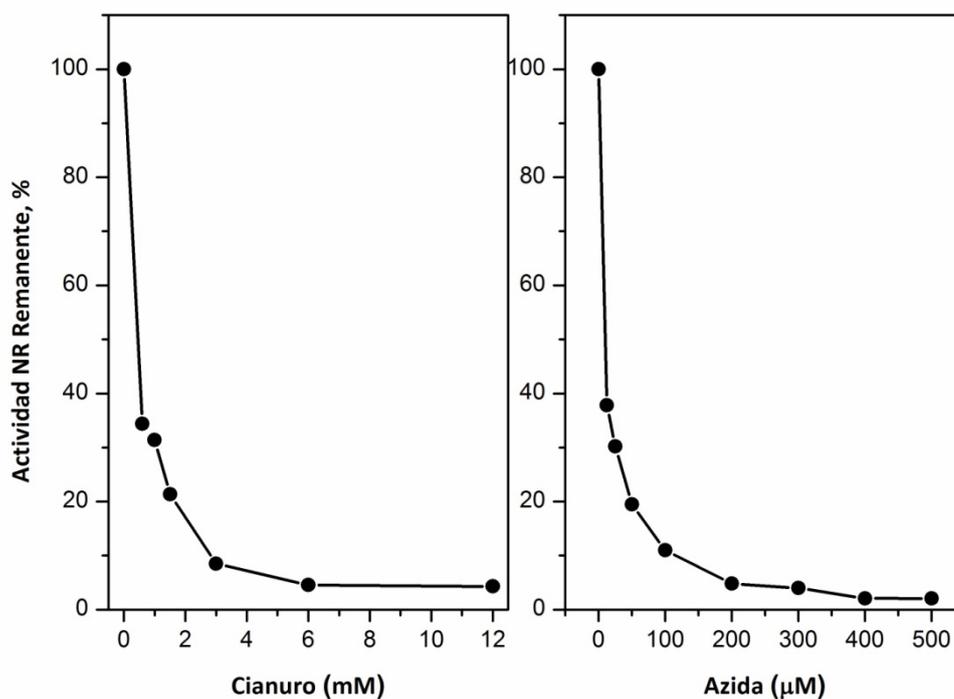


Figura II-26. Estudios de inhibición con cianuro y azida sobre la actividad NR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. La figura muestra gráficos de actividad remanente porcentual respecto de un control, al someter la enzima a distintas concentraciones de inhibidor y evaluar su actividad.

El cianuro de potasio y la azida sódica resultaron inhibidores de la actividad NR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. De la figura II-26 puede extraerse que el 50 % de inhibición se logra con 0,55 mM de cianuro y 9,5 µM de azida, lo que denota una sensibilidad a estos agentes similar a la observada en NRm de *S. meliloti* 2011.

El amonio no tienen efecto apreciable sobre la actividad NR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. Concentraciones de 2,5 mM cloruro de amonio derivan en una actividad remanente porcentual del 97 ± 2 %, comparado con el control.

El clorato de sodio por su parte tiene un efecto mínimo sobre la actividad de esta enzima, así muestras tratadas con 1 mM clorato de sodio desarrollan una actividad del 79 ± 3 % respecto del control.

La actividad NiR, dependiendo si es una enzima de vías asimilativas o de metabolismo desnitrificante y del tipo de cofactor que lleva a cabo la actividad, puede verse afectada por diferentes agentes (Schomburg y Schomburg, 2004). La actividad NiR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011 se evaluó frente a agentes como cloruro de amonio, azida sódica, cianuro de potasio y dietilditiocarbamato de sodio. La tabla II-4 muestra los valores de actividad remanente porcentual desarrollados en las muestras inhibidas, respecto del control.

Agente inhibidor	Actividad NiR remanente (%)
0,5 mM NaN ₃	92 ± 10
50 μM KCN	0
10 mM NH ₄ Cl	99 ± 2
1 mM Dietilditiocarbamato	8 ± 4

Tabla II-4. Evaluación de inhibidores sobre la actividad NiR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. Se reportan los niveles de actividad enzimática remanente porcentual luego de la inhibición respecto de un control.

La tabla II-4, muestra inhibición en el caso del cianuro, el cual a una concentración 50 μM inhibe completamente la actividad NiR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011. El dietilditiocarbamato también tiene un efecto notorio en la actividad NiR. Tanto el cloruro de amonio como la azida sódica parecen no tener efecto sobre la actividad NiR.

II.4 Discusión

II.4.1 Inducción y producción de NRs en *S. meliloti* 2011.

Los sistemas de desnitrificación y respiración de nitratos en microorganismos suelen estar inhibidos por O_2 y estimulados por nitratos y nitritos, aunque pueden encontrarse resultados controversiales en la literatura. Körner y Zumft postularon que las enzimas de vías desnitrificantes no estaban uniformemente reguladas por factores tales como O_2 y sales nitrogenadas (Körner y Zumft, 1989). O'Hara y colaboradores propusieron que la velocidad de desnitrificación era independiente de la presencia de nitratos pero era inducida por los bajos niveles de O_2 en *B. japonicum* (O'Hara y Daniel, 1983; O'Hara y Daniel, 1984). Varinhos y colaboradores encontraron que la incorporación de nitratos rinde mayores velocidades de desnitrificación en *B. japonicum* (Varinhos y col., 1989). Un trabajo reciente de Polcyn y colaboradores demostró que el óptimo del metabolismo desnitrificante en *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* es inducido por el crecimiento anaeróbico en presencia de nitrato y nitrito (2 mM cada uno) y que la adición de nitrato como única fuente rinde un nivel menor de actividad desnitrificante (Polcyn y Luciński, 2003).

Solo algunos pocos trabajos reportan la actividad desnitrificante en *S. meliloti* y qué factores son los que la regulan. García-Plazaola y colaboradores encontraron que la vía desnitrificante no dependía solo de los bajos niveles de O_2 sino que también de la presencia de nitratos en los medios donde se cultivaron trece cepas de *S. meliloti* (García-Plazaola y col., 1993). En un trabajo reciente, Becker y colaboradores mostraron que los genes involucrados en la vía (reducción completa de nitrato a N_2) eran inducidos en condiciones microóxicas en *S. meliloti* usando estudios de micro y macro arreglos (Becker y col., 2004). Resultados similares pudimos encontrar en nuestro trabajo: la adición de nitrato y nitrito al medio de cultivo y el crecimiento en microaerobiosis son indispensables para lograr una buena producción de NRs de vías desnitrificantes en *S. meliloti* 2011.

La adición de N oxianiones en cultivos de *S. meliloti* 2011 con bajos niveles de oxígeno incrementó la actividad NR, obteniéndose el máximo nivel cuando ambas sales, nitrato y nitrito, fueron adicionadas. Este efecto también se observó en *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* y fue asociado con la estimulación del transporte de

nitratos por nitrito (Polcyn y Luciński, 2003; Moir y Wood, 2001; Polcyn y Luciński, 2009). En condiciones aeróbicas, la adición de nitrato incrementa la actividad NR, como fue observado en *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (Polcyn y Luciński, 2003; Polcyn y Luciński, 2009). Por el contrario, la adición de nitrito la disminuyó; la adición simultánea de ambas sales no se tradujo en cambios significativos de actividad NR respecto del control. No hay antecedentes reportados para la influencia del nitrito en la producción de NRs en condiciones aeróbicas en rizobacterias, indicando una inhibición de la producción de las mismas. Además se observa que la reducción de nitrato estuvo acompañada por un incremento en el pH (hasta 8-9) y la producción de amonio. En concordancia con reportes previos de la purificación de una NR asimilativa soluble de *S. meliloti* 2011, obtenida en condiciones aeróbicas (Sekiguchi y Maruyama, 1988), nuestros resultados sugieren que la actividad NR desarrollada en condiciones aeróbicas se asocia a procesos de amonificación/asimilación. El hecho de que la producción de NRs en condiciones aeróbicas esté asociada a enzimas asimilatorias, indica que los mayores niveles de NRs obtenidos en condiciones microaeróbicas son de características desnitrificantes.

En resumen, nuestros resultados muestran que la vía metabólica desnitrificante y/o respiratoria de nitratos en *S. meliloti* 2011 es reprimida por oxígeno y activada por nitrato y nitrito. Por lo tanto, como se observó en otras rizobacterias (Varinhos y col., 1989; García-Plazaola y col., 1993) y en organismos desnitrificantes en general (Körner y Zumft, 1989; Zumft, 1997; Polcyn y Luciński, 2003), los bajos niveles de oxígeno junto con la presencia de nitrato son necesarios para la activación de la vía desnitrificante. La única excepción a esta regla se encontró en una cepa de *Rhizobium* (O'Hara y Daniel, 1983), en la cual la inducción se da por bajos niveles de oxígeno pero la presencia de nitratos no es esencial. Un hallazgo importante de nuestro trabajo en este aspecto es el reporte del efecto sinérgico que tiene el nitrito con el nitrato en la inducción de NRs en condiciones microaeróbicas en *S. meliloti* 2011, hecho que también pudo observarse en *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) crecido en condiciones anaeróbicas (Polcyn y Luciński 2003).

II.4.2 NRm aislada de *S. meliloti* 2011.

Solo dos tipos de NRs son las que intervienen en vías desnitrificantes: las periplasmáticas o Nap y las respiratorias o Nar (Zumft, 1997; Moreno-Vivián, y col., 1999; Blasco y col., 2001; González y col., 2006). Dentro de las últimas están las NRs de membrana. Las NRs de membrana están asociadas con los procesos de respiración anaeróbica de nitratos y desnitrificación (Berks y col., 1995c; Zumft, 1997; Moreno-Vivián, y col., 1999; Richardson y Sawers, 2002; González y col., 2006) y si bien los estudios genéticos y bioquímicos más exhaustivos se han llevado a cabo en las NRs de membrana aisladas de *E. coli* (Forget y col., 1971; Bertero y col., 2003; Dias y col., 1999; Jormakka y col., 2004) y de *Pa. denitrificans* (Craske y col., 1986; Ballard y Ferguson, 1988), las cuales se conocen con el nombre genérico de NarGHI, también se han aislado de bacterias capaces de respirar nitratos y microorganismos desnitrificantes (Forget y col., 1974; Van'T y col., 1975; Redclife y Nicholas, 1970; Blümle y Zumft, 1991; Fernández-López y col., 1996; Polcyn y Luciński, 2006; Correia y col., 2008). Las NRs de membrana usualmente se extraen con detergentes o tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos permiten aislar las isoformas carentes de la subunidad de anclaje a membrana (NarGH) mientras que la extracción con detergentes permite la recuperación de la estructura completa (NarGHI) (Hettmann y col., 2003; Correia y col., 2008). Se ha reportado la purificación de dos isoformas de NRs de membrana a partir de *B. japonicum* (Fernández-López y col., 1996) y *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (Polcyn y Luciński, 2003) por tratamiento de las membranas con Triton X-100.

En este trabajo se logró la extracción de una NR de membrana producida en *S. meliloti* 2011 crecida en condiciones microaeróbicas en presencia de nitrato y nitrito. Como se enunció en los apartados de materiales y métodos y en el de resultados, la extracción se realizó con Triton X-100 obteniéndose al final del proceso de purificación una especie heterodimérica compuesta por subunidades de 118 y 45 kDa, la cual mediante filtración por geles tiene un tamaño molecular de 125 kDa. También se demostró la presencia de Mo (MGD) y cofactores de Fe en la estructura mediante análisis de metales, análisis de pterinas, detección de grupos hemo y espectrometría UV-vis.

Contenido de subunidades y cofactores				
Especie	α (NarG)	β (NarH)	γ (NarI)	Referencia
<i>S. meliloti</i> 2011	118 kDa Mo-bisMGD	45 kDa Centros FeS Hemo <i>b</i>	No observada	Este trabajo
<i>B. japonicum</i>	116 kDa Mo	68, 56 y 59 kDa	No observada	(Fernández-López y col., 1999)
<i>Bradyrhizobium sp.</i> (<i>Lupinus</i>)	126 kDa	65 kDa	26 kDa	(Polcyn y Luciński, 2006)
<i>Ps. Náutica</i> 617	136 kDa Mo/MGD= 1.6	65 kDa 1 × [3Fe-4S] 3 × [4Fe-4S]	16,9 kDa Hemo <i>b</i> y <i>c</i>	(Correia y col., 2008)
<i>E. coli</i>	150 kDa Mo-bisMGD [4Fe-4S]	60 kDa 1 × [3Fe-4S] 3 × [4Fe-4S]	20 kDa 2 × hemo <i>b</i>	(Vincent y Bray, 1978; Chaudhry y McGregor, 1983; Jormakka y col., 2004)
<i>Pa. pantotrophus</i>	127 kDa Mo-bisMGD	61 kDa 1 × [3Fe-4S] 3 × [4Fe-4S]	21 kDa 2 × hemo <i>b</i>	(Craske y Ferguson, 1986; Ballard y Ferguson, 1988)
<i>Ps. stutzeri</i> (<i>NaR$\alpha$$\beta$</i>)	Mo-bisMGD	1 × [3Fe-4S] 3 × [4Fe-4S]	No observada	(Blümle y Zumft, 1991)
<i>Ps. aeruginosa</i>	Mo	1 × [3Fe-4S] 3 × [4Fe-4S]	No observada	(Godfrey y col., 1984)
<i>Ps. fluorescens</i>	118 kDa	62 kDa	No observada	(Philipot y Højberg, 1999)
<i>Ps. isachenhovii</i>	s/metal 130 kDa	67 kDa	No observada	(Antipov y col., 2003)
<i>Geobacter metallireducens</i>	s/Mo	No observada	Hemo <i>c</i>	(Martínez-Murillo y col., 1999)
<i>Haloarcula marismortui</i>	Tetrámero 63 kDa	-	-	(Yoshimatsu y col., 2000)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Mo 0,8 mol/mol compl.	Fe 15,4 mol/mol compl.	-	(Afshar y col., 2001)
<i>Haleroxax volcanii</i>	Heterotrímero 100 kDa	60 kDa	31 kDa Hemo <i>c</i>	(Hochstein y Tomlinson, 1988)

Tabla II-5. Contenido de subunidades y cofactores de las diferentes NaRs.

En la tabla II-5 se puede apreciar en detalle lo que se ha encontrado en la bibliografía en cuanto a estructura y composición de subunidades y de cofactores en NRs de membrana. Como puede observarse, se han reportado tanto formas heterotriméricas como así también heterodiméricas.

En este tipo de proteínas, la subunidad pequeña (γ o NarI) generalmente presenta cofactores hémicos y su detección es dificultosa. Normalmente, la subunidad presenta grupos hemo *b* los cuales suelen perderse a lo largo del proceso de purificación, y se han reportado especies en las que se han encontrado grupos hemo *c* (Martínez-Murillo y col., 1999; Correia y col., 2008). El espectro UV-vis de la NRm de *S. meliloti* 2011 presentó características espectrales de este tipo de cofactores. La banda a 407 nm es más débil que lo esperado para proteínas hémicas lo que sugiere dos posibilidades. La primera de ellas implica que la banda espectral puede deberse a una proteína hémica que copurifica con la proteína de interés. La segunda, que el cofactor hémico de la NR de membrana de *S. meliloti* 2011 se pierde durante el proceso de purificación. El hecho de que en geles para actividad peroxidasa se observe una única banda positiva a la altura de la banda de actividad NR, confirma que el cofactor hémico está asociado a la proteína en cuestión y de aquí a que la baja intensidad en la banda de Soret puede deberse a una pérdida de cofactor hémico. La enzima aislada desarrolló actividad peroxidasa tanto en geles de poliacrilamida (en condiciones nativas) como en solución al ser expuesta al contacto con *o*-dianisidina y H_2O_2 . En geles desnaturizantes no se observó la actividad peroxidasa, lo que se corresponde con un cofactor hémico del tipo hemo *b*, el cual no se encuentra unido covalentemente a la estructura proteica (Chaudhry y MacGregor, 1983; Craske y Ferguson, 1986).

El almacenamiento de la enzima produce a lo largo del tiempo el agregado de la misma, lo cual puede observarse como otra banda positiva en el gel de detección de actividad peroxidasa, si bien carece de actividad NR. Este tipo de agregados también se observó en otras NRs de membrana aisladas de otras fuentes (Correia y col., 2008).

La dependencia de Mo por parte de la NRm aislada es clara, tal como lo demostraron los resultados obtenidos en cultivo de *S. meliloti* 2011 activos como en muestras de la enzima aislada por tratamiento con WO_4^{2-} . Como se dijo anteriormente, el tungsteno es un inhibidor bien conocido de muchas molibdoenzimas pertenecientes a la familia de la DMSOR tales como NR y formato deshidrogenasa (Enoch y Lester,

1972; Amy y Rajagopalan, 1979). Las formas de la enzima sustituida con W pueden obtenerse por exposición de las muestras al tungstato, recuperándose muestras inactivas (Takahashi y Nason, 1957; Notton y Hewit, 1971; Enoch y Lester, 1972; Amy y Rajagopalan, 1979; Pollock y col., 2002; Gates y col., 2003), salvo pocas excepciones (Buc y col., 1999; Stewart y col., 2000). La NRm aislada de *S. meliloti* 2011 no resultó ser una excepción y evidentemente la sustitución de Mo por W tiene lugar en esta enzima, como se observó en otras de su clase (Pollock y col., 2002; Gates y col., 2003). El contenido de MGD en NRm está dentro de los valores típicos reportados para proteínas de Mo y W donde el átomo metálico se encuentra asociado a dos moléculas de pterina (George y col., 1998; Dias y col., 1999; Thapper y col., 2006).

Cinéticamente la enzima NRm aislada de *S. meliloti* 2011 presenta una gran afinidad por el nitrato comparada con otras enzimas de su tipo y sigue un mecanismo de Michaelis-Menten. Esta afinidad es comparable a la reportada para NarGHIs aisladas de *Clostridium perfringens* ($K_M = 100 \mu\text{M}$) (Seki-Chiba e Ishimoto, 1977) y *Pyrobaculum aerophilum* ($K_M = 58 \mu\text{M}$) (Afshar y col., 2001). Valores más grandes de K_M , en el rango de 250-4000 μM , se han reportado para enzimas del tipo NarGHI purificadas a partir de otros procariotas (Forget, 1971; Forget, 1974; Toshio, 1981; Carlson y col., 1982; Craske y Ferguson, 1986; Blümle y Zumft, 1991; Correia y col., 2008). El *turnover* de la enzima ($k_{\text{cat}} = 12 \text{ s}^{-1}$) es similar al encontrado para la NarGHI de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 (Correia y col., 2008). No existen reportes de parámetros cinéticos para otras NRs aisladas de rizobacterias por lo que este trabajo constituye el primero en su clase.

La enzima resultó ser inhibida por agentes como azida, cianuro y clorato, pero el amonio no tuvo efecto alguno sobre la actividad enzimática, tal como se mostró en resultados. Los patrones y los rangos de inhibición son similares a lo reportados para otras enzimas de su tipo en la bibliografía (Redclife y Nicholas, 1970; Van'T y col., 1975; Bell y col., 1990). Particularmente, la inhibición por azida denota la diferenciación de las especies periplasmáticas las cuales son sensibles a concentraciones milimolares, asociando la actividad aislada con la de NRs respiratorias (Bercks y col., 1995c; Moreno-Vivián y col., 1999). Esto se refuerza por la inhibición ante el clorato el cual se usa como agente para diferenciar las NRs periplasmáticas de aquellas situadas de cara

al citoplasma (Rusmana y Nedwell, 2004). La insensibilidad de la actividad al amonio denota la naturaleza desasimilativa de la enzima (Moreno-Vivián y col., 1999).

II.4.3 NR-NiR aislada de *S. meliloti* 2011.

Como se mencionó en el apartado de introducción de este capítulo (Tabla II-1), dentro de las enzimas con actividad NR en citoplasma se pueden citar las Nas y las NRm (la subunidad catalítica de NRm se encuentra en citoplasma) (Moreno-Vivián y col., 1999; González y col., 2006). En lo que refiere a la actividad NiR en citoplasma, la bibliografía reporta que las especies enzimáticas que llevan a cabo esta actividad presentan FAD, centros FeS y sirohemo, y son especies que generan amonio (Tabla II-6) (Moreno-Vivián y col., 1999). Lo que sí es muy raro, es encontrar las actividades NR y NiR en una misma entidad enzimática y esto sólo ha sido reportado en *Geobacter metallireducens* (Martínez-Murillo y col., 1999) y particularmente en una enzima aislada de membrana.

Características	Vía Asimilativa	Vía Desasimilativa		
		Respiración de NO_2^-		Reducción de NO_2^-
Genes	<i>nasB^a/nirA^b</i>	<i>nirS/nirK</i>	<i>nrf</i>	<i>nirBD</i>
Localización	Citoplasma	Periplasma	Periplasma	Citoplasma
Reacción	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$
Grupos prostéticos	FAD ^c , clústeres [FeS], Sirohemo	Hemo <i>cd₁</i> /Cu	Hemo <i>c</i>	FAD, clústeres [FeS], Sirohemo
Transporte	Si	No	No	Si
Función	Asimilación	Fuerza protomotriz (desnitrificación)	Fuerza protomotriz (amonificación)	Disipación de poder reductor y detoxificación de nitritos
Regulación	NH_4^+ , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	O_2 , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	O_2 , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	O_2 , $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$

Tabla II-6. Reducción de nitritos en procariontas. ^a siguiendo la designación de NADH-nitrito reductasa en *K. oxytoca*. ^b siguiendo la designación de ferredoxina-nitrito reductasas en cianobacterias. ^c FAD está presente en NADH-nitrito reductasas pero está ausente en ferredoxina-nitrito reductasas de cianobacterias. (Moreno-Vivián y col., 1999).

En este trabajo, a lo largo del proceso de purificación en la fracción citoplasmática, se ha logrado aislar una enzima con actividad dual NR y NiR. Como se dijo anteriormente en el apartado de resultados, las actividades copurifican a lo largo de los distintos pasos cromatográficos y la banda de proteína que se recupera mediante geles preparativos y electroelución, conserva las dos actividades y en geles desnaturalizantes presenta dos subunidades, 52 y 37 kDa. Las NR citoplasmáticas suelen presentar dos subunidades (Nas: 90-105 y ~45 kDa) o una subunidad (NarB: 75-105 kDa) (González y col., 2006), mientras que las NiR citoplasmáticas dos subunidades (NirBD) o una subunidad (NasB o NiRA) (Campbell y Kinghorn, 1990; Brittain y col., 1992). Como puede observarse, el tamaño de las subunidades de la enzima NR-NiR de *S. meliloti* 2011 no son coincidentes con los reportados para la subunidad catalítica de la actividad NR. Sólo existe un reporte de una enzima aislada de *R. meliloti* (hoy *S. meliloti*), cuyo tamaño es 64 kDa en geles desnaturalizantes y 58 kDa mediante filtración por geles, y que ha sido aislada a partir de células crecidas en aerobiosis (Sekiguchi y Maruyama, 1988). Si analizamos lo reportado en el genoma de *S. meliloti* (Barnett y col., 2001; Finan y col., 2001; Galibert y col., 2001), podemos encontrar genes *narB* (SMb20986) y *nirBD* (SMb20984 y SMb20985), los cuales podrían dar lugar al arreglo enzimático aislado de la fracción citoplasmática de *S. meliloti* 2011.

Enzima	K_M	Dador ensayado	Referencias
NRs desasimilativas	0,3-3,8 mM NO_3^-	MV	(Zumft, 1997)
NRs asimilativas	0,08-1 mM NO_3^-	MV	(Zumft, 1997)
NiRs de Cu	0,23-0,74 mM NO_2^-	MV	(Zumft, 1997)
NiRs citocromo cd_1	0,028-0,08 mM NO_2^-	MV	(Zumft, 1997)
NR <i>Rhizobium meliloti</i>	0,9 mM NO_3^-	-	(Sekiguchi y Maruyama, 1986)
NRm <i>S. meliloti</i> 2011	$0,097 \pm 0,005$ mM NO_3^-	MV	Este trabajo
NR: NR-NiR <i>S. meliloti</i> 2011	$0,127 \pm 0,008$ mM NO_3^-	MV	Este Trabajo
NiR: NR-NiR <i>S. meliloti</i> 2011	$1,2 \pm 0,1$ mM NO_2^-	MV	Este trabajo

Tabla II-7. Propiedades cinéticas de NRs y NiRs. Se detallan los K_M de diversas enzimas NR y NiR para compararlos con los obtenidos en las enzimas aisladas en este trabajo.

Respecto de las propiedades cinéticas (Tabla II-7), la enzima NR-NiR de *S. meliloti* 2011 presenta una afinidad por nitrato similar a la obtenida para NRm de *S. meliloti* y una afinidad equiparable al de aquellas enzimas de vías asimilativas y una afinidad mayor que la reportada para enzimas de vías desasimilativas. La actividad NiR de NR-NiR de *S. meliloti* 2011 presentó una menor afinidad por nitrito que la reportada para otras NiRs (Tabla II-7). Si se la compara con la enzima de actividad dual aislada de *G. metallireducens*, las afinidades son mucho menores, considerando que se reportaron valores de K_M de 32 μM (nitrato) y 10 μM (nitrito) (Martínez-Murillo y col., 2009). La enzima NR-NiR de *S. meliloti* 2011 tendría ventajas fisiológicas dado que una vez alcanzada una concentración de nitrito este sería consumido por la actividad NiR, y así evitaría la acumulación de nitrito tóxico y la generación de amonio útil metabólicamente.

Otro resultado importante encontrado en este trabajo es el de los agentes inhibidores de la enzima aislada. Entre los agentes que inhiben las NiRs de vías desnitrificantes (formadoras de NO) están el dietilditiocarbamato (Prudencio y col., 1999; Ichiki y col., 2001), el cianuro de potasio (Ichiki y col., 2001) y la azida sódica (Lam y Nicholas, 1969), entre otros. Las NiRs de vías asimilativas (formadoras de NH_4^+) se ven afectadas por cianuro de potasio y azida sódica entre otros agentes (Kajie y Anraku, 1986; Einsle y col., 2000). Como se detalló en resultados, la actividad NR de NR-NiR resultó inhibida por agentes como cianuro y azida. Se inhibió por clorato, y el amonio no tuvo efecto sobre la misma, lo que podría corresponderse con un perfil respiratorio-desasimilativo. La actividad NiR por su parte es muy sensible a dietilditiocarbamato y cianuro, lo cual podría relacionarse con un perfil respiratorio-desasimilativo, hecho que se refuerza por la insensibilidad a amonio.

II.4.4 Comparación entre NRs aisladas de rizobacterias.

Bradyrhizobium sp. (*Lupinus*) y *B. japonicum* producen dos isoformas de NRs asociadas a membrana. Estas NRs son proteínas heteromultiméricas con 3 ó 4 subunidades (Fernández-López y col., 1996; Polcyn y Luciński, 2006), a diferencia de lo encontrado para NRm de *S. meliloti* 2011, la cual resultó ser una proteína heterodimérica. La diferencia de composición de subunidades de las NRm aisladas de rizobacterias sugiere que tanto la integración con el sistema de membranas como la

interacción con un dador de electrones externo son llevadas a cabo de una manera novedosa. Proteínas que muestran diferentes composiciones estructurales pero que llevan a cabo la misma función, comúnmente se encuentran dentro de la familia de proteínas mononucleares de molibdeno (Moura y col., 2004). Sin embargo, esta característica particular posiblemente relacionada a diferentes estadios de evolución, ha sido solo observada en proteínas de origen periplasmático o citoplasmático, lo cual constituye un hallazgo inesperado para proteínas de Mo asociadas a membrana.

La secuencia aminoacídica de la subunidad mayor de la NRm aislada de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* muestra que los residuos involucrados con la unión de MGD en NarG están conservados (Polcyn, 2008). Este resultado y la detección del nucleótido de guanina asociado al cofactor de Mo en la NRm de *S. meliloti* 2011 indicaría que la actividad NR de NRm provenientes de rizobacterias se asocia con un cofactor de Mo similar al de NarGHI.

Otra diferencia remarcable es que el cofactor hémico se detectó en NRm de *S. meliloti* 2011 pero no en las enzimas aisladas de *B. japonicum* y *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. Sin embargo Polcyn y col., sobre la base de una de las subunidades presente en ambas isoformas de NRm de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* y que muestra un tamaño similar a NarI, sugiere que la enzima posee cofactores hémicos que se pierden a lo largo del proceso de purificación (Polcyn y Luciński, 2006).

La carencia de secuencias compatibles con el operón *narGHI* en el genoma de rizobacterias permite evidenciar proteínas con diferente organización estructural respecto de NarGHI pero que desempeñan la misma función, como se observó en NRm heterodimérica de *S. meliloti* 2011 y en las dos isoformas de NRm aislada de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* y *B. japonicum* (Fernández-López y col., 1996; Polcyn y Luciński, 2006). NarGHI está anclada a membrana mediante la subunidad hémica pequeña o NarI (19-25 kDa), la cual presenta los sitios de interacción para el dador externo de electrones. Presumiblemente, la subunidad hémica de NRm de *S. meliloti* 2011 realizaría la misma función que la esperada para la subunidad de anclaje. Por el contrario, el hecho de que la subunidad con tales características no haya sido observada en NRm de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* y *B. japonicum*, sugiere un anclaje a membrana diferente para las NRm en estos dos tipos de rizobacterias.

Tanto el hallazgo de una proteína mononuclear de Mo asociada a membrana con funciones NR y distinta a NarGHI, como el hecho de encontrar una proteína citoplasmática con actividades NR-NiR en *S. meliloti* 2011 son resultados novedosos. Este tipo de comportamiento rara vez se observa en la naturaleza y es la primera vez que se reporta para rizobacterias. Como muestran los resultados, la enzima es capaz de procesar ambos sustratos, nitrato y nitrito, presentando afinidades bien diferentes. Si se investiga en la bibliografía, solo una NR citoplasmática se reportó para *S. meliloti* y presentó características de intervenir en el metabolismo asimilativo (Sekiguchi y Maruyama, 1988). A nivel de genoma de *S. meliloti* se pueden citar algunos genes con funciones NR y NiR compatibles con la naturaleza y funcionalidad observada. Los perfiles metabólicos de las enzimas aisladas, de acuerdo a tipos de inhibidores, es de naturaleza respiratoria-desasimilativa, como se dijo anteriormente. En *Bradyrhizobium*, las enzimas aisladas están involucradas en la vía desnitrificante y cumplen funciones de proveer energía al acoplar la reducción de nitratos con la generación de una fuerza protomotriz a través de la membrana, lo que conduce a la generación de energía. La enzima NRm de *S. meliloti* podría cumplir la misma función, tal como sugeriría la inhibición por clorato y la insensibilidad a amonio. La enzima citoplasmática también tendría implicancias en el metabolismo respiratorio, pero además, el amonio generado serviría como precursor para vías de síntesis, si bien podría considerarse que esta no es la función primaria de la enzima.

II.5 Bibliografía

Afshar, S.; Johnson, E.; de Vries, S. y Schröder, I. (2001) *Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum aerophilum*. J. Bacteriol. 183: 5491-5495.

Amy, N.K. y Rajagopalan, K.V. (1979) *Characterization of molybdenum cofactor in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 140: 114-124.

Antipov A.N.; Sorokin, D.Y.; L'Vov, N.P. y Kuenen, J.G. (2003) *New enzyme belonging to the family of molybdenum-free nitrate reductases*. Biochem J. 369: 185-189.

Arrese-Igor, C.; Minchin, F.R.; Gordon, A.J. y Nath, A.K. (1997) *Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate*. J. Exp. Bot. 48: 905-913.

Ballard, A.C. y Ferguson, S.J. (1988) *Respiratory nitrate reductase from Paracoccus denitrificans. Evidence for two b-type haems in the gamma subunit and properties of a water-soluble active enzyme containing alpha and beta subunits*, Eur. J. Biochem. 174: 207-212.

Barnett, M.J.; Fisher, R.F.; Jones, T.; Komp, C.; Pia Abola, A.; Barloy-Hubler, F.; Browser, L.; Capela, D.; Galibert, F.; Gouzy, G.; Gurjal, M.; Hong, A.; Huizar, L.; Hyman, R.W.; Khan, D.; Khan, M.L.; Kalman, S.; Keating, D.H.; Palm, C.; Peck, M.C.; Surzycki, R.; Wells, D.H.; Yeh, C.; Davis, R.W.; Federspiel, N y Long, S.R. (2001). *Nucleotide sequence and predicted functions of the entire Sinorhizobium meliloti pSymA megaplasmid*. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9883-9888.

Becana, M. y Sprent, J.I. (1987) *Nitrogen fixation and nitrite reduction in root nodules of legumes*. Plant Physiol. 70: 757-765.

Becana, M.; Minchin, F.R. y Sprent, J.I. (1989) *Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate. I. Nitrate effects on nitrate reductase activities of bacteroid and nodule cytosol*. Planta 180: 40-45.

Becker, A.; Bergés, H.; Krol, E.; Bruand, C.; Rüberg, S.; Capela, D.; Lauber, E.; Mellhoc, E.; Ampe, F.; de Bruijn, F.J.; Fourment, J.; Francez-Charlot, A.; Kahn, D.; Küster, H.; Liebe, C.; Pühler, A.; Weidner, S. y Batut, J. (2004) *Global changes in gene expression in Sinorhizobium meliloti 1021 under microoxic and symbiotic conditions*. Mol. Plant-Microb. Int. 17: 292-303.

Bell, L.C.; Richardson, D.J. y Ferguson, S.J. (1990) *Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in Thiosphaera pantotropha. The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification*. FEBS Lett. 265: 85-87.

Berks, B.C.; Page, M.D.; Richardson, D.J.; Reilly, A.; Cavill, A.; Outen, F. y Ferguson, S.J. (1995a) *Sequence analysis of subunit of membrane-bound nitrate reductase from a denitrifier bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for diahem electron-carrying arm of redox loop*. Mol. Microbiol. 15: 319-331.

Berks, B.C.; Richardson, D.J.; Robinson, C.; Reilly, A.; Aplin, R.T. y Ferguson, S.J. (1995b) *Purification y characterization of periplasmic nitrate reductase from Thiosphaera pantotropha*. Eur. J. Biochem. 220: 117-124.

-
- Berks, B.C.; Ferguson, .S.J.; Moir, J.W. y Richardson, D.J.I. (1995c) *Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions*. *Biochim. Biophys. Acta* 1232: 97-173.
- Bertero, M.G.; Rothery, R.A.; Palak, M.; Hou, C.; Lim, D.; Blasco, F.; Weiner, J.H. y Strynadka, N.C. (2003) *Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A*. *Nat. Struct. Biol.* 10: 681-687.
- Blasco, F.; Giugliarelli, B.; Magalon, A.; Asso, M.; Giordano, G. y Rothery, R.A. (2001) *The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases*. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 179-193.
- Blasco, R.; Castillo, F. y Martínez-Luque, M. (1997) *The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium, Rhodospirillum rubrum, is a flavoprotein*. *FEBS Lett.* 414: 45-49.
- Blümle, S. y Zumft, W.G. (1991) *Respiratory nitrate reductase from denitrifying Pseudomonas stutzeri, purification, properties and target of proteolysis*. *Biochim. Biophys. Acta* 105: 102-108.
- Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brittain, T.; Blackmore, R.; Greenwood, C. y Thomson, A.J. (1992) *Bacterial nitrite reducing enzymes*. *Eur. J. Biochem.* 209: 793-802.
- Brondijk, T.H.; Nilavongse, A.; Filenko, N.; Richardson, D.J. y Cole, J.A. (2004) *NapGH components of the periplasmic nitrate reductase of Escherichia coli K12: localization, topology and physiological roles in quinol oxidation and redox balancing*. *Biochem. J.* 379: 47-55.
- Buc, J.; Santini, S.L.; Giordani, R.; Czjzek, M.; Wu, L.F. y Giordano, G. (1999) *Enzymatic and physiological properties of the tungsten-substituted molybdenum TMAO reductase from Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32: 159-68.
- Campbell, W.J. y Kinghorn, J.R. (1990) *Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases*. *Trends Biochem. Sci.* 15: 315-319.
- Capela, D.; Barloy-Hubler, F.; Gouzy, J.; Bothe, G.; Ampe, F.; Batut, J.; Boistard, P.; Becker, A.; Bountry, M.; Cadieu, E.; Dréano, S.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Kahn, D.; Kiss, E.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Pohl, T.; Portetelle, D.; Püler, A.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Renard, C.; Thébault, P.; Vandenbold, M.; Weidner, S. y Galibert, F. (2001) *Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti strain 1021*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 9877-9882.
- Carlson, C.; Ferguson, L.P., y Ingraham, J.L. (1982) *Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 151: 162-171.
- Chamber-Perez, M.A.; Camacho-Martinez, M. y Soriano-Niebla, J.J. (1997) *Nitrate reductase activities of Bradyrhizobium sp. In tropical legumes: effects of nitrate on O₂ diffusion in nodules and carbon costs of N₂ Fixation*. *J. Plant Physiol.* 150: 92-96.
-

-
- Chaudry, G.R y MacGregor, C.H. (1983) *Cytochrome b from Escherichia coli nitrate reductase. Its properties and association with the enzyme complex.* J. Biol. Chem. 258: 5819-5827
- Cornish-Bowden, A. y Eisenthal, R. (1974) *Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods.* Biochem. J. 139: 721-730.
- Correia, C.; Besson, S.; Brondino, C.D.; González, P.; Fauque, G.; Lampreia, J.; Moura, I. y Moura, J.J.G. (2008) *Biochemical and spectroscopic characterization of the membrane-bound nitrate reductase from Marinobacter hydrocarbonoclasticus 617.* J. Biol. Inorg. Chem. 13: 1321-1333.
- Craske, A. y Ferguson, S.J. (1986) *The respiratory nitrate reductase from Paracoccus denitrificans. Molecular characterization and kinetic properties.* Eur. J. Biochem. 158: 429-436.
- Cutler, P. (2004). *Size exclusion chromatography. En Methods in Molecular Biology™ Vol. 244: Protein Purification Protocols, 2nd Edition.* (Ed. Cutler, P.) Humana Press Inc, New Jersey, p 239-251.
- Davis, B.J. (1964) *Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427.
- De Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B.; Dewettinck D.; Maestrojuan, G.; Neyra, M.; Collins M.D.; Dreyfus, B.; Kersters, K. y Gillis, M. (1994) *Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus Sinorhizobium and description of Sinorhizobium meliloti comb. nov., Sinorhizobium saheli sp. nov., and Sinorhizobium teranga sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 715-733.
- Dias, J.M.; Than, M.E.; Humm, A.; Huber, R.; Bourenkov, G.P.; Bartunik, H.D.; Bursakov, S.; Calvete, J.; Caldeira, J.; Carneiro, C.; Moura, J.J.; Moura, I. y Romão, M.J. (1999) *Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods.* Structure 15: 65-79.
- Dos Santos, P.; Igarashi, R.I.; Lee, Hong-In; Hoffman, B.M.; Seefeldt, L.C. y Dean, D.R. (2005) *Substrate interactions with the nitrogenase active site.* Acc. Chem. Res. 38: 208-214.
- Einsle, O.; Stach, P.; Messerschmidt, A.; Simon, J.; Kroger, A.; Huber, R. y Kroneck, P.M.H. (2000) *Cytochrome c nitrite reductase from Wolinella succinogenes structure at 1.6 Å resolution, inhibition binding, and heme packing motifs.* J. Biol. Chem. 275: 39608-39616.
- Eisenthal, R. y Cornish-Bowden, A. (1974) *The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters.* Biochem. J. 139: 715-720.
- Enoch, H.J. y Lester, R.L. (1972) *Effects molybdate, tungstate and selenium compounds on formate dehydrogenase and other enzymes systems in Escherichia coli.* J. Bacteriol. 110: 1032-1040.
- Fernández-López, M., Olivares, J. and Bedmar, E.J. (1996) *Purification and characterization of the membrane-bound nitrate reductase isoenzymes of Bradyrhizobium japonicum.* FEBS Lett. 392: 1-5.
-

-
- Finan, T.M.; Weidner, S.; Wong, K.; Buhrmester, J.; Chain, P.; Vorhöllter, F.J.; Hernandez-Lucas, I.; Becker, A.; Cowie, A.; Gouzy, G.; Golding, B. y Pülher, A. (2001) *The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9889-9894.
- Forget, P. (1971) *Bacterial nitrate reductases. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of Micrococcus denitrificans*. Eur. J. Biochem. 18: 442-450.
- Forget, P. (1974) *The bacterial nitrate reductases. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of Escherichia coli K12*. Eur. J. Biochem. 42: 325-332.
- Francis, R.T. y Becker, R.R. (1984) *Specific indication of heme proteins in polyacrylamide gels using a double-staining process*. Anal. Chem. 136: 509-514.
- Galibert, F.; Finan, T.M.; Long, S.R.; Puhler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler, F.; Barnett, M.J.; Becker, A.; Boistard, P.; Bothe, G.; Boutry, M.; Bowser, L.; Buhrmester, J.; Cadieu, E.; Capela, D.; Chain, P.; Cowie, A.; Davis, R.W.; Dreano, S.; Federspiel, N.A.; Fisher, R.F.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Golding, B.; Gouzy, J.; Gurjal, M.; Hernandez-Lucas, I.; Hong, A.; Huizar, L.; Hyman, R.W.; Jones, T.; Kahn, D.; Kahn, M.L.; Kalman, S.; Keating, D.H.; Kiss, E.; Komp, C.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Palm, C.; Peck, M.C.; Pohl, T.M.; Portetelle, D.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Surzycki, R.; Thebault, P.; Vandenbol, M.; Vorholter, F.J.; Weidner, S.; Wells, D.H.; Wong, K.; Yeh, K.C. y Batut, J. (2001) *The composite genome of the legume symbiont Sinhorhizobium meliloti*. Science 293: 668-672.
- Gangeswaran, R.D.; Lowe, J.D. y Eady, R.R. (1993) *Purification y characterization of the assimilatory nitrate reductase of Azotobacter vinelandii*. Biochem. J. 289: 335-342.
- García-Plazaola, J.I.; Becerril, J.M.; Arrese-Igor, C.; Hernandez, A.; Gonzalez-Murua, C. y Aparicio-Tejo, P.M. (1993) *Denitrifying ability of thirteen Rhizobium meliloti strains*. Plant Soil 149: 43-50.
- Gates, A.J.; Hughes, R.O.; Sharp, S.R.; Millington, P.D.; Nilavongse, A.; Cole, J.A.; Leach, E.R.; Jepson, B.; Richardson, D.J. y Butler, C.S. (2003) *Properties of the periplasmic nitrate reductase from Paracoccus pantotrophus and Escherichia coli after growth in tungsten-supplemented media*. FEMS Microbiol. Lett. 220: 261-269.
- George, G.N.; Colangelo, C.M.; Dong, J.; Scott, R.A.; Khangulov, S.V.; Gladyshev V.N. y Stadtman, T.C. (1998) *X-ray absorption spectroscopy of the molybdenum site of Escherichia coli formate dehydrogenase*. J. Am. Chem. Soc. 120: 1267-1273.
- Geurts, R. y Franssen, H. (1996) *Signal transduction in Rhizobium-induced nodule formation*. Plant Physiol. 112: 447-453.
- Godfrey, C.; Greenwood, C.; Thomson, A.J.; Bray, R.C. y George, G.N. (1984) *Electron-paramagnetic-resonance spectroscopy studies on the dissimilatory nitrate reductase from Pseudomonas aeruginosa*. Biochem J. 224: 601-608.
- González, P.J.; Correia, C.; Moura, I.; Brondino, C.D. y Moura, J.J.G. (2006) *Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction*. J. Inorg. Biochem. 100: 1015-1023.
-

-
- Gremer, L. y Meyer O. (1996) *Characterization of xanthine dehydrogenase from anaerobic bacterium Veillonella atypical and identification of a molybdopterincytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor*. Eur. J. Biochem. 238: 862-866.
- Hettmann, T.; Anemüller, S.; Borchering, H.; Mathé, L.; Steinrücke, P. y Diekmann, S. (2003) *Pseudomonas stutzeri soluble nitrate reductase alphabeta-subunit is a soluble enzyme with a similar electronic structure at the active site as the inner membrane-bound alphabeta gamma holoenzyme*. FEBS Lett. 534: 143-150.
- Hille, R. (1996) *The mononuclear molybdenum enzymes*. Chem. Rev. 96: 2757-2816.
- Hochstein, L.I. y Tomlinson, G.A. (1988) *The enzymes associated with denitrification*. Annu. Rev. Microbiol. 42: 231-261.
- Ichiki, H.; Tanaka, Y.; Mochizuki, K.; Yoshimatsu, K.; Sakurai, T. y Fujiwara, T. (2001) *Purification, characterization, and genetic analysis of Cu-containing dissimilatory nitrite reductase from a denitrifying halophilic archaeon, Haloarcula marismortui*. J. Bacteriol. 183: 4149-4156.
- Ida, S. (1977) *Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin-sepharose affinity chromatography*. J. Biochem. (Tokio) 82: 915-918.
- Ilbert, M.; MéJean, V. y lobby-Nivo, C. (2004) *Functional and structural analysis of members of the TorD family, a large chaperone family dedicated to molybdopterin*. Microbiol. 150: 935-943.
- Jormakka, M.; Richardson, D.; Byrne, B. e Iwata, S. (2004) *Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes*. Structure 12: 95-104.
- Kajie, S. y Anraku, Y. (1986) *Purification of hexaheme cytochrome c552 from Escherichia coli K12 and its properties as nitrite reductase*. Eur. J. Biochem. 154: 457-463.
- Körner, H. y Zumft, W.G. (1989) *Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1670-1676.
- Kretzer, A.; Frunzke, K. y Andreesen, J.R. (1993) *Catabolism of isonicotinate by Mycobacterium sp. INA1: extended description of the pathway and purification of the molybdenum isonicotinate dehydrogenase*. J. Gen Microbiol. 139: 2763-2772.
- Laemmli, U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4*. Nature 74: 680-685.
- Lam, Y. y Nicholas, D.J.D. (1969) *A nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from Micrococcus denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta 180: 459-472.
- Lin, J.T.; Goldman, B.S. y Stewart, V. (1994) *The nasFEDCBA operon for nitrate and nitrite assimilation in Klebsiella pneumoniae M5a1*. J. Bacteriol. 176: 2551-2559.
- Lippard, S. y Berg, J.M. (1994). *Chapter 5: Choice, uptake and assembly of metal containing units in biology. En: Principles of bioinorganic chemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA. USA, p 103-137.
- Luciński, R.; Polcyn, W. y Ratajczak, L. (2002) *Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes*. Acta Biochim. Pol. 49: 537-546.
-

-
- MacGregor, C.H. (1975) *Solubilization of Escherichia coli nitrate reductase by a membrane-bound protease*. J. Bacteriol 121: 1102-1110.
- Martínez-Murillo, F.; Gugliuzza, T.; Senko, J.; Basu, P. y Stolz, J.F. (1999) *A heme-C-containing enzyme complex that exhibits nitrate and nitrite reductase activity from the dissimilatory iron-reducing bacterium Geobacter metallireducens*. Arch Microbiol. 172: 313-320.
- Moir, J.W. y Wood, N.J. (2001) *Nitrate and nitrite transport in bacteria*, Cell Mol. Life Sci. 58: 215-224.
- Moreno-Vivián, C. y Ferguson, S.J. (1998) *Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways*. Mol. Microbiol. 29: 664-666.
- Moreno-Vivián, C.; Cabello, P.; Martínez-Luque, M.; Blasco, R. y Castillo, F. (1999) *Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties y functional distinction among bacterial nitrate reductases*. J. Bacteriol. 181: 6573-6584.
- Moura, J.J.; Brondino, C.D.; Trincao, J. y Romão, M.J. (2004) *Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases*. J. Biol. Inorg. Chem. 9: 791-799.
- Murphy, M.J.; Siegel, L.M.; Tove, S.R. y Kamin, H. (1974) *Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases*. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 612-616.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2005) *Chapter 19: Oxidative phosphorylation and photophosphorylation*. En: *Lehninger principles of biochemistry, 4th Ed*. Freeman and Company, New York, p 693-694.
- Notton, B.A. y Hewit, E.J. (1971) *The role of tungstate in the inhibition of nitrate reductase activity in spinach (spinacea oleracea L.) leaves*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 702-710.
- O'Farrell. (2004). *Hydrophobic interaction Chromatography*. En *Methods in Molecular Biology™ Vol. 244: Protein Purification Protocols, 2nd Edition*. (Ed. Cutler, P.) Humana Press Inc, New Jersey, p 133-137.
- Ogawa, K.I.; Akawa, E.; Yamane, K.; Sun, Z.W.; LaCelle, M.; Zuber, P. y Nakano, M. (1995) *The nasB operon y nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177: 1409-1413.
- O'Hara, G.W. and Daniel, R.M. (1983) *Effect of oxygen on the synthesis, activity, and breakdown of Rhizobium denitrification system*. J. Gen. Microbiol. 129: 2405-2412.
- O'Hara, G.W., Daniel, R.M. (1984) *Nitrogen losses from soils caused by Rhizobium-dependent denitrification*. Soil Biol. And Biochem. 16: 429-431.
- Olmo-Mira, M.F.; Gavira, M.; Richardson, D.J.; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C. y Roldán, M.D. (2004) *NapF is a cytoplasmic iron-sulfur protein required for Fe-S cluster assembly in the periplasmic nitrate reductase*. J. Biol. Chem. 279: 49727-49735.
- Philippot, L. y Højberg, O. (1999) *Dissimilatory nitrate reductases in bacteria*. Biochim. Biophys. Acta 1446: 1-23.
-

- Philippot, L.A.; Clays-Jossery, R.; Lensi, R.; Trinsotreau, I.; Normy, P. y Potier, P. (1997) *Purification of the dissimilative nitrate reductase of Pseudomonas fluorescens and the cloning and sequencing of its corresponding genes*. Biochim. Biophys. Acta 1350: 272-276.
- Pinho D.; Besson, S.; Silva, P.J.; de Castro, B. y Moura I. (2005) *Isolation and spectroscopic characterization of the membrane-bound nitrate reductase from Pseudomonas chlororaphis DSM 50135*. Biochim. Biophys. Acta 1723: 151-62.
- Polcyn, W. (2008) *Mass spectrometry identification of membrane-bound nitrate reductase from Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. Acta Biochim. Pol. 55: 755-760.
- Polcyn, W. and Luciński, R. (2003) *Aerobic and anaerobic nitrate and nitrite reduction in free-living cells of Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. FEMS Microbiol. Lett. 226: 331-337.
- Polcyn, W. and Luciński, R. (2006) *Dissimilatory nitrate reductase from Bradyrhizobium sp. (Lupinus): subcellular location, catalytic properties and characterization of the active enzyme forms*. Curr. Microbiol. 52: 231-237.
- Polcyn, W. and Luciński, R. (2009) *Effect of N oxyanions on anaerobic induction of nitrate reductase in subcellular fractions of Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, Antonie van Leeuwenhoek 95: 159-164.
- Pollock, V.V.; Conover, R.C.; Johnson, M.K. y Barber, M.J. (2002) *Bacterial expression of the molybdenum domain of assimilatory nitrate reductase: production of both the functional molybdenum-containing domain and the nonfunctional tungsten analog*. Arch. Biochem Biophys. 403: 237-248.
- Prudencio, M.; Eady, R.R. y Sawers, G. (1999) *The blue copper-containing nitrite reductase from Alcaligenes xylosoxidans: cloning of the nirA gene and characterization of the recombinant enzyme*. J. Bacteriol. 181: 2323-2329.
- Radionov, D.A.; Dubchak, I.L.; Arkin, A.P.; Alm, E.J. y Gelfy, M. (2005) *Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks*. PLOS Computacional Biology, 1: 415-431.
- Redcliffe, B.C. y Nicholas, D.J.D. (1970) *Some properties of nitrate reductase from Pseudomonas denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta 205: 273-287.
- Richardson, D. y Sawers G. (2002) *Structural biology. PMF through the redox loop*. Science 295: 1842-1843.
- Richardson, D.J. (1998) *Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport*. J. Biol. Chem. 273: 28785-28790.
- Richardson, D.J. y Watmough, N.J. (1999) *Inorganic nitrogen metabolism in bacteria*. Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 207-219.
- Richardson, D.J.; Berks, B.C.; Russell, D.A.; Spiro, S. y Taylor, C.J. (2001) *Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases*. Cell Mol. Life Sci. 58: 165-178.
- Roldán, M.D.; Sears, H.J.; Cheesman, M.R.; Ferguson, S.J.; Thomson, A.J.; Berks, B.C. y Richardson, D.J. (1998) *Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type*

cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. J. Biol. Chem. 273: 28785-28790.

Rubio, L.M.; Herrero, A. y Flores, E. (1996) *A cyanobacterial narB gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase*. Plant. Mol. Biol. 30: 845-850.

Rusmana, I. y Nedwell, B.D. (2004) *Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment*. FEMS Microbiol. Ecol. 48: 379-386.

Schomburg, D. y Schomburg, I. (2004) En: *Springer handbook of enzymes 2nd edition (Vol. 24)*. Springer-Verlag, New York, p 325-335.

Schultze, M. y Kondorosi, A. (1998) *Regulation of symbiotic root nodule development*. Annu. Rev. Genet. 32: 33-57.

Seki-Chiba, S. e Ishimoto, M. (1977) *Studies on nitrate reductase of Clostridium perfringens. Purification, some properties, and effect of tungstate on its formation*. J Biochem. 82: 1663-71.

Sekiguchi, S. y Maruyama, Y. (1988) *Assimilatory reduction of nitrate in Rhizobium meliloti*. J. Basic Microb. 28: 529-539.

Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsbarg, A., Schneider, B., Kostka, S. y Friedrich, B. (1993) *Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in Alcaligenes eutrophus H16*. J. Bacteriol. 175: 5867-5876.

Smith, L. (1978) *Bacterial cytochromes and their spectral characterization*. Methods Enzymol. 53: 202-212.

Solomon, E.I.; Baldwin, M.J. y Lowery, M.D. (1992) *Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity*. Chem. Rev., 92: 521-542.

Stewart, L.J.; Bailey, S.; Bennett, B.; Charnock, J.M.; Garner, C.D. y McAlpine, A.S. (2000) *Dimethylsulfoxide reductase: an enzyme capable of catalysis with either molybdenum or tungsten at the active site*. J. Mol. Biol. 299: 593-600.

Takahashi, H. y Nason, A. (1957) *Tungstate as a competitive inhibitor of molybdate in nitrate assimilation an in N₂ fixation by Azotobacter*. Biochim. Biophys. Acta. 23: 433-435.

Tan, J.; Soriano, A.; Man Lui, S. y Cowan, J.A. (1994) *Functional expression and characterization of the assimilatory-Type sulfite reductase from desulfovibrio vulgaris (Hildenborouh)*. Arch. Biochim. Biophys. 312: 516-523.

Thapper, A.; Rivas M.G.; Brondino, C.D.; Ollivier, B.; Fauque, G.; Moura, I. y Moura, J.J. (2006) *Biochemical and spectroscopic characterization of an aldehyde oxidoreductase isolated from Desulfovibrio aminophilus*. J. Inorg. Biochem. 100: 44-50.

Toshio, S. (1981) *Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome c from photodenitrifier, Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. Denitrificans*. Plant Cell Physiol. 22: 443-452.

van de Graaf, A.A.; Mulder, A.; de Bruijn, A.; Jetten, M.S.; Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1995) *Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1246-1251.

Van Mannen, J.M.S.; Welle, I.J.; Hageman, G.; Dallinga, J.W.; Martens, P.L., y Kleinjans, J.C. (1996) *Nitrate contamination of drinking water: relationships with HPTR variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines*. Environ. Health Perspect. 104: 522-528.

Van't, R.; Van Ee, J.H.; Wever, R.; Van Gelder, V.F. y Planta, R.J. (1975) *Characterization of the respiratory nitrate reductase of Klebsiella aerogenes as molybdenum-containing iron-sulfur enzyme*. Biochim. Biophys. Acta 405: 306-317.

Varinhos, F., Wallace, W. and Nicholas, D.J.D. (1989). *Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by Bradyrhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 135: 189-193.

Vincent, S.P. y Bray, R.C. (1978) *Electron-paramagnetic-resonance studies on nitrate reductase from Escherichia coli K12*. Biochem J. 171: 639-47.

Yoshimatsu, K.; Sakurai, T. y Fujiwara, T. (2000) *Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a denitrifying halophilic archaeon, Haloarcula marismortui*. FEBS Lett. 470: 216-220.

Zumft, W.G. (1997) *Cell biology and molecular basis of denitrification*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616.

Capítulo III

Estudio de proteínas mononucleares de molibdeno que intervienen en el metabolismo energético anaerobio en bacterias reductoras de sulfatos: Aldehído Oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas*.

III.1 Introducción

III.1.1. Familia de la Xantina Oxidasa: propiedades generales.

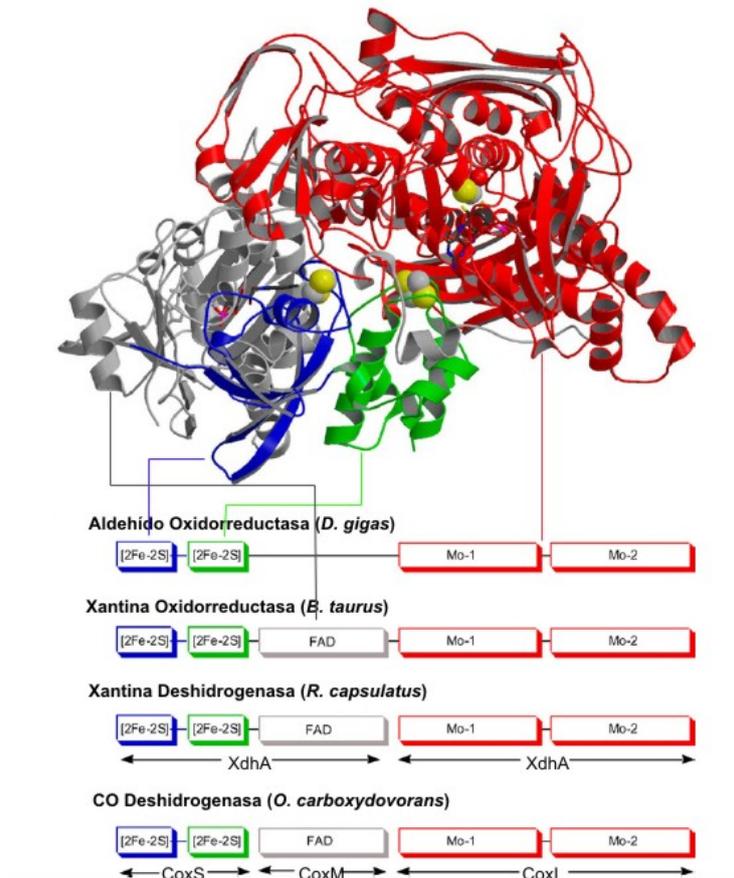
Las enzimas de esta familia generalmente catalizan reacciones de hidroxilación donde, a diferencia de otras hidroxilasas, el H₂O más que el O₂ se constituye en la fuente de oxígeno a ser incorporado en el sustrato (Hille, 1996; Romão y col., 2002).



Entre las diversas funciones que cumplen estas enzimas pueden citarse la metabolización de compuestos aromáticos y xenobióticos (quinolina 2-oxidoreductasa, Q2-OR y 4-hidroxi-bencil-CoA reductasa, 4-HBCR) (Bauder y col., 1990; Fetzner, 1998; Unciuleac y col., 2004; Boll, 2005), metabolismo de purinas (XO) (Brondino y col., 2006a), ciclo biogeoquímico del CO y del CO₂ (CO deshidrogenasa, COD) (Dobbek y col., 2002) y metabolismo energético anaeróbico en microorganismos reductores de sulfatos (aldehído oxidoreductasa, AOR) (Brondino y col., 2006a).

Los miembros de esta familia de enzimas en su estructura cristalina incluyen un sitio activo de Mo y una serie de cofactores metálicos (centros FeS) y orgánicos (FAD) que forman parte de la cadena de transferencia electrónica (Brondino y col., 2006a). Las enzimas XO y AOR de bacterias reductoras de sulfatos (BRS) son proteínas homodiméricas y la estructura cristalina de cada homodímero se organiza en tres dominios principales: dominio de unión a Mo, dominio de unión a centros FeS y dominio de unión a FAD (Figura III-1A). Como se observa en la figura el dominio de FeS aloja a dos centros del tipo [2Fe-2S], mientras que el dominio FAD contiene el cofactor flavínico. El dominio FAD está ausente en AORs de BRS (Brondino y col., 2006a). Todos estos cofactores también están presentes en Q2-OR, 4-HBCR y COD, pero la estructura de estas proteínas consiste de tres subunidades diferentes (grande, G, pequeña, P y mediana, M) organizadas en un dímero del arreglo GPM (Hille, 1996; Hille, 2005). El sitio activo, el cofactor flavínico y los centros FeS se ubican en las subunidades G, M y P, respectivamente (Figura III-1A).

A)



B)

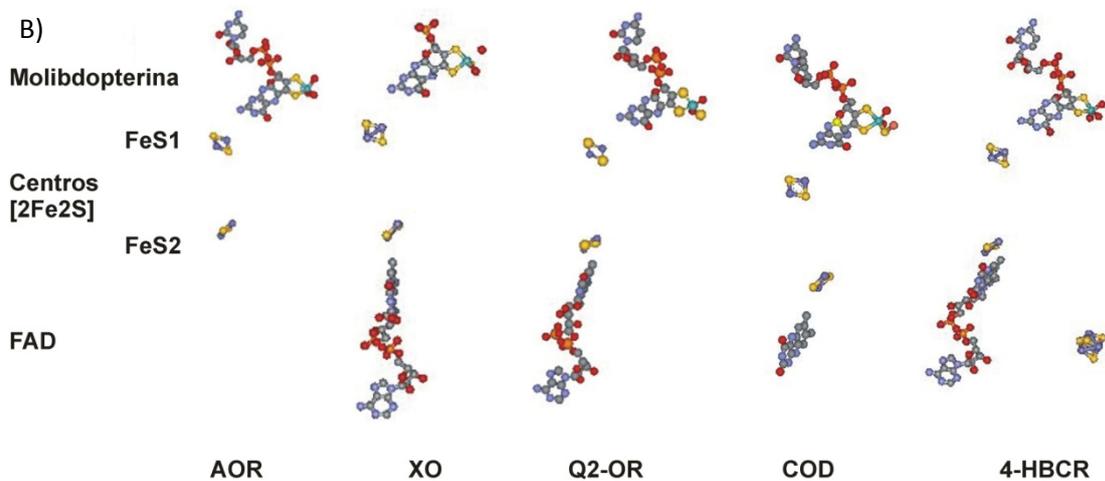


Figura III-1. Topología de proteínas de la familia de la XO y composición de cofactores metálicos y no metálicos presentes. A) Distribución de dominios en la estructura de la XO (adaptado de Hille, 2005) y su relación con la distribución en el resto de los miembros de la familia. B) cofactores redox involucrados en la cadena de transferencia electrónica distintos miembros de la familia de la XO: COD: CO deshidrogenasa (1N5W.pdb), 4-HBCR: 4-Hidroxi-bencil-CoA reductasa (1RM6.pdb), Q2-OR: quinolina 2-oxidoreductasa (1T3Q.pdb), XO: xantina oxidasa (1FIQ.pdb, AOR: aldehído oxidoreductasa (1VLB.pdb).

El sitio activo de todos los miembros de la familia de la XO presenta una alta similitud estructural y las diferencias se observan en el número y tipo de cofactores

redox de la cadena de transferencia electrónica (Figura III-1B). La cadena de transferencia electrónica más simple es la que se encuentra en la AOR (Figura III-1B), que además del sitio de Mo presenta dos centros [2Fe-2S] (Figura III-2), motivo que está presente en todos los miembros de la familia. Todos los miembros restantes presentan adicionalmente un cofactor FAD, mientras que en la estructura de 4-HBCR también aparece un centro [4Fe-4S] (Figura III-2) (Unciuleac y col., 2004). La COD constituye un miembro atípico de esta familia ya que el átomo de Mo se encuentra unido a un átomo de Cu a través de una unión μ -S (Dobbeek y col., 2002).

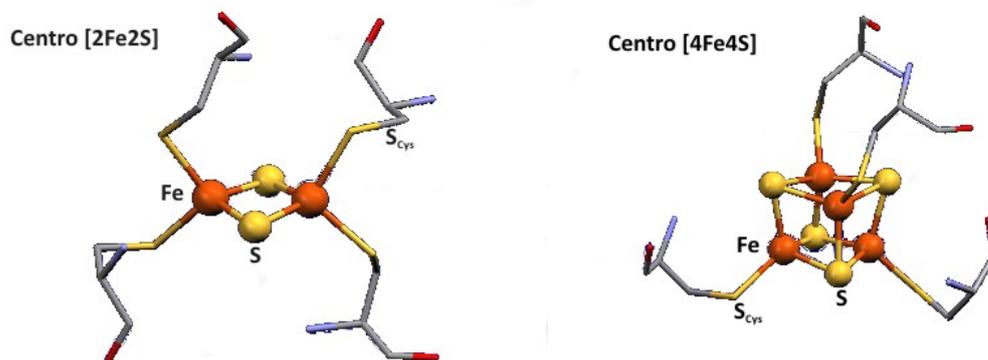


Figura III-2. Estructura de los centros FeS presentes en la cadena de transferencia electrónica en miembros de la familia de la XO. Los átomos de azufre que puentean los átomos de Fe corresponden a S inorgánico mientras que los restantes a S de la cadena lateral de Cys y cuyos arreglos en secuencia aminoacídica se hallan perfectamente conservados.

El sitio activo en las enzimas de la familia de la XO ha sido extensivamente caracterizado. Estudios en la XO mostraron que el átomo de Mo en su forma oxidada está en una configuración piramidal cuadrada distorsionada coordinando con dos átomos de azufre de una pironopterina, un ligando azufre, y un ligando OH/OH₂ (OH_x) en las posiciones ecuatoriales y un ligando oxo en la posición apical (Figura III-3A) (Hille, 2005; Brondino y col., 2006a). El ligando azufre es esencial para la catálisis y puede ser removido por tratamiento con cianuro para dar lugar a la forma desulfuro-inactiva de la enzima como se demostró en el caso de la XO (Coughlan y col., 1980; Malthouse y Bray, 1980) (Figura III-3B).

El ligando OH_x ocupa el sitio catalítico lábil en la proteína donde el sustrato y los inhibidores como el arsenito se unen al átomo de Mo (Figura III-3C) (Okamoto y col., 2004; Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007; Truglio y col., 2002).

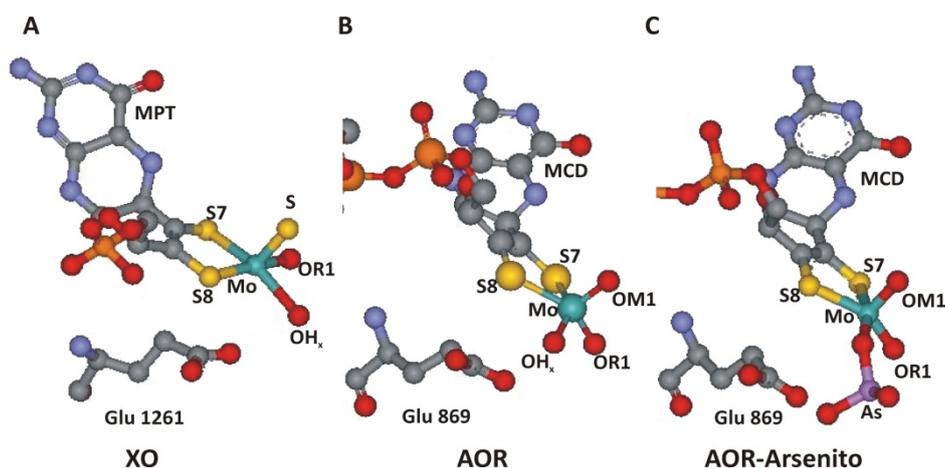


Figura III-3. Coordinación del átomo de molibdeno en el sitio activo de las enzimas de la familia de la XO. A) Forma activa XO (1FIQ.pdb). B) Forma desulfuro activa de *DgAOR* (1VLB.pdb). C) Estructura de la enzima *DgAOR* inhibida con arsenito (1SIJ.pdb). En la figura se indican los ligandos de la esfera de coordinación del átomo de Mo nombrados según se indica en los reportes de la estructuras cristalinas correspondientes. También se grafica el residuo de ácido glutámico que tendría implicancias en el mecanismo de reacción.

Los cofactores redox de la cadena de transferencia electrónica y el átomo de Mo del sitio activo pueden presentar diferentes estados de oxidación. Algunos de estos estados presentan propiedades paramagnéticas, lo que posibilita su estudio mediante la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE). En las siguientes secciones se expondrán los fundamentos básicos de la técnica y las propiedades de RPE relevantes de la enzima AOR que serán de utilidad a la hora de analizar los resultados obtenidos.

III.1.2. La técnica de la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE): fundamentos básicos.

La espectroscopía de RPE permite el estudio de especies paramagnéticas. Estas especies son centros atómicos o moleculares que poseen un momento magnético neto. Los centros paramagnéticos no son abundantes en la naturaleza, por lo que podría parecer que el uso de espectroscopía de RPE se encuentra restringido a un pequeño número de sistemas. Sin embargo, en sistemas biológicos estas especies juegan un importante rol a nivel estructural y funcional en un gran número de proteínas. Los centros paramagnéticos en proteínas pueden ser parte integral de la misma o producirse transientemente como intermediarios de reacción, los cuales se encuentran generalmente relacionados con los procesos de transferencia electrónica.

En sistemas biológicos, las especies paramagnéticas incluyen dos grandes grupos: radicales libres orgánicos y metales de transición, aunque también existen otros tipos. Los metales de transición son elementos en los que la capa electrónica d o f se encuentra incompleta. El o los electrones desapareados en estas capas electrónicas dan lugar al comportamiento paramagnético, por lo que cada configuración electrónica exhibe un comportamiento característico que depende también de las características del núcleo central. En el caso de las proteínas de la familia de la XO, las especies paramagnéticas son el átomo de Mo (V) y los centros [2Fe-2S], como se detallará en el apartado siguiente.

Al igual que los protones, los electrones tienen espín (S), el cual les otorga una propiedad magnética conocida como momento magnético (μ). El momento magnético hace que el electrón se comporte como una barra magnética. Cuando se lo somete al efecto de un campo magnético externo, los electrones pueden orientarse tanto en una dirección paralela como antiparalela a la dirección del campo magnético aplicado. Así, para un sistema con un único electrón desapareado ($S = 1/2$) éste puede adoptar los estados de espín electrónico $m_s = -1/2$ y $m_s = +1/2$ y aunque cada uno de estos estados presenta un momento magnético asociado, *a priori* no existen diferencias energéticas entre los mismos. Cuando se aplica un campo magnético externo cada estado reacciona de forma opuesta. Así, el momento magnético de estado $m_s = -1/2$ se alinea paralelamente con el campo externo estabilizándose, mientras que el estado $m_s = +1/2$ se alinea antiparalelamente desestabilizándose. En consecuencia, los estados se desdoblan en dos subniveles energéticos (Figura III-4).

La magnitud del desdoblamiento energético es proporcional al campo aplicado y se conoce como efecto Zeeman (Weil y col., 1995). En un experimento típico de RPE se irradia la muestra con una frecuencia determinada de microondas mientras se barre el campo magnético externo aplicado. Cuando el desdoblamiento energético entre los estados $m_s = -1/2$ y $m_s = +1/2$ es de la misma magnitud que la energía de la radiación utilizada, se satisface la condición de resonancia, la cual es registrada por el sistema de detección como una absorción de energía. En ausencia de otras interacciones, la única magnitud cuantificable a partir de un espectro de RPE es el factor g (Figura III-4). En el caso del electrón libre, g tiene un valor de 2,002319 pero el acoplamiento espín-órbita

provoca desviaciones a este valor que aportan información acerca del entorno del electrón en estudio.

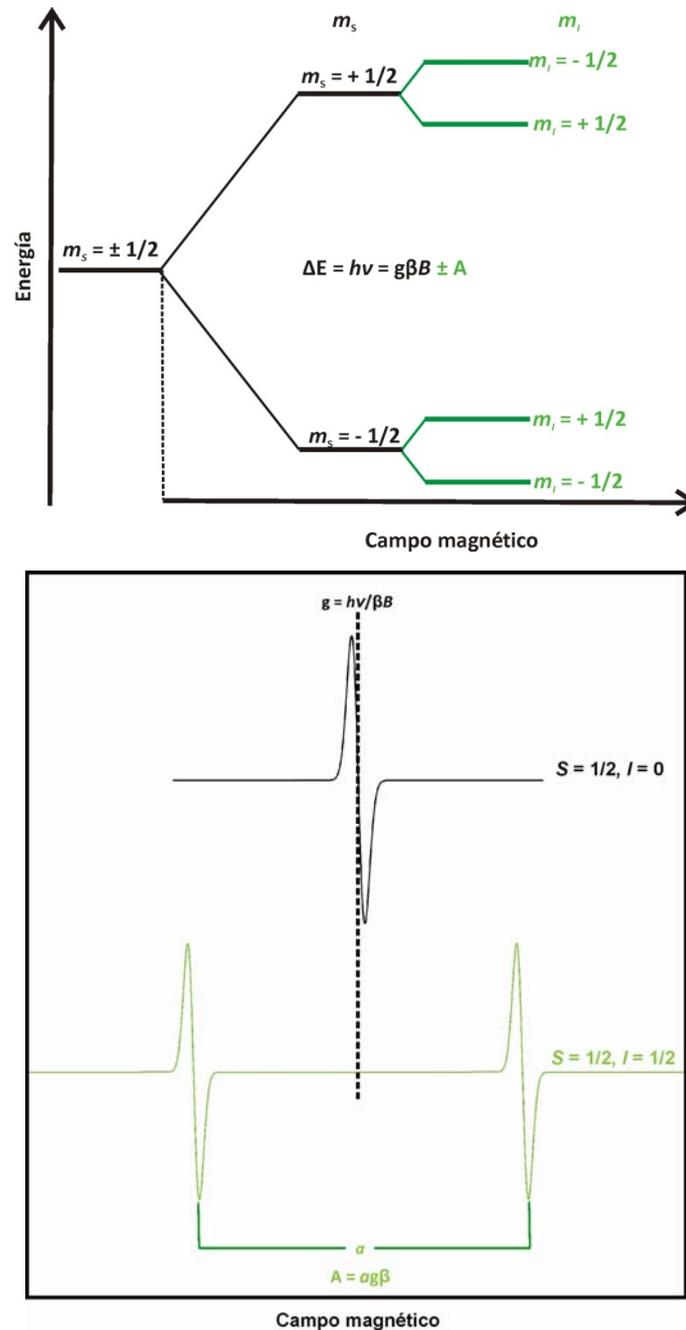


Figura III-4. Representación esquemática de las bases de la espectroscopía de RPE. Al colocar un $S = 1/2$ en un campo magnético externo variable se produce un desdoblamiento energético entre los estados $m_s = -1/2$ y $m_s = +1/2$ (arriba, en negro). Cuando la diferencia de energía entre estos estados iguala a la energía de la radiación utilizada se produce la transición, la cual se detecta como una línea de resonancia centrada en g (abajo, línea negra). La interacción con el momento magnético nuclear provoca el desdoblamiento de cada estado de espín electrónico en dos nuevos subniveles energéticos (arriba, en verde). Esta interacción se traduce en un desdoblamiento de la señal registrada en dos nuevas señales centradas en g y con una separación proporcional al desdoblamiento producido (abajo, en verde).

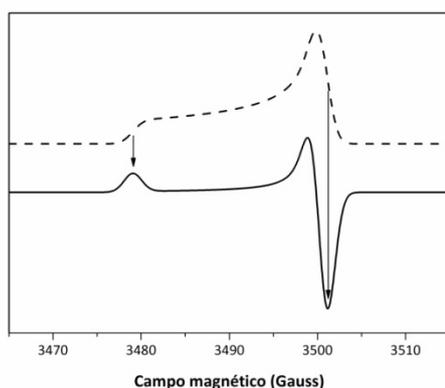
Además de interactuar con el campo magnético externo, el electrón desapareado puede interactuar con otras especies que presentan un momento magnético neto. Así, la presencia de núcleos con espín nuclear distinto de cero ($I \neq 0$) produce también un desdoblamiento energético de los estados de espín electrónico. Este desdoblamiento es conocido como acoplamiento hiperfino o superhiperfino dependiendo si es generado por el núcleo central o si se debe a un núcleo vecino (Weil y col., 1995). El grado de desdoblamiento provocado por el núcleo depende de su espín nuclear produciéndose $2I+1$ subniveles energéticos. Así un núcleo de espín nuclear $I = 1/2$ puede adoptar los estados $m_I = -1/2$ y $m_I = +1/2$, cada uno de los cuales presenta un momento magnético asociado. Al igual que si se tratara de un campo externo, el momento nuclear interactúa con el momento magnético electrónico desdoblado cada estado en dos nuevos subniveles energéticos (Figura III-4). El acoplamiento hiperfino se manifiesta espectralmente como un desdoblamiento de la señal de resonancia. La separación entre las dos nuevas señales es proporcional a la magnitud del acoplamiento hiperfino que es representado por el parámetro espectroscópico A (Figura III-4).

Los parámetros g (posición) y A (desdoblamiento hiperfino) pueden ser normalmente anisotrópicos, es decir sus valores dependen de la dirección del campo magnético respecto a los ejes moleculares (Weil y col., 1995).

Para la mayoría de los metales de transición, los electrones están ubicados principalmente en orbitales tipo d y entonces la anisotropía espectral puede ser importante. Un movimiento rápido en todas direcciones promediará la anisotropía y entonces se obtendrán espectros con parámetros isotrópicos. Sin embargo, en ausencia de rotaciones moleculares, como es el caso de las soluciones congeladas, la anisotropía no se promedia y se observarán espectros similares a los observados en el estado sólido.

La anisotropía en g se caracteriza por 3 valores principales, g_x , g_y y g_z , que son aquellos a lo largo de los ejes principales del grupo conteniendo el electrón desapareado (Weil y col., 1995). En simetría cúbica, los 3 ejes son equivalentes y entonces el valor de g será isotrópico ($g_x = g_y = g_z$) (Figura III-4B, espectro en negro). En el caso de simetría axial, como es el caso de muchos metales de transición, $g_x = g_y \neq g_z$.

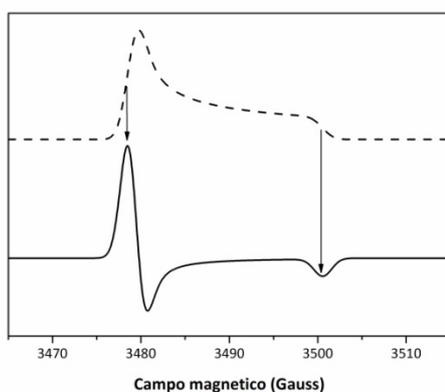
Por convención, g_z se define como el valor de g observado cuando el campo aplicado es paralelo al eje de simetría, y se lo denomina $g_{//}$ (Figura III-5).



Simetría axial

$$g_x = g_y = g_{\perp} \neq g_z = g_{//}$$

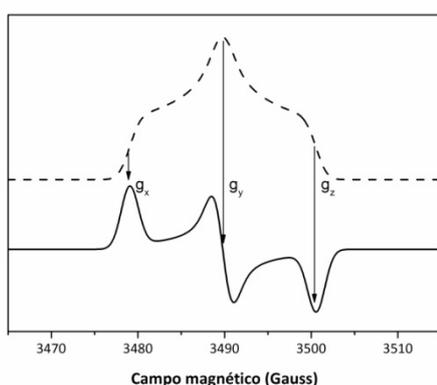
$$g_{//} > g_{\perp}$$



Simetría axial

$$g_x = g_y = g_{\perp} \neq g_z = g_{//}$$

$$g_{\perp} > g_{//}$$



Simetría rómbica

$$g_x \neq g_y \neq g_z$$

Figura III-5. Anisotropías del parámetro de posición g . En líneas punteadas se grafica la señal de absorción mientras que en línea llena su derivada (grafico típico de los espectros de RPE).

Similarmente, en el caso de simetría axial, g_x y g_y se designan como g_{\perp} , que es el valor de g obtenido cuando el campo aplicado es perpendicular al eje de simetría. En el caso de simetría rómbica, los 3 valores de g son diferentes ($g_x \neq g_y \neq g_z$) (Figura III-5). En un monocristal, los 3 valores principales de g pueden medirse cuando el campo se

aplica a lo largo de los 3 ejes principales de la molécula. Para orientaciones intermedias, los valores de g dependerán del ángulo que forme el campo magnético con los ejes principales moleculares.

Como se dijo anteriormente el desdoblamiento hiperfino también puede presentar anisotropías. La anisotropía en la interacción hiperfina A proviene de la interacción dipolar entre el espín electrónico y el espín nuclear (Weil y col., 1995). Las consideraciones que se aplican para los valores anisotrópicos de A son las mismas que para los valores de g . Por lo tanto la anisotropía en A se caracteriza por 3 valores principales: A_x , A_y , y A_z (Figura III-6). En simetría axial, $A_{//} = A_z$ y $A_{\perp} = A_x = A_y$. Una forma sencilla de ver el tipo de interacción hiperfina es ver la separación de los picos en los cuales se desdobra la línea de resonancia, si todos los desdoblamientos tienen la misma longitud, se dice isotrópica, de lo contrario la interacción hiperfina es anisotrópica.

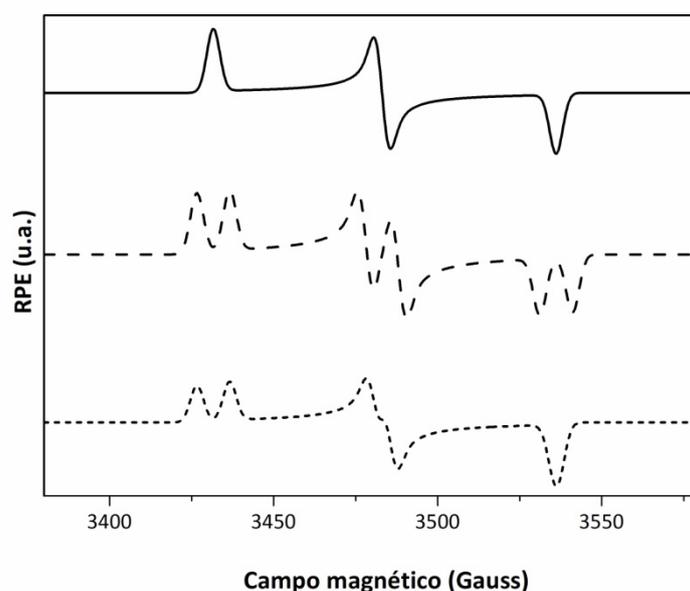


Figura III-6. Anisotropía del parámetro de interacción hiperfina (A). De arriba hacia abajo: señal de RPE sin interacción hiperfina, señal de RPE con interacción hiperfina isotrópica y señal de RPE con interacción hiperfina anisotrópica.

III.1.3. La técnica de RPE aplicada al estudio de los miembros de la familia de la XO.

En la Tabla III-1 se describen las configuraciones electrónicas y los estados de espín de los cofactores metálicos de AOR. El átomo de Mo en el rango de potenciales de $\sim +100$ mV (potencial vs *NHE*), potencial correspondiente de la proteína expuesta a

la atmósfera, y ~ -450 mV, potencial obtenido de la solución de enzima luego de reducción con ditionito de sodio en condiciones anaerobias, puede encontrarse en los estados redox (IV), (V) o (VI). De todos estos estados, la especie paramagnética corresponde a Mo (V) ($S = 1/2$). El átomo de Mo (IV) con un estado de espín $S = 1$, también podría ser estudiado por RPE, pero hasta el presente no se ha conseguido observar señales de RPE en este estado de oxidación.

Mo	[2Fe-2S]
Mo \rightarrow [Kr]4d ⁵ 5s ¹	Fe \rightarrow [Ar]3d ⁶ 4s ²
Mo (IV) \rightarrow [Kr]4d ² \rightarrow $S = 1$	Fe ³⁺ \rightarrow [Ar]3d ⁵ ; Fe ²⁺ \rightarrow [Ar]3d ⁶
Mo (V) \rightarrow [Kr]4d ¹ \rightarrow $S = 1/2$	Fe ³⁺ -Fe ³⁺ \rightarrow [2Fe-2S] ²⁺ \rightarrow $S = 0$
Mo (VI) \rightarrow [Kr]4d ⁰ \rightarrow $S = 0$	Fe ³⁺ -Fe ²⁺ \rightarrow [2Fe-2S] ⁺ \rightarrow $S = 1/2$

Tabla III-1. Estados de oxidación de los centros redox, configuraciones electrónicas y estados de espín.

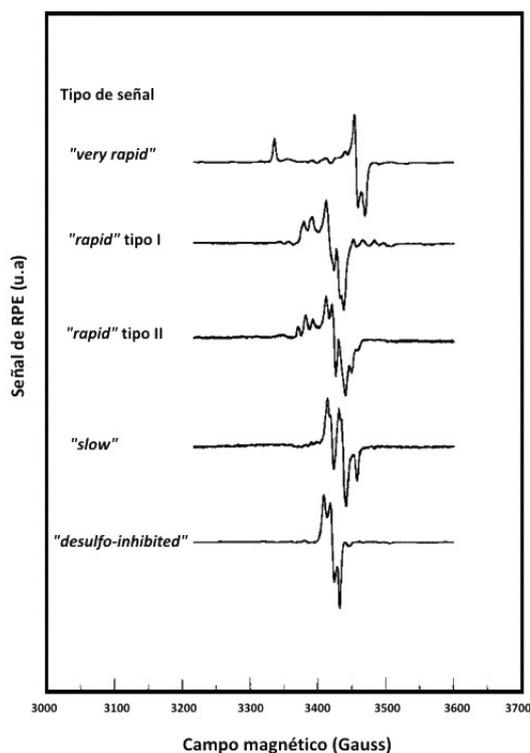


Figura III-7. Los diferentes tipos de señales de Mo (V) detectados mediante espectroscopía de RPE. (Hille, 1996).

En la figura III-7 se pueden observar diferentes señales de RPE con distintas simetrías y valores de g , lo que indica que el sitio de Mo (V) presenta una alta flexibilidad en su esfera de coordinación. Entre las señales más representativas pueden

distinguirse las señales llamadas “*very rapid*” ($g_{1,2,3} = 2,0252, 1,9550, 1,9494$) (Hille, 1996) y “*rapid*” (Hille, 1996), obtenidas a partir de la incubación de la enzima con el sustrato específico o con ditionito por períodos cortos de tiempo (10 s). La señal “*very rapid*” corresponde a un intermediario catalítico de la enzima. También se incluye en la Figura III-7 las señales denominadas “*slow*” y “*desulfo-inhibited*” que corresponden a formas inhibidas de la enzima. Como se observa en esta figura, en algunos casos es posible observar desdoblamiento adicional en la señal debido a que el espín del átomo Mo (V) puede presentar interacción hiperfina con los protones del solvente ($I = 1/2$) y resonancias de intensidad pequeña producida por acoplamiento hiperfino con los espines nucleares ($I = 5/2$) de los isótopos de ^{95}Mo (15,9 % de abundancia) y ^{97}Mo (9,6 % de abundancia). Si bien no se conocen todas las estructuras de los sitios de Mo que originan cada una de las señales presentadas en la Figura III-7, estudios realizados en muestras de XO han demostrado que las señales *rapid* y *very rapid* se asocian con un ligando S coordinado al átomo de Mo, mientras que las señales *slow* y *desulfo-inhibited* son obtenidas en formas desulfo de la enzima.

Otra característica de estas enzimas, es que los centros metálicos presentan distintos tiempos de relajación espín-red. Mientras que el Mo (V) presenta tiempos de relajación largos, es decir sus líneas de resonancia se pueden observar a temperatura relativamente alta (100-150 K), los centros FeS presentan tiempos de relajación más cortos que el Mo, lo que determina que las señales son detectadas a temperaturas por debajo de los 60 K.

La Figura III-8 muestra las señales de RPE asociadas con los centros FeS observados en proteínas de la familia de la XO (los espectros fueron obtenidos a partir de una muestra de proteína en la que el átomo de Mo presenta una señal tipo *slow*). Como se observa en esta figura, los espectros muestran dos señales rómbicas con valores de g diferentes y asociadas con centros con distintos tiempos de relajación. La señal denominada FeS1 corresponde al centro proximal al Mo y es detectada sin efectos de ensanchamiento por relajación a ~ 60 K. El espectro obtenido a 20 K muestra además de las señales de Mo y FeS1, la señal rómbica asociada al centro distal (FeS2). Es importante notar que a bajas temperaturas se pueden detectar desdoblamiento en las señales del Mo y FeS1. Mientras que el desdoblamiento en la señal del Mo se da por acoplamiento con FeS1, el desdoblamiento de FeS1 tiene origen

por acoplamiento con el centro FeS2. Todas estas características han sido motivo de distintos tipos de estudio (Moura y col., 1976; Hille, 1996; Andrade y col., 2000; Duarte y col., 2000; Thapper y col., 2006; Brondino y col., 2006b).

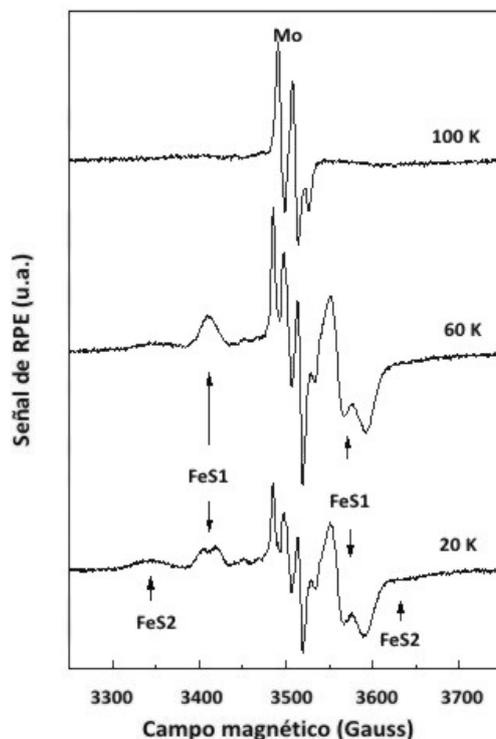


Figura III-8. Los diferentes tipos de señales de los centros [2Fe-2S] detectados mediante espectroscopía de RPE en muestras de AOR. En la figura puede observarse la señal de Mo (V) a 100 K, a medida que se baja la temperatura y por diferencias en los tiempos de relajación de los distintos centros redox, pueden observarse el centro FeS1 y el desdoblamiento que produce sobre las líneas de resonancia del Mo (V) a 60K. Si se baja aún más la temperatura, pueden observarse las líneas de resonancia del centro FeS distal FeS2 y el desdoblamiento que produce en las líneas de resonancia del centro FeS1. (Brondino y col., 2006b).

De este tipo de espectros pueden obtenerse datos relevantes acerca de la interacción entre los centros redox y del estado de la cadena de transferencia electrónica. Asimismo, el tratamiento de las muestras con agua deuterada permite observar la señal sin el acoplamiento hiperfino del átomo de Mo (V) con protones del solvente (Figura III-9).

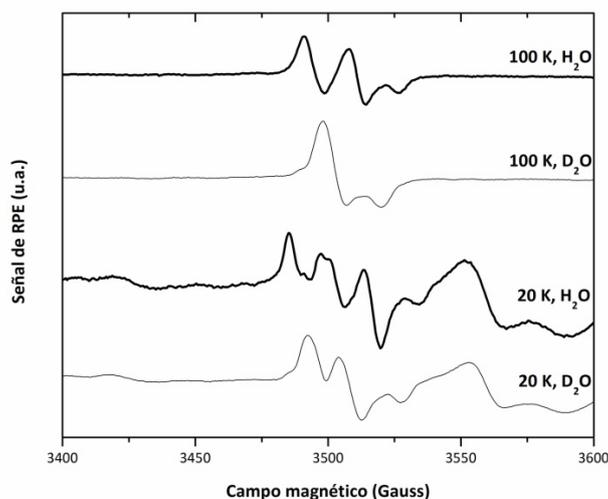


Figura III-9. Señal de RPE tipo *slow* de *DgAOR* de las muestras obtenidas en H_2O y en D_2O . La señal a 100 K muestra el acoplamiento hiperfino con un protón intercambiabile con el solvente, el que no se observa en la señal de la muestra en D_2O . La señal a 20 K muestra el desdoblamiento adicional de la señal de Mo (V) por acoplamiento magnético del átomo de Mo (V) con el centro FeS1.

III.1.4. Familia de la Xantina Oxidasa: mecanismo de reacción.

Comunmente, el mecanismo de reacción más aceptado implica un ataque nucleofílico base-asistido sobre el átomo de carbono a ser hidroxilado por el grupo OH_x y la transferencia concomitante de hidruro al ligando azufre. (Huber y col., 1996; Okamoto y col., 2004; Nishino y col., 2008; Pauff y col., 2008), donde el residuo Glu vecino actúa como base para el protón del ligando OH_x , incrementando su carácter nucleofílico. Las estructuras de los intermediarios más relevantes están expuestas en la Figura III-10A.

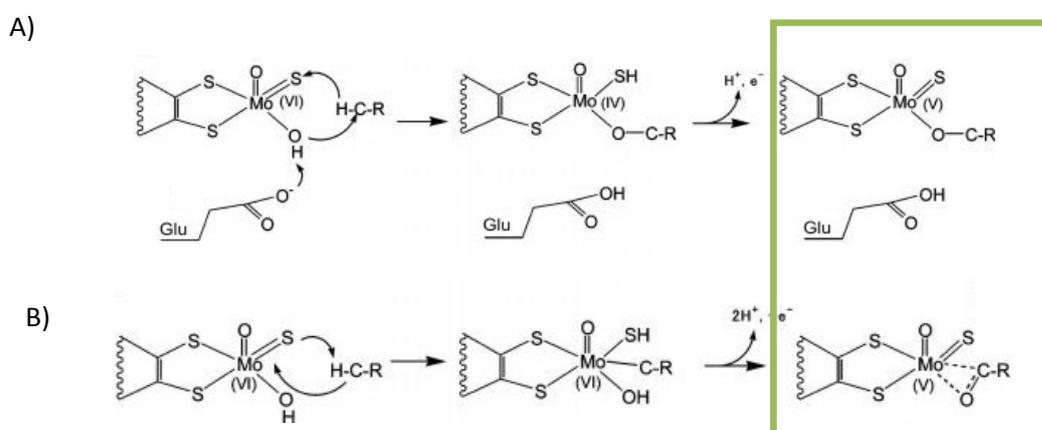


Figura III-10. Mecanismo sugerido para la interacción sustrato-sitio activo en las enzimas de la familia de la XO: A) Ataque nucleofílico asistido por base (Okamoto y col., 2004; Pauff y col., 2008). B) mecanismo de ataque electrofílico sugerido en base a estudios de *ENDOR* (Howes y col., 1996). En la figura se encuentran enmarcadas las especies “*very rapid*”.

Howes y colaboradores han propuesto un mecanismo bastante diferente a partir de estudios de *ENDOR* (del inglés *Electron-Nuclear Double Resonance*) en el intermediario catalítico paramagnético llamado “*very rapid*” (Figura III-10B) (Howes y col., 1996). Este involucra la adición del grupo CH del sustrato a través del enlace Mo=S, una reacción con precedentes químicos (Coucouvani y col., 1991), y una abstracción simultánea del protón por el ligando azufre. Se propuso que esta reacción se inicia mediante un ataque electrofílico del Mo al átomo C del sustrato y el ataque al ligando OH_x para dar el producto de la reacción (grupo C=O) en coordinación “*side on*” al Mo en un motivo η². Esta propuesta fue luego criticada por Manikandan y col., cuyo análisis de *ENDOR* no sustenta la existencia de un enlace directo Mo-C en las especies *very rapid* y por lo tanto favorece el primer mecanismo (Manikandan y col., 2001).

III.1.5. Aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* y la problemática del ligando azufre.

Las AORs derivadas de BRS son miembros de la familia de la XO que catalizan la oxidación de aldehídos a sus respectivos ácidos carboxílicos involucrando 2 e⁻ en la reacción (Figura III-11).

La estructura de *DgAOR* fue la primer estructura cristalográfica reportada para un miembro de esta familia (Figura III-8) (Romão y col., 1995) y la primera en ser estructuralmente caracterizada a niveles cercanos a la resolución atómica (1,28 Å) (el término estructura nativa se usará para referir a esta estructura) (Rebelo y col., 2001).

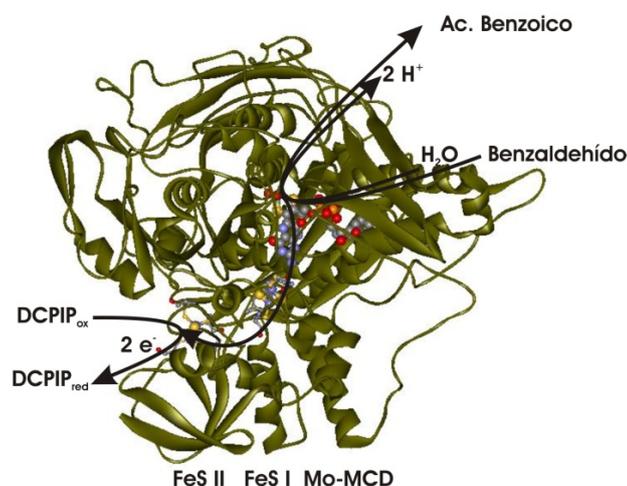


Figura III-11. Aldehído oxidoreductasa: implicancias catalíticas. El sustrato sufre hidroxilación oxidativa y deriva en el respectivo ácido carboxílico, cediendo 2 e⁻ que son transferidos a través de los centros FeS I y FeS II al mediador fisiológico. Figura realizada con 1VLB.pdb (Rebelo y col., 2001).

A diferencia de la xantina oxidorreductasa (Okamoto y col., 2004) y a la quinolona 2-oxidorreductasa (Bonin y col., 2004), no hay evidencia estructural que sustente la presencia de un ligando azufre coordinado al átomo Mo en las formas activas de las AORs derivadas de BRS. Sin embargo, su presencia se sugirió a partir de estudios espectroscópicos, principalmente RPE, puesto que *DgAOR* muestra las señales de RPE típicas de Mo (V) detectadas en la familia de enzimas de la XO. Las señales de RPE de Mo (V) del tipo “*rapid*” asociadas con la presencia del ligando azufre fueron observadas en AORs provenientes del género *Desulfovibrio* (Turner y col., 1987). Además, también se observaron las señales de RPE de Mo (V) asociadas con las formas desulfo de la XO, tales como la señal de tipo “*slow*” y la obtenida por adición de etilenglicol (EDO) (Turner y col., 1987; Andrade y col., 2000; Duarte y col., 2000; Thapper y col., 2006).

Sobre esta base se asumió que las AORs aisladas de BRS y las enzimas de la familia de la XO tenían un sitio activo similar y que ambas experimentarían los mismos cambios luego de reaccionar con sustratos, inhibidores y agentes reductores. Debido a que los datos estructurales de *DgAOR* no muestran el ligando azufre coordinado al átomo de Mo, se asumió que la enzima cristalizaba en la forma desulfo inactiva (Romão y col., 1995; Rebelo y col., 2001). Una conclusión similar se obtuvo para 4-HBCR, otro miembro de la familia de la XO para la cual los datos estructurales no mostraron evidencia del ligando azufre (Unciuleac y col., 2004), aunque su presencia se sugirió mediante estudios cinéticos y espectroscópicos. (Johannes y col., 2004). Estudios sobre las formas desulfo de distintos miembros de la familia de la XO mostraron que el ligando azufre cianolizable puede ser reinsertado con recuperación de actividad enzimática (Wahl y Rajagopalan, 1982). Una estructura cristalográfica de *DgAOR* resulfurada mostró que el ligando azufre puede ser introducido mediante *soaking* de los cristales nativos en una solución concentrada de iones sulfuro (Huber y col., 1996). Sin embargo, a diferencia de lo observado en xantina oxidorreductasa (Okamoto y col., 2004) y Q2-OR (Bonin y col., 2004), el ligando azufre se ubicó en la posición apical del sitio de Mo (Huber y col., 1996), sugiriendo que la inclusión del ligando azufre en *DgAOR* podría ser la consecuencia de una reacción inespecífica causada por las condiciones de resulfuración.

Como se reportó anteriormente, varios agentes inhibidores de las enzimas de la familia de la XO tales como arsenito, EDO y glicerol (GOL) interactúan directamente con el sitio activo de Mo para dar complejos con Mo (V) estables (Lowe y col., 1976; Boer y col., 2004; Thapper y col., 2006; Thapper y col., 2007). Estas formas inhibidas son importantes para entender los cambios en la coordinación del sitio activo y en la integridad de la cadena de transferencia electrónica en condiciones de inhibición. En estudios estructurales y de RPE previos de *DgAOR* inhibida con arsenito, se estableció una correlación entre las propiedades estructurales y de RPE del sitio de Mo (Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007). Los principales hallazgos de estos estudios fueron elucidar la interacción entre el inhibidor arsenito y el átomo de Mo y establecer que el ligando azufre no es esencial para determinar las propiedades de RPE del arsenito unido al centro de Mo. Particularmente, esto último originó algunas dudas acerca de la presencia del ligando azufre en *DgAOR* activa. No obstante, en todos los estudios con arsenito se vio que el ligando azufre no estaba presente, lo que dejó muchas dudas sobre el rol del S debido a que tanto las muestras de AOR como las de XO dan las mismas señales de RPE.

Esto fue lo que nos motivó a realizar nuevos estudios en la enzima *DgAOR* que se reportan en este capítulo de este trabajo de tesis y se comenzaron a repetir detalladamente los estudios comparativos en *DgAOR*, que en muchos casos no se habían hecho porque directamente se había asumido que era igual a la XO. En este capítulo de este trabajo reportamos estudios cinéticos, cristalográficos y de RPE de *DgAOR*. Los estudios cinéticos se realizaron en presencia de cianuro, EDO, GOL y arsenito, a fin de comparar el comportamiento de *DgAOR* y de XO frente a estos agentes inhibidores. Se realizaron estudios cristalográficos de rayos-X y de RPE de *DgAOR* inhibida con GOL y EDO para comprender el modo de la interacción de estas moléculas en la inhibición.

Como se verá más adelante, el análisis detallado de todos estos datos contribuyó a un mejor entendimiento de los mecanismos de interacción entre la enzima y los diferentes agentes inhibidores y a establecer si el ligando azufre está presente o no en la esfera de coordinación del átomo de Mo de *DgAOR*.

III.2 Materiales y Métodos

III.2.1 Purificación y cuantificación de *DgAOR*.

DgAOR se purificó según se describe en otros trabajos anteriores (Moura y col., 1976; Moura y col., 1978). La cuantificación de *DgAOR* se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) con BSA como estándar, o por determinación espectrofotométrica usando el coeficiente de extinción molar a 462 nm ($\epsilon = 24.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III.2.2 Estudios cinéticos.

Los estudios cinéticos de *DgAOR* se llevaron a cabo aeróbicamente a 310 K, midiendo la velocidad de reducción del mediador 2,6-diclorofenol-indofenol (*DCPIP*) a 600 nm ($\epsilon = 21000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en una celda de 1 cm de paso óptico. La mezcla de reacción presentó la siguiente composición: *buffer* 50 mM Tris-HCl (pH: 7.6), 35 μM *DCPIP*, 500 nM *DgAOR* y benzaldehído como sustrato. Se ensayaron concentraciones de benzaldehído de 5-200 μM y se determinaron las velocidades iniciales para la obtención de los parámetros cinéticos. En todos los ensayos el sustrato fue el último componente en ser agregado, luego de 5 min de equilibrado de la enzima con el aceptor de electrones. En estas condiciones experimentales, una unidad enzimática (UI) corresponde a 1 μmol de benzaldehído oxidado por min y la actividad enzimática específica es U/mg de enzima.

Se realizaron estudios de inhibición y diálisis frente a diferentes agentes inhibidores para evaluar la reversibilidad de la inhibición. Se incubaron muestras de *DgAOR* (30 μM) durante 2 h a temperatura ambiente con 50 mM KCN, 1 mM EDO y 1 mM GOL y 24 μM NaAsO_2 en *buffer* 100 mM Tris-HCl (pH: 7,6), respectivamente en experimentos independientes. A estas concentraciones de inhibidor y luego de 10 min, la inhibición es significativamente detectable. Luego de 2 h de incubación, el inhibidor se removió por diálisis en unidades de ultrafiltración (Centricom Ultra 30K) mediante cinco ciclos de dilución/concentración. La actividad se evaluó en presencia del inhibidor y luego de los ciclos de dilución-concentración. Como control se procesó una muestra de *DgAOR as-prepared*. El mismo procedimiento se aplicó a muestras de XO

de leche de vaca (SIGMA, ref. X45000) en presencia de KCN reemplazando el benzaldehído por xantina.

Los estudios cinéticos para evaluar el tipo de inhibición se realizaron conforme lo expresado para la caracterización de la enzima *as-prepared*. Las mezclas de reacción se realizaron como se mostró más arriba y la reacción se inició por adición simultánea del sustrato y el inhibidor. Los parámetros cinéticos se determinaron de acuerdo al método de *DLP* (Cornish-Bowden y Eisenthal, 1974; Eisenthal y Cornish-Bowden, 1974).

III.2.3 Preparación de las muestras para RPE.

Muestras inhibidas con EDO, GOL y KCN.

Se redujeron muestras de *DgAOR as-prepared* (200 μ M en *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6) durante 20 min en atmósfera de argón por adición de ditionito de sodio (en exceso molar de 50 veces) para obtener la señal “*slow*” (Moura y col., 1978). Luego, se agregó un gran exceso de inhibidor (1 M) a la muestra completamente reducida en atmósfera de argón. Finalmente, la muestra se incubó durante 4 h a 4 °C. Las muestras de *DgAOR* inhibidas con EDO y GOL se prepararon como se describe arriba usando *buffers* tanto en H₂O como en D₂O (el pD se corrigió usando una solución de DCl). La reoxidación de las muestras inhibidas se realizó por exposición al aire a 4 °C, hasta que no se observaron las señales de RPE de los clústeres [2Fe-2S] a bajas temperaturas.

También se incubaron muestras de *DgAOR as-prepared* (200 μ M en *buffer* 10 mM Tris-HCl pH: 7,6) con 10 mM KCN durante 10 min y luego se redujeron con ditionito de sodio durante 20 min a 4 °C. En un ensayo paralelo, una muestra de *DgAOR* que mostraba señal “*slow*” (preparada como se muestra más arriba) se le adicionó de KCN en la misma concentración.

Espectros de RPE y simulación.

Los espectros de RPE se adquirieron con un espectrómetro Bruker EMX equipado con una cavidad rectangular (modelo ER 4102ST) y un criostato de flujo continuo de helio Oxford Instruments. Los espectros se tomaron entre 20 y 140 K a 9.5

GHz. La potencia de microondas usada fue de 2 mW a temperaturas de 100 K o superiores y 0.06 mW para las inferiores a 100 K. La amplitud de modulación a 100 kHz fue de 2 G. Las simulaciones de los espectros de RPE se realizaron mediante el programa Win-EPR Simfonia.

III.2.4 Procedimientos de cristalización y *soaking*.

A continuación se describe el procedimiento llevado a cabo para la obtención de los cristales de *DgAOR* y el *soaking* con EDO y GOL. Este trabajo fue realizado en colaboración con el grupo de cristalografía de la Universidad Nova de Lisboa.

DgAOR se cristalizó como se describió anteriormente mediante el método *sitting-drop vapor-diffusion* (Romão y col., 1993). Las gotas de cristalización se prepararon por adición de 4 μ L de proteína (10 mg/mL) en buffer 10 mM Tris-HCl (pH: 7,6) a 2 μ L de solución de precipitación (30 % 2-propanol, 0,2 M $MgCl_2$, 0,2 M HEPES, pH: 7,6). Los cristales, de color rojo oscuro y en forma de rubí, se crecieron hasta un tamaño máximo de 0,3 x 0,2 x 0,2 mm en 2-3 semanas a 4 °C. A fin de estabilizar los cristales, se preparó una solución de mantenimiento (*buffer* HB1) conteniendo 30 % p/v PEG 4000, 30 % 2-propanol, 0,2 M $MgCl_2$ y 0,2 M *buffer* HEPES (pH: 7,6). Se adicionó lentamente HB1 a los cristales por al menos 48 h. Puesto que uno de los objetivos de este estudio era analizar la interacción de EDO y GOL con el sitio activo, el 2-propanol tenía que ser removido. De aquí, a que haya sido necesario preparar un segundo *buffer* de almacenamiento (HB2) sin 2-propanol, conteniendo 30 % p/v PEG 4000, 0,2 M $MgCl_2$ y 0,2 M *buffer* HEPES (pH: 7,6). HB2 se adicionó cuidadosamente a las gotas a fin de reemplazar la solución de precipitación y HB1. Luego de 3 días, los cristales se transfirieron a una nueva gota de HB2. Los cristales de *DgAOR* estabilizados y libres de 2-propanol se sometieron a un proceso de *soaking* en una tercera solución de almacenamiento conteniendo EDO (HB3EDO) o GOL (HB3GOL). HB3EDO se preparó con 30 % p/v PEG 4000, 0,2 M $MgCl_2$, 0,2 M *buffer* HEPES y 40 % p/v EDO, mientras que HB3GOL se preparó por adición de 50 % p/v GOL a HB2 hasta una concentración final de 10 % p/v. En ambos casos, los cristales se dejaron en estas soluciones durante 3-4 días y se congelaron rápidamente para la colección de datos.

III.2.5 Registro de datos, determinación de estructura y refinamiento.

A continuación se detallan los procedimientos empleados por el grupo de cristalografía para la obtención de las estructuras y el refinamiento pertinente. Se colectaron dos conjuntos de datos de los cristales congelados instantáneamente en un equipo ID14-3 del *European Synchrotron Radiation Facility (ESFR, Grenoble, Francia)*, uno para los cristales derivados del *soaking* en EDO (conjunto de datos EDO) y otro para los derivados del *soaking* en GOL (conjunto de datos GOL). Los cristales se difractaron en una resolución superior a 1.8 Å y se observó que corresponden al mismo grupo espacial que los cristales nativos, con constantes de celda similares. Se usaron MOSFLM (Leslie, 1992) y SCALA (Kabsch, 1988) de la suite CCP4 (*Collaborative Computational Project, Number 4*) para procesar los datos, los cuales se resumen en la Tabla III-2.

Cristal	EDO	GOL
Grupo espacial	$P6_122$	$P6_122$
Celda unidad (Å)	a, b = 142,80 c = 161,55	a, b = 142,56 c = 161,88
Parámetro de Mathews	2,43	2,43
Long. de onda (Å)	0,93100	0,93100
Nro. de reflexiones obs.	390564	402976
Nro. De reflexiones únicas	89511(45045)	101724(14763)
Límites de resolución	30,37-1,79 (1,89-1,79)	28,92-1,72 (1,81-1,72)
Calidad de completado (%)	98,4 (97,5)	99,2 (99,2)
Redundancia	4,4 (3,5)	4,0 (3,9)
Promedio $I/\sigma(I)$	16,7 (3,5)	10,7 (2,3)
R_{sym} (%)	6,2 (32,7)	8,6 (44,6)

Tabla III-2. Estadísticas de la recolección de datos. Los valores entre paréntesis corresponden a los datos en la capa más externa.

La determinación de la estructura se realizó mediante PHASER (Read, 2001), usando el modelo molecular obtenido a 1,28 Å de resolución (PDB código 1VBL) (Berman y col., 2000; Rebelo y col., 2001). Se aplicó un protocolo de modificación de densidad mediante DM (Cowtan y Zhang, 1999) logrando buenas fases iniciales. Las restricciones de refinamiento se realizaron con REFMAC 5.2 (Murshudov y col., 1997), y los ligandos del átomo de Mo no fueron incluidos en los ciclos iniciales. La identificación de los alcoholes EDO y GOL unidos al ión metálico en cada estructura se realizó por inspección de mapas de densidad electrónica usando COOT (Emsley y Cowtan, 2004) y por repetición de los ciclos de refinamiento. También se usó COOT para generar las moléculas de agua, la mayoría de ellas en correspondencia con el modelo estructural de 1VLB.

En los últimos estadios de refinamiento, se refinaron los factores de temperatura para los átomos de Mo, Fe y S (de los dos centros [2Fe-2S]), Cl y Mg de manera anisotrópica y, de manera isotrópica para el resto de los átomos estructurales de la proteína y átomos de las moléculas de solvente. En sendos conjuntos de datos, *R-work* y *R-free* convergen aproximadamente en un 15 % y un 19 % respectivamente y la validación geométrica se realizó mediante varios programas tales como PROTECHECK (Laskowski y col., 1993), STAN (Nayal y Di Cera, 1996) y MOLPROBITY (Davis y col., 2007). Los análisis de los gráficos de Ramachandran mostraron que un 99.3 % de los residuos proteicos se encuentran en las regiones más favorables o adicionalmente permitidas, mientras que sólo una pequeña fracción de residuos (0,7 %) están en regiones generosamente permitidas o no permitidas del gráfico. Las coordinaciones y las amplitudes del factor de estructura de las formas EDO- y GOL-inhibidas de *DgAOR* han sido depositadas en *Protein Data Bank* bajo los códigos de acceso 3FC4 y 3FAH, respectivamente.

III.3 Resultados

III.3.1 Estudios cinéticos.

III.3.1.1 Estudios cinéticos en *DgAOR as-prepared*.

La reacción de *DgAOR* con benzaldehído siguió una cinética de Michaelis-Menten con los siguientes parámetros cinéticos: $K_M = 9,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$, $V = 0,0337 \pm 0,0004 \mu\text{mol}/\text{min}$ y $k_{cat} = 1,12 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ (Figura III-12), como ha sido reportado anteriormente (Moura y col., 1976; Moura y col., 1978). Valores similares para el mismo sustrato han sido reportados para otras AORs derivadas de BRS (Andrade y col., 2000; Duarte y col., 2000; Thapper y col., 2006).

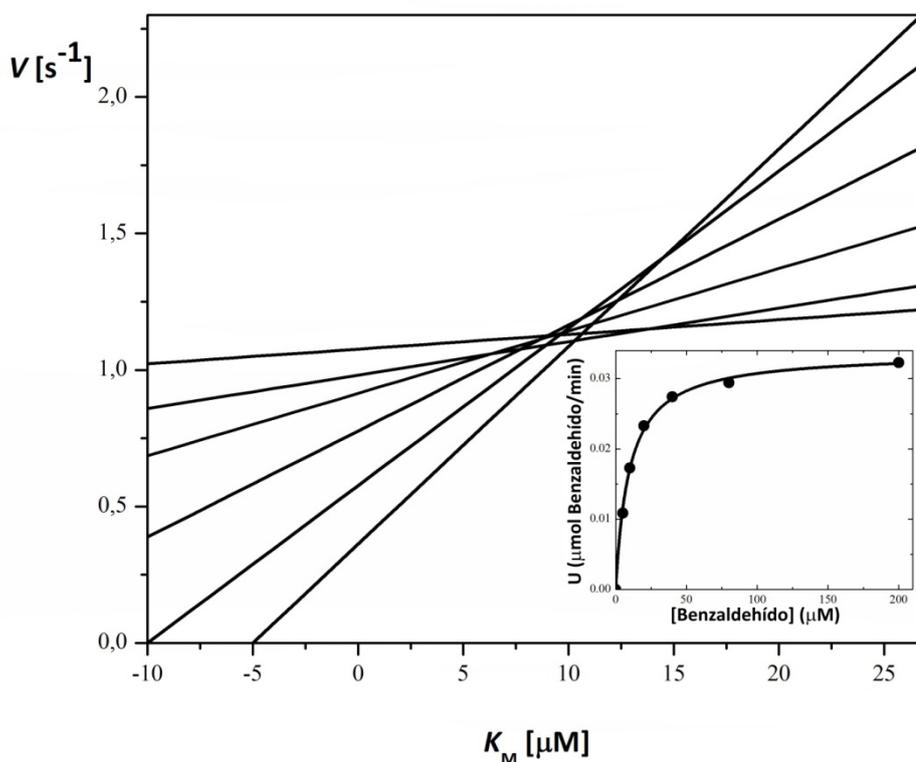


Figura III-12. Caracterización cinética de la enzima *DgAOR*. Gráfica de *DLP* para *DgAOR*. Insertado dentro de esta figura se encuentra el ajuste de los datos cinéticos de *DgAOR* al modelo de Michaelis-Menten.

III.3.1.2 Ensayos de reversibilidad de inhibición de *DgAOR*.

Los resultados de los estudios cinéticos de inhibición y diálisis para determinar la reversibilidad de la inhibición con EDO, GOL, KCN y NaAsO₂ se exponen en la Tabla III-3. En la segunda columna de la tabla, a la concentración de inhibidor indicada y luego de 10 min de incubación, se detallan los porcentajes de actividad remanente obtenidos para cada inhibidor. Es importante destacar que la concentración de KCN usada es ≈10 veces la concentración utilizada para producir la cianólisis del ligando azufre de la XO (Massey 1970), mientras que la concentración usada de NaAsO₂ es similar a la usada en XO (Hille, 1983; George y Bray 1983).

Inhibidor	Inhibición	Inhibición y diálisis
EDO (1 mM)	78,1 ± 0,4	98,8 ± 0,5
GOL (1 mM)	48 ± 3	94,0 ± 0,4
KCN (50 mM)	69,1 ± 0,1	99,5 ± 0,1
NaAsO ₂ (24 μM)	0	0

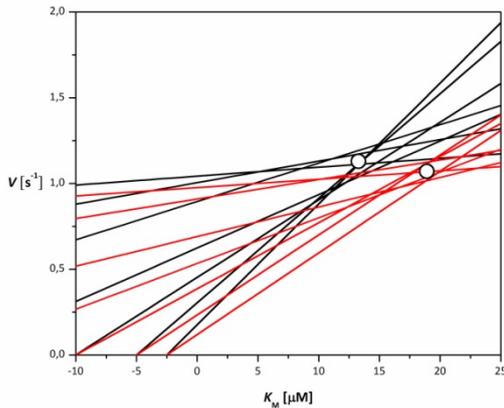
Tabla III-3. Estudios de inhibición y diálisis para evaluar la reversibilidad del proceso inhibitorio. En la tabla se indican los porcentajes de actividad remanente luego del ensayo respecto de un control. Las muestras se sometieron a inhibición como se indicó en materiales y métodos y luego se midió la actividad remanente (columna inhibición). *A posteriori* las muestras inhibidas fueron lavadas varias veces con *buffer* y se volvió a ensayar la actividad enzimática (columna inhibición y diálisis).

Luego de la diálisis del agente inhibidor mediante ciclos de lavado y concentración en unidades de ultrafiltración, la muestra inhibida con arsenito permanece inactiva, indicando la naturaleza irreversible de la inhibición. Por el contrario, la eliminación del agente inhibidor en los otros tres casos permite recuperar una actividad muy cercana a la del control (Tabla III-3, tercera columna), confirmando la reversibilidad del proceso inhibitorio frente a estos inhibidores.

Cuando se aplicó el mismo protocolo a la XO de leche bovina y KCN, no se observó recuperación de actividad alguna luego del proceso diálisis, lo cual confirma la eficiencia del método usado para testear la inactivación de *DgAOR*.

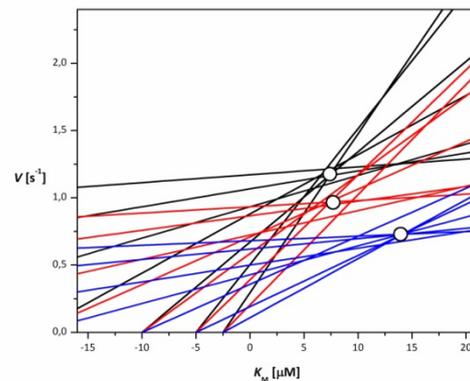
III.3.1.3 Estudios del tipo de inhibición por KCN, EDO y GOL en *DgAOR*.

Se evaluó el tipo de inhibición frente a los inhibidores reversibles. El cianuro efectivamente resultó ser un inhibidor competitivo (Figura III-13) con un $K_{iC} = 6,6$ mM. EDO por su parte se comportó como un inhibidor mixto (Figura III-13) con $K_{iC} = 1,9$ mM y $K_{iU} = 6,4$ mM. GOL mostró un patrón de inhibición competitivo con $K_{iC} = 26,8$ mM (Figura III-13).



Estudios cinéticos usando cianuro como inhibidor. En negro curvas control, en rojo curvas de ensayos llevados a cabo con 4 mM KCN. $K_{iC} = 6,6$ mM (3.9-13.7).

Estudios cinéticos usando EDO como inhibidor. En negro curvas control, en rojo curvas de ensayos llevados a cabo con 1 mM EDO y en azul curvas 4 mM EDO. $K_{iC} = 1,9$ mM (1,6-2,5) y $K_{iU} = 6,4$ mM (4,3-6,8).



Estudios cinéticos usando GOL como inhibidor. En negro curvas control, en rojo curvas de ensayos llevados a cabo con 20 mM GOL y en azul curvas 40 mM GOL. $K_{iC} = 26,8$ mM (25,8-36,7).

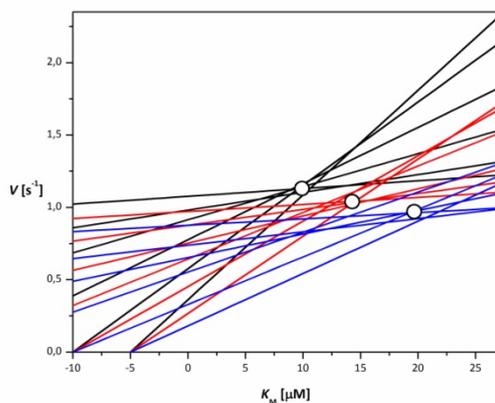


Figura III-13. Análisis del tipo de inhibición en *DgAOR*: gráficas de DLP.

Los resultados indicados muestran que los compuestos que inactivan irreversiblemente varias proteínas de la familia de la XO no tienen el mismo efecto sobre *DgAOR*.

III.3.1.3 Ensayos de actividad sobre muestras cristalizadas de *DgAOR*.

Para determinar si las formas desulfo cristalizadas de *DgAOR* eran activas frente al benzaldehído, se realizaron estudios cinéticos a partir de muestras obtenidas por disolución de los cristales. Así, una muestra de *DgAOR* con una actividad específica de 2,1 U/mg se cristalizó como se detalla en el apartado experimental. Una vez obtenidos los cristales, aproximadamente 40 de ellos se disolvieron en *buffer* 10 mM Tris-HCl (pH: 7,6) y se evaluó nuevamente la actividad enzimática. La actividad alcanzó un valor de 2,8 U/mg, el cual es ligeramente superior al de la muestra original debido a la mayor pureza en la muestra obtenida por cristalización. Esto demuestra que la forma cristalina de *DgAOR*, la cual no presenta el ligando azufre característico del sitio activo de XO (Rebelo y col., 2001), es catalíticamente competente.

III.3.2 Estudio de RPE de las formas inhibidas de *DgAOR* con EDO, GOL y KCN.

Los espectros de RPE de las muestras reducidas con ditionito tratadas con EDO o GOL muestran señales de RPE asociadas a los distintos cofactores metálicos de la enzima, los cuales pueden distinguirse mediante los distintos valores g y el comportamiento de relajación. Este mismo comportamiento es el que se mostró para proteínas de la familia de la XO, en el apartado de RPE de la introducción de este capítulo (Figura III-7 y Figura III-8). Los espectros tomados a 140 K se asocian con la especie Mo (V) (Figura III-14), mientras que los espectros tomados a temperaturas más bajas muestran las señales típicas asociadas con los centros [2Fe-2S] presentes en la estructura de *DgAOR*, además de las señales de Mo (V) (Bray y col., 1991).

Como puede observarse en la figura III-14, los espectros de las muestras tratadas con EDO y GOL y reducidas con ditionito muestran las líneas de resonancia correspondientes a los centros FeS sin cambio alguno mientras que las líneas de resonancia del Mo son diferentes a las observadas para Mo en la señal *slow*, lo que indica una distorsión importante en la esfera de coordinación del átomo de Mo.

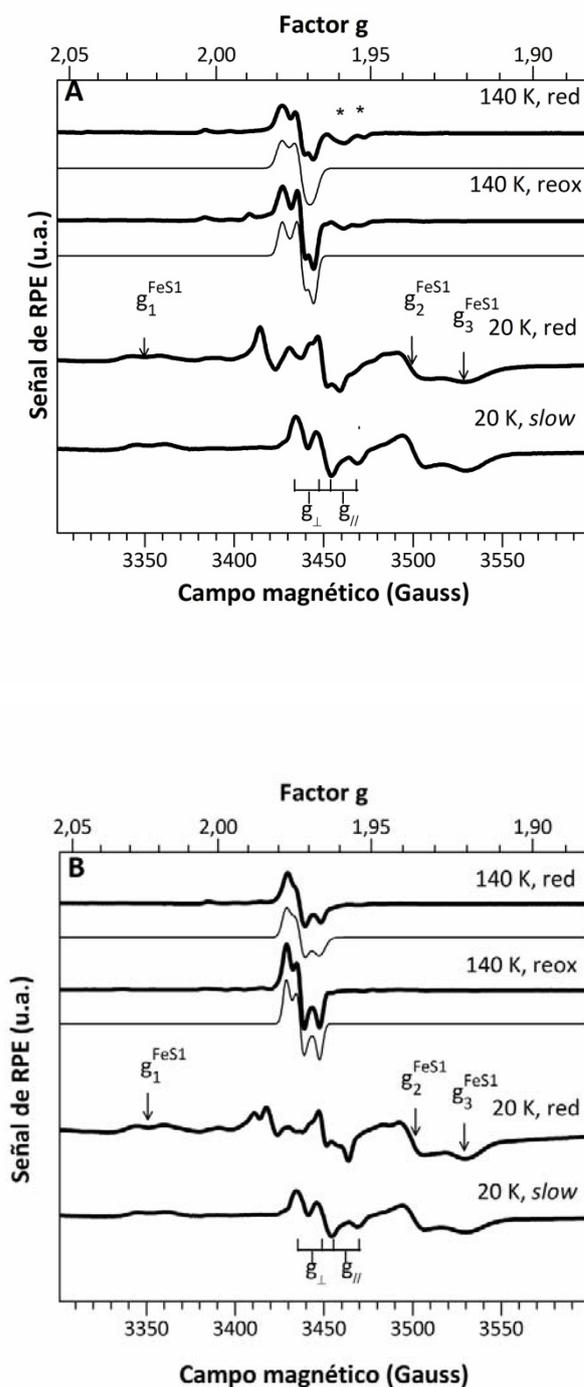


Figura III-14. A) Señales de RPE obtenidas después de la adición de EDO a una muestra de *DgAOR* reducida con ditionito (líneas gruesas) y las respectivas simulaciones (líneas finas). Los espectros nombrados con “red” corresponden a muestras incubadas 4 h en condiciones anaerobias, y los espectros denominados como “reox” se obtienen luego de la exposición al aire de muestras reducidas. Los asteriscos indican líneas de resonancia de la señal *slow*. **B)** Igual que EDO pero para GOL. Los tres valores de g para la señal de RPE del centro FeS1 se indican con flechas. El desdoblamiento de la señal de RPE de tipo *slow* obtenida en la muestra de *DgAOR* en D_2O se incluye para comparación ($g_1 \sim g_2 = g_{\perp} = 1,970$ y $g_{\parallel} = 1,959$). El desdoblamiento de g_{\perp} y g_{\parallel} se indica en la figura.

La Tabla III-4 muestra los valores de g obtenidos para el Mo (V) en los espectros de *DgAOR* tratada con EDO y GOL y reducidas con ditionito, y los correspondientes a muestras reoxidadas.

Señal	g_1	g_2	g_3
EDO, reducida	1,9785 (5,5)	1,9725 (5)	1,9681 (6)
EDO, reoxidada	1,9785 (4)	1,9725 (4)	1,9681 (4)
GOL, reducida	1,9774 (4)	1,9728 (4)	1,9665 (4)
GOL, reoxidada	1,9774 (4,5)	1,9728 (4,5)	1,9665 (4)

Tabla III-4. Parámetros de la señal de RPE del Mo (V) en muestras de *DgAOR* tratadas con polialcoholes. Entre paréntesis se indica el ancho de línea en Gauss.

Los espectros de RPE de las muestras de *DgAOR* inhibidas con cianuro no muestran diferencias sustanciales con aquellas obtenidas de las muestras *as-prepared* en condiciones experimentales similares. La reducción con ditionito de las muestras de *DgAOR* inhibidas con cianuro resulta en una mezcla de la señal *rapid* ($g_1 = 1,988$, $g_2 = 1,970$, $g_3 = 1,964$) y la señal *slow* justo después de la adición del agente reductor y solamente la señal *slow* luego de 20 min de incubación. La adición de cianuro a la muestra de *DgAOR* reducida con ditionito no modifica ni la forma de la línea, ni la intensidad de la señal *slow*. Esto indica que no se puede detectar la interacción enzima-inhibidor usando RPE en estas condiciones experimentales.

III.3.2.1 Ensayos de RPE sobre muestras tratadas con EDO y GOL: señal de RPE de centros [2Fe-2S].

El espectro a 20 K (Figura III-14) muestra las señales correspondientes a los centros FeS proximal (FeS1, $g_1 = 2,023$, $g_2 = 1,938$, $g_3 = 1,919$) y distal (FeS2, $g_1 = 2,060$, $g_2 = 1,9979$, $g_3 = 1,900$) además de las de Mo (V) presentes en la estructura de *DgAOR* (Romão y col., 1995). Estos espectros tienen valores g y dependencia de temperatura similar a aquellos observados en las muestras de *DgAOR* reducidas con ditionito y otras AORs derivadas de BRS, y muestran un desdoblamiento de g_1 asociada con el acoplamiento magnético entre FeS1 y FeS2 (g_1 de la señal de FeS1 muestra un desdoblamiento de ~ 16 G, ver Figura III-14) (Brondino y col., 2006a). Esto indica que ni

la estructura ni los caminos químicos que conectan los centros FeS son afectados por la inhibición.

III.3.2.2 Ensayos de RPE sobre muestras tratadas con EDO y GOL: señal de RPE de Mo (V).

Las señales de Mo (V) observadas en *DgAOR* tratada con EDO y GOL muestran una simetría rómbica con valores g similares (espectro a 140 K en Figura III-14, parámetros de RPE en Tabla III-4). Durante la incubación se observó una mezcla de la señal de tipo *slow* ($g_{1\sim 2} = g_{\perp} = 1,970$ y $g_{\parallel} = 1,959$) y la correspondiente a la señal de la muestra inhibida con cada polialcohol.

La exposición al aire de estas muestras da origen a señales de RPE con los mismos valores g pero con menores anchos de línea, indicando que las señales correspondiente a Mo (V) son estables en el rango $\sim +100$ mV (valor obtenido luego de la reoxidación en aire) y ~ -400 mV (valor obtenido para la muestra reducida con ditionito y adicionada del polialcohol). Los detalles menores observados en ambos espectros corresponden a la estructura hiperfina dada por el espín nuclear de los isótopos del átomo de Mo, ^{95}Mo y ^{97}Mo , ($I = 5/2$, abundancia natural de 15,9% y 9,6% respectivamente) y a un componente pequeño correspondiente a la señal *slow*, el cual se detectó solo en muestras tratadas con EDO.

El espectro obtenido en muestras en D_2O muestra valores similares de g a aquellos obtenidos H_2O y no presenta estructura hiperfina atribuible a protones intercambiables con el solvente. Se reportaron resultados similares para XO (Lowe y col., 1976).

El espectro a 20 K también muestra que la señal de Mo (V) sufre un desdoblamiento por interacción magnética con el centro FeS1, como usualmente se observa en proteínas pertenecientes a la familia de la XO. El desdoblamiento de la señal *slow* en AORs de BRS es aproximadamente isotrópica (~ 12 G, Figura III-8 y Figura III-9) (Brondino y col., 2006a). El desdoblamiento de la señal de Mo (V) de muestras inhibidas con polialcoholes es más anisotrópica (Figura III-14, espectro a 20 K) pero cuantitativamente se puede estimar que el acoplamiento isotrópico es ~ 2 veces más grande que la observada para la señal *slow* de ambas muestras inhibidas con polialcoholes. Los acoplamientos magnéticos entre dos centros paramagnéticos que

poseen diferentes tiempos de relajación muestran desdoblamientos (dependientes de temperatura) de las líneas de resonancia del centro que relaja más lentamente (Caldeira y col., 2000; More y col., 2005; Brondino y col., 2006b). En el caso de la señal *slow*, el desdoblamiento aproximadamente isotrópico está completamente promediado a cero a temperaturas ~ 100 K o superiores (el centro FeS1 relaja más rápido que Mo (V)) (Andrade y col., 2000; Duarte y col., 2000; Thapper y col., 2006). Este no es el caso de las señales de las muestras de *DgAOR* inhibidas con polialcoholes (Figura III-14) en las cuales queda demostrado que el mayor ancho de línea de las señales “red” respecto de las “reox” a 140 K se debe a un acoplamiento más grande entre Mo (V) y el centro FeS1.

En resumen, estos resultados muestran que la inhibición con polialcoholes afecta las señales respecto a las formas nativas, que se modifica la señal *slow* y que se afectan los acoplamientos entre el sitio de Mo (V) y el centro FeS1 porque el desdoblamiento es mayor.

III.3.3. Datos estructurales.

Las dos estructuras inhibidas con EDO y GOL de *DgAOR* resueltas son muy similares una a la otra, así como también a la estructura nativa (Romão y col., 1995; Rebelo y col., 2001) y aquella obtenida para la forma inhibida con arsenito (Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007).

Observando la estructura de la proteína, se encontraron pocas diferencias en las posiciones laterales de la cadena aminoacídica y conformaciones alternas. La diferencia principal entre las estructuras de las muestras de *DgAOR* tratadas con EDO y GOL respecto de la estructura nativa es la ausencia de 2-propanol (se halla reemplazada por una molécula de polialcohol) (Figura III-15). La ausencia de densidad electrónica para la molécula de 2-propanol prueba que el proceso de *soaking* para removerlo de la solución de cristalización fue exitoso. Examinando el sitio activo en detalle, es posible identificar el átomo de Mo coordinado a los átomos de azufre del enlace ditioleno del ligando pterina y a un grupo oxo (OR1) similar al de la estructura nativa, en los mapas experimentales $2F_0 - F_C$ de sendas estructuras inhibidas con polialcoholes (Tabla III-5 y Figura III-15).

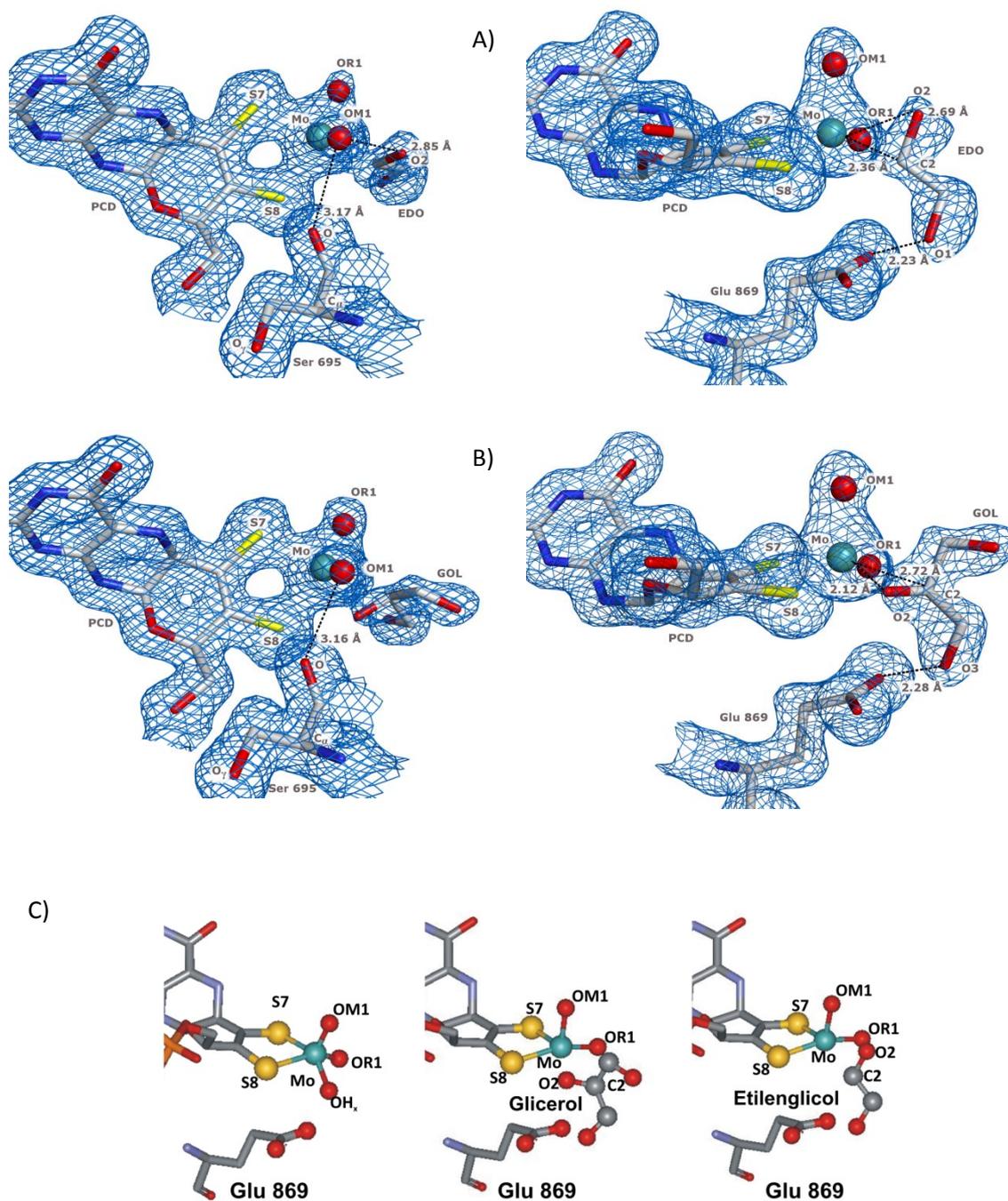


Figura III-15. Representación estructural del sitio activo de *DgAOR* (desde arriba y desde un lado) incubada con A) EDO y B) GOL. También se grafican los mapas de densidades electrónicas $2F_o - F_c$. EDO y GOL se hallan ocupando la posición de la molécula de OH_x lábil encontrado en la estructura nativa y las distancias entre el metal y los ligandos sugieren una coordinación directa. C) Esquema simplificado; los rótulos de los ligandos se nombraron según se reporta en las estructuras cristalinas. Las figuras se realizaron usando el software Pymol (Delano, 2002) y DS Visualizer Studio.

Un grupo hidroxilo (OM1) a 2,1 Å está reemplazando el ligando oxo apical encontrado en la estructura nativa. OM1 también establece un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del carbonilo de Ser695. Además, la distancia entre los

átomos de azufre del enlace ditioleno (3,07 Å y 3,06 Å para las estructuras de las muestras tratadas con EDO y GOL, respectivamente) también sugieren que el átomo de Mo está parcialmente reducido en ambas estructuras.

Esto se corresponde con lo que se ha descrito en los estudios con *DgAOR* oxidadas y reducidas (Huber y col., 1996), donde las distancias S–S fueron de 3,5 y 3,0 Å en las estructuras oxidadas y reducidas, respectivamente. En los mapas $2F_0 - F_C$ y en la región de la estructura donde se encuentra el ligando OH_x , también fue posible distinguir una región de densidad electrónica continua cercana al átomo metálico en ambas estructuras. Allí, una molécula de EDO y GOL pudieron ser modeladas en las estructuras respectivas. Las distancias entre el átomo metálico y los átomos vecinos pertenecientes a los dos inhibidores se describen en la tabla III-5 y sugieren con gran certeza una coordinación directa al átomo de Mo.

	EDO (1,79 Å) ^a	GOL (1,72 Å) ^a	Nativa (1,28 Å) ^a
Mo-OM1 ^b	2,08	2,08	1,74
Mo-OR1 ^b	1,75	1,75	1,79
Mo-S7 ^c	2,32	2,34	2,41
Mo-S8 ^c	2,39	2,41	2,49
Mo-O2 ^d	2,69	2,12	
Mo-C2 ^d	2,36	2,72	
Mo-OH _x			1,99

Tabla III-5. Distancias relevantes (en Å) del átomo de Mo y sus ligandos en las estructuras cristalinas de *DgAOR* nativa, inhibida con EDO e inhibida con GOL. ^a Resolución límite más alta de los datos de rayos-X. ^b OM1 y OR1 corresponden a los ligandos hidroxilo y oxo respectivamente, en las estructuras inhibidas con EDO y GOL y a ligandos oxo en la estructura nativa. ^c S7 y S8 son los átomos de azufre de la piranopterina. ^d O2 y C2 son el oxígeno y el carbono pertenecientes a la molécula de alcohol.

En la estructura de la muestra de *DgAOR* en EDO (Figura III-15A), tanto C2 como O2 están involucrados en la unión al metal a 2,4 y 2,7 Å del átomo de Mo, respectivamente. El grupo hidroxilo de EDO (O2H) está unido por puente de hidrógeno al ligando apical del centro metálico (OM1). Los átomos S7, S8 y OR1 del sitio de Mo y C2 del polialcohol están dispuestos coplanarmente. El enlace C2–O2H de la molécula

de EDO está aproximadamente perpendicular a este plano (los ángulos O2–C2–S7, O2–C2–S8 y O2–C2–OR1 son cercanos a 100°, 110° y 85°, respectivamente). El otro grupo hidroxilo (OH1) de EDO está unido por puente de hidrógeno al grupo carboxilato de Glu 869, que está altamente conservado y es relevante para la catálisis.

En la estructura de la muestra tratada con GOL se pueden hacer observaciones similares y en los mapas experimentales $2F_0 - F_C$, claramente se evidencia una densidad electrónica que se corresponde con la esperada para GOL (Figura III-15B). Sin embargo, el GOL se une de manera diferente al átomo metálico respecto de EDO. Los átomos C2 y O2 de GOL se sitúan a 2,7 y 2,1 Å del átomo de Mo, respectivamente. El átomo O2 coordina con el átomo de Mo en la posición ocupada por OH_x en la estructura nativa. Otra diferencia significativa entre las dos estructuras de las muestras inhibidas es la orientación del inhibidor en el sitio activo. El enlace C2–O2 del GOL está en el plano definido por los átomos S7, S8 y OR1 del sitio de Mo. La molécula de GOL está también involucrada en una red de puentes de hidrógeno. O2 está a 2,4 Å del grupo amino de la Gly697 (no mostrado), mientras que el O3 está unido por puente de hidrógeno al Glu869.

Una cadena interna de moléculas de agua presente en la estructura nativa de DgAOR (que se aloja en el canal que conduce al sitio activo) está unida por puentes de hidrógeno a la molécula de 2-propanol no ligada al sitio activo de Mo (Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007). Estas moléculas de agua también se observan en las dos estructuras, a la vez que ahora los puentes de hidrógeno se establecen con uno de los grupos hidroxilo de los inhibidores.

III.4 Discusión

III.4.1. Inhibición de *DgAOR* con KCN y la problemática del ligando azufre.

Los miembros de la familia de la XO son un grupo de proteínas estrechamente relacionadas y que muestran un alto grado de homología en las secuencias aminoacídicas, lo cual se refleja en sus estructuras generales, la coordinación alrededor del sitio activo metálico y sus propiedades de RPE (Hille, 2005; Brondino y col., 2006a). Sin embargo el hecho de que hayamos encontrado que el cianuro sea un inhibidor reversible de *DgAOR* constituye una diferencia marcada respecto de los otros miembros de la familia de la XO. Los resultados cinéticos obtenidos para las muestras tratadas con cianuro y las muestras preparadas a partir de los cristales, confirman que *DgAOR* no necesita el ligando azufre para la catálisis y de aquí a que la estructura cristalina nativa corresponda a la forma activa de la enzima reportada en trabajos anteriores (Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007). Esta conclusión ahora se refuerza por los datos reportados en las estructuras inhibidas (Boer y col., 2004; Thapper y col., 2007).

Las formas desulfo reducidas con ditionito de la XO de leche bovina luego de la incubación con EDO muestran la señal de RPE conocida como “*desulfo-inhibited*” (Lowe y col., 1976; Edmondson y D’Ardenne, 1989), similar a aquellas que observamos en las muestras de *DgAOR* tratadas con polialcoholes (Figura III-14). Esto indica que las especies de Mo (V) de *DgAOR* que dan estas señales también corresponden a formas desulfo. El hecho de que EDO y GOL sean inhibidores reversibles de *DgAOR*, tal como lo expusimos en el apartado de resultados, es una prueba adicional de que el ligando azufre no es esencial para la catálisis en esta enzima. Estos descubrimientos implican que el rol asignado al ligando azufre en el grupo de la XO, aceptando el ataque del átomo de hidrógeno al carbono del sustrato (tanto como hidruro o como un protón), debería ser llevado a cabo por otro ligando del átomo de Mo en *DgAOR*. Así, proponemos que el mejor candidato para esta función es el ligando oxo ecuatorial (OR1) de la enzima nativa. Esta hipótesis se basa en estudios de RPE de las muestras de *DgAOR* inhibida con arsenito, que mostraron que este grupo oxo es susceptible a protonación en condiciones reductoras (Thapper y col., 2007).

Los resultados cinéticos también muestran que el cianuro es un inhibidor competitivo de *DgAOR*. Los experimentos de RPE sobre muestras de *DgAOR* tratadas con cianuro no arrojan información relevante para la interacción proteína-inhibidor. Estudios de rayos-X sobre cristales de *DgAOR* tratados con cianuro serían necesarios para entender las bases moleculares de este proceso de inhibición, pero desafortunadamente, no se ha podido obtener un sistema adecuado para este estudio.

III.4.2. Análisis de los estudios cinéticos y cristalográficos de las muestras de *DgAOR* tratadas con EDO y GOL.

Los estudios cinéticos de estado estacionario de *DgAOR* realizados por nosotros muestran que GOL es un inhibidor competitivo mientras que EDO es un inhibidor mixto, aunque con un fuerte componente competitivo. Esto concuerda con las estructuras cristalinas obtenidas para las muestras tratadas con ambos inhibidores, las cuales muestran a los alcoholes covalentemente unidos al sitio activo.

Los resultados cristalográficos, muestran que ambas moléculas de polialcohol se unen al átomo de Mo distorsionando el sitio activo, lo que se corresponde con los resultados cinéticos y de RPE. Los resultados cinéticos indudablemente muestran que a altas concentraciones de polialcohol, los aductos Mo-polialcohol son más estables que la estructura piramidal cuadrada de la estructura nativa de *DgAOR*. Los estudios de rayos-X muestran que ambas moléculas de polialcohol están estabilizadas en sus respectivas posiciones por un puente de hidrógeno con el átomo de O del residuo Glu869 (ver Figura III-15). Un arreglo similar se observó para el motivo de arsenito en la estructura de *DgAOR* inhibida con arsenito y para los sustratos en proteínas muy emparentadas (Hille, 2006; Pauff y col., 2008). Pruebas adicionales de la estabilidad de los aductos Mo-polialcohol están dadas por el hecho de que las moléculas de inhibidor no pueden ser fácilmente removidas una vez que ingresan en el espacio del sitio activo, como lo indican los lavados extensivos necesarios para recuperar la actividad de la enzima. El hecho de que las señales de RPE obtenidas para ambos polialcoholes se desvíen considerablemente de la simetría axial asociada con los complejos de Mo (V) en coordinación piramidal cuadrada, indica la distorsión del sitio de Mo para ambas especies inhibidas de *DgAOR*. La especie paramagnética Mo (V) producida con EDO y GOL se obtiene a partir de una forma *DgAOR* reducida con ditionito seguida de la

adición del inhibidor. Por el contrario, las estructuras cristalinas reportadas se obtuvieron incubando cristales de la enzima *as-prepared* con el inhibidor, con lo que se asume que tiene un átomo de Mo en estado oxidado. Esto indica que tanto la forma oxidada de Mo (VI) como la reducida de Mo (IV) son capaces de reaccionar con la molécula de polialcohol, de manera similar a como ocurre con la inhibición por arsenito (Thapper y col., 2007).

Estudios de *ENDOR* de formas normales y deuteradas de XO inhibida con EDO detectan un acoplamiento hiperfino de 3,6 MHz (~1,2 G) que se asignó a los protones de los grupos CH₂, lo que confirma que EDO está coordinado al Mo en la especie activa en RPE (Edmondson y D'Ardenne, 1989). En base a estos resultados, se sugirió que el ion de Mo (V) está coordinado mediante ambos átomos de O de la molécula de alcohol. Si la especie activa en RPE presenta o no una estructura similar a aquella obtenida por rayos-X no puede confirmarse con los datos actuales. Una determinación estructural por rayos-X de las especies activas en RPE sería necesaria para resolver este punto, que es un trabajo que actualmente está en marcha.

III.4.3. Análisis de los estudios de RPE de las muestras de *DgAOR* tratadas con EDO y GOL: estado de la cadena de transferencia electrónica y del sitio activo de Mo.

Otra característica remarcable que observamos en las muestras de *DgAOR* inhibidas con EDO y GOL es un mayor acoplamiento magnético entre el FeS1 y Mo (V), cuando se las compara con la muestra *DgAOR* reducida con ditionito que presenta señal *slow*. El acoplamiento magnético entre dos centros paramagnéticos con $S = 1/2$ y con valores de g distintos puede ser producido por interacciones de intercambio, intercambio anisotrópico y antisimétrico e interacción dipolar (Bencini y Gatteschi, 1990). La primera interacción conduce a un desdoblamiento isotrópico de las líneas de resonancia cuando $|J| < \Delta g \beta B$, donde J es la constante de la interacción de intercambio, Δg es la diferencia entre los factores g efectivos de los centros interactuantes, β es el magnetón de Bohr y B es el campo magnético externo, mientras que las otras tres interacciones dan lugar a un desdoblamiento anisotrópico. Como se mencionó anteriormente para el caso de XO de leche bovina, (Lowe y col., 1976) la principal contribución al desdoblamiento de las señales de Mo (V) es isotrópica, indicando que la interacción por superintercambio a través de un camino químico es la

determinante. Como las estructuras inhibidas por EDO y GOL no muestran cambios respecto de la estructura nativa, ni en los caminos químicos que conectan FeS1 y Mo (V) ni en la orientación del centro FeS1, sugerimos que la única causa para un desdoblamiento mayor de la señal de RPE es una reorientación del orbital magnético de Mo (V) en las muestras inhibidas, a favor a la interacción magnética entre los centros.

La forma química de los ligandos alcohólicos en las estructuras de *DgAOR* inhibida con EDO y GOL puede sólo especularse por comparación con otras estructuras bien definidas. Los mapas de densidad electrónica sugieren un orbital de hibridación sp^3 sobre los átomos de C de GOL, pero no hay suficiente información para determinar el tipo de hibridación en los átomos de C de EDO. Para la estructura de *DgAOR* inhibida con GOL, la interacción con el átomo de Mo se da principalmente a través del átomo O2 de GOL. La distancia Mo–O2 de 2,1 Å está en el rango de lo que se ha descrito para enlaces Mo–O–R en complejos modelo (por ejemplo, $[\text{MoO}_2\{\text{O}_2\text{CC}(\text{S})\text{Ph}_2\}_2]^{2-}$, donde las distancias Mo–O son de 2,174 Å y 2,176 Å) (54). La distancia Mo–C2 de 2,7 Å es más grande que las distancias típicas Mo–C reportadas en complejos modelo (2,0–2,5 Å). Sin embargo, puede considerarse como un enlace débil.

III.4.4. Análisis de las muestras tratadas de *DgAOR* con EDO: evidencia de enlace Mo–C.

Una situación diferente a la de muestras tratadas con GOL puede observarse en la estructura de *DgAOR* inhibida con EDO, en la cual la densidad electrónica continua entre la proteína y el inhibidor sugiere fuertemente una unión directa Mo–C2, lo que constituye otro de los resultados novedosos encontrados en este trabajo, ya que por primera vez se observa una interacción organometálica Mo–C en un sistema biológico (Figura III-15C). Existen complejos organometálicos modelo de Mo que muestran distancias similares para este tipo de enlace (por ejemplo, 2,353 Å para $[\text{MoW}(\mu\text{-PPh}_2)\{\mu\text{-C}(\text{OH})\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{Me-4})\}-(\text{CO})(\eta^7\text{-C}_7\text{H}_7)(\eta^5\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})]$) (Brew y col., 1990) Los datos estructurales sugieren que la reacción entre el átomo Mo y EDO implican un proceso similar al propuesto en el mecanismo de reacción (ver introducción, Figura III-3), es decir, implicaría que uno de los átomos H unidos al átomo C2 se pierda una vez que haya ocurrido la inhibición. Sin embargo, la posibilidad de que la interacción Mo-EDO

esté mediada por una interacción agóstica (Brookhart y col., 2007) no puede excluirse, lo que implicaría una interacción tres centros-dos electrones Mo–H–C en la cual la densidad electrónica otorgada al átomo de Mo está dada por el enlace C–H. Como se mencionó anteriormente, la calidad de los mapas de densidad electrónica actuales no permiten una clara identificación de la forma química de la molécula de alcohol, y por lo tanto, estudios cristalográficos y/o espectroscópicos adicionales serían necesarios para determinar inequívocamente los modos de unión de EDO a *DgAOR*. De un modo interesante, la estructura del aducto Mo–EDO recuerda a la propuesta por Bray y Lowe para el intermediario paramagnético de la reacción con señal “*very rapid*” (Figura III-3B) (Howes y col., 1996). Aunque los datos actuales presentados no puedan ser tomados ni como una evidencia confirmativa de tales hipótesis ni como una evidencia contra un mecanismo de ataque nucleofílico asistido por base, sí confirman que los complejos que muestran interacción directa Mo–C pueden ser obtenidos bajo condiciones de inhibición reversible. En consecuencia, la formación de estructuras similares no puede descartarse como posibles intermediarios de la reacción.

III.5 Bibliografía

(1994) *The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Collaborative Computational Project Number 4.* Acta Crystallogr. Sect. D 50:760-763.

Andrade, S.L.; Brondino, C.D.; Feio, M.J.; Moura, I. y Moura, J.J. (2000) *Aldehyde oxidoreductase activity in Desulfovibrio alaskensis NCIMB 13491 RPE assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site.* Eur. J. Biochem. 267: 2054-2061.

Bauder, R.; Tshisuaka, B. y Lingens, F. (1990) *Quinoline oxidoreductase from Pseudomonas putida: a molybdenum-containing enzyme.* Biol. Chem. 371: 1137-1144.

Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N. y Burne, P.E. (2000) *The protein data bank.* Nucleic Acid Res. 28: 235-242.

Boer, D.R.; Thapper, A.; Brondino, C.D.; Moura, J.J. y Romão, M.J. (2004) *X-ray crystal structure and RPE spectra of "arsenite-inhibited" Desulfovibrio gigas aldehyde dehydrogenase: a member of the xanthine oxidase family.* J. Am. Chem. Soc. 126: 8614-8615.

Bonin, I.; Martins, B.M.; Purvanov, V.; Fetzner, S.; Huber, R. y Dobbek, H. (2004) *Active site geometry and substrate recognition of the molybdenum hydroxylase quinoline 2-oxidoreductase.* Structure 12: 1425-1435.

Boll, M. (2005) *Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalyzing Birch-like reductions.* Biochim. Biophys. Acta 1707: 34-50.

Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248-254.

Bray, R.C.; Turner, N.A.; LeGall, J.; Barata, B.A. y Moura, J.J. (1991) *Information from e.p.r. spectroscopy on the iron-sulphur centres of the iron-molybdenum protein (aldehyde oxidoreductase) of desulfovibrio gigas.* Biochem. J. 280: 817-820.

Brew, S.A.; Dossett, S.J.; Jeffery, J.C. y Stone, F.G.A. (1990) *Chemistry of polynuclear metal complexes with bridging carbene or carbyne ligands. Part 107. Reactions of diphenylphosphine with molybdenumtungsten dimetal complexes; crystal structures of [MoW(μ -PPh₂){ μ -C(OH)C(C₆H₄Me-4)}-(CO)(η^7 -C₇H₇)(η^5 -C₂B₉H₁₁)] and [MoW(μ -PPh₂)(CO)₃(η^5 -C₉H₇){ η^5 -C₂B₉H₈(CH₂C₆-H₄Me-4)Me₂}].* J. Chem. Soc. Dalton. Trans. 3709-3718.

Brondino, C.D.; Romão, M.J.; Moura, I. y Moura, J.J. (2006a) *Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family.* Curr. Opin. Chem. Biol. 10: 109-114.

Brondino, C.D.; Rivas, M.G.; Romão, M.J.; Moura, J.J. y Moura, I. (2006b) *Structural and electron paramagnetic resonance (RPE) studies of mononuclear molybdenum enzymes from sulfate reducing bacteria.* Acc. Chem. Res. 39: 788-796.

Brookhart, M.; Green, M.L. y Parkin, G. (2007) *Agostic interactions in transition metal compounds.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 6908-6914.

- Caldeira, J.; Belle, V.; Asso, M.; Giugliarelli, B.; Moura, I.; Moura, J.J. y Bertrand, P. (2000) *Analysis of the electron paramagnetic resonance properties of the $[2Fe-2S]^{1+}$ centers in molybdenum enzymes of xanthine oxidase family: assignments of signal I and II*. *Biochemistry* 39: 2700-2707.
- Cornish-Bowden, A. y Eisenthal, R. (1974) *Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods*. *Biochem. J.* 139: 721-730.
- Coucouvani, D.; Toupadakis, A.; Lane, J.D.; Koo, S.M.; Kim, C.G. y Hadjikyriacou, A. (1991) *Reactivity of the Mo(O)(S) functional group in the $[(L)Mo(O)(\mu-S)_2Mo(O)(S)]_n$ - dimeric thiomolybdate complexes, (L = C₅H₅⁻, n = 1; S₄²⁻, n = 2) and implications regarding the function of xanthine oxidase. Synthesis and structural characterization of $[(DMF)_3Mo(O)(\mu-S)_2Mo(O)(S_2)]$, $[Ph_4P][[(C_5H_5)Mo(O)(\mu-S)_2Mo(O)(S_2)]]$, $[Ph_4P]_2[(S_4)Mo(O)(\mu-S)_2Mo(O)(S)]$ and $(Et_4N)_4\{[(S_4)Mo(O)(\mu-S)_2Mo(O)(S)]_2\}$* . *J. Am. Chem. Soc.* 113: 5271-5282.
- Coughlan, M.P.; Johnson, J.L. y Rajagopalan, K.V. (1980) *Mechanism of inactivation of molybdoenzymes by cyanide*. *J. Biol. Chem.* 255: 2694-2699.
- Cowtan, K.D. y Zang, K.Y. (1999) *Density modification for macromolecular phase improvement*. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 245-270.
- Davis, I.W.; Leaver-Fay, A.; Chen, V.B.; Block, J.N.; Kapral, G.J; Wang, X.; Murray, L.W.; Arendall, W.B.; Snoeyink, J.; Richardson, J.S y Richardson, D.C. (2007) *MolProbity: all-atoms contact and structure validation for protein and nucleic acids*. *Nucleic Acid Res.* 35: 375-383.
- DeLano, W.L. (2002) *The PyMOL molecular graphics system*. Delano Scientific: San Carlos, CA.
- Dobbek, H.; Gremer, L.; Kiefersauer, R.; Huber, R. y Meyer, O. (2002) *Catalysis at a dinuclear $[CuSMo(=O)OH]$ cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 15971-15976.
- Duarte, R.O.; Archer, M.; Dias, J.M.; Bursakov, S.; Huber, R.; Moura, I.; Romão, M.J. y Moura, J.J. (2000) *Biochemical/spectroscopic characterization and preliminary X-ray analysis of a new aldehyde oxidoreductase isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 745-749.
- Edmondson, D.E. y D'Andenne, S.C. (1989) *Electron-nuclear double resonance spectroscopy of the desulfo-inhibited molybdenum (V) center in bovine milk xanthine oxidase*. *Biochemistry* 28: 5924-5930.
- Eisenthal, R. y Cornish-Bowden, A. (1974) *The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters*. *Biochem. J.* 139: 715-720.
- Emsley, P. y Cowtan, K. (2004) *Coot: model-building for molecular graphics*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 60: 2126-2132.
- Fetzner, S. (1998) *Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox condition*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 237-250.
- George, G.N. y Bray, R.C. (1983) *Reactions of arsenite ions with the molybdenum center of milk xanthine oxidase*. *Biochemistry* 22: 1013-1021.

-
- Hille, R. (1996) *The mononuclear molybdenum enzymes*. Chem. Rev. 96: 2757-2816.
- Hille, R. (2005) *Molybdenum containing hydroxylases*. Arch. Biochem. Biophys. 433:107-116.
- Hille, R.; Stewart, R.C.; Fee, J.A. y Massey, V.J. (1983) *The interaction of arsenite with xanthine oxidase*. J. Biol. Chem. 258: 4849-4856.
- Howes, B.D.; Bray, R.C; Richards, R.L; Turner, N.A.; Bennett, B. y Lowe, D.J. (1996) *Evidence favoring molybdenum-carbon bond formation in xanthine oxidase action: 17Q- and 13C-ENDOR and kinetic studies*. Biochemistry 35: 1432-1443.
- Huber, R.; Hof, P.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.; Moura, I.; LeGall, J.; Liu, M.Y.; Hille, R.; Archer, M. y Romão, M.J. (1996) *A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 8846-8851.
- Johannes, J.; Unciuleac, M.C.; Friedrich, T.; Warkentin, E.; Ermler, U. y Boll, M. (2008) *Inhibitors of the molybdenum cofactor containing 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase*. Biochemistry 47: 4964-4972.
- Kabsch, W. (1988) *Automatic indexing of rotation diffraction patterns*. J. Appl. Crystallogr. 21: 67-72.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. y Thornton, J.M. (1993) *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Crystallogr. 26: 283-291.
- Leslie, A.G.W. (1992) *En Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography No. 26*. Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Lowe, D.J.; Barber, M.J; Pawlik, R.T. y Bray, R.C. (1976) *A new non-functional form of milk xanthine oxidase containing stable quinquivalent molybdenum*. Biochem. J. 155: 81-85.
- Malthouse, J.P.G. y Bray, R.C. (1980) *The nature of the sulphur atom liberated from xanthine oxidase by cyanide. Evidence from EPR spectroscopy after ³⁵S substitution*. Biochem. J. 191: 265-267.
- Manikadan, P.; Choi, E.I.; Hille, R. y Hoffman, B.M. (2001) *35 GHz ENDOR Characterization of the "Very rapid" signal of xanthine oxidase reacted with 2-hydroxy-6-methylpurine (13C8): evidence against direct Mo-C8 interaction*. J. Am. Chem. Soc. 123: 2658-2663.
- Massey, V. y Edmonson, D. (1970) *On the inactivation of xanthine oxydase by cyanide*. J. Biol. Chem. 245: 6595-6598.
- More, C.; Asso, M.; Roger, G.; Guigarelli, B.; Caldeira, J.; Moura, J. y Bertrand, P. (2005) *Study of the spin-spin interactions between the metal centers of Desulfovibrio gigas aldehyde oxidoreductase: identification of the reducible sites of [2Fe-2S]¹⁺, ²⁺ clusters*. Biochemistry 44: 11628-11635.
- Moura, J.J.; Xavier, A.V.; Bruschi, M.; LeGall, J.; Hall, D.O. y Cammack, R. (1976) *A molybdenum-containing iron-sulphur protein from Desulphovibrio gigas*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: 782-789.
-

-
- Moura, J.J.; Xavier, A.V.; Cammack, R.; Hall, D.O.; Bruschi, M. y LeGall, J. (1978) *Oxidation-reduction studies of the Mo-(2Fe-2S) protein from Desulfovibrio gigas*. *Biochem. J.* 173: 419-425.
- Murshudov, G.N.; Vagin, A.A. y Dodson, E.J. (1997). *Acta Crystallogr. Sect. D* 53: 240-255.
- Nayal, M. y Di Cera, E. (1996) *Valence screening of water in protein crystal reveals potential Na⁺ binding site*. *J. Mol. Biol.* 256: 228-234.
- Nishino, T.; Okamoto, K., Eger, B.T.; Pai, E.F. y Nishino, T. (2008) *Mammalian xanthine oxidoreductase: mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine*. *FEBS J.* 275: 3278-3289.
- Okamoto, K.; Matsumoto, K; Hille, R.; Eger, B.T.; Pai, E.F. y Nishino, T. (2004) *The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7931-7936.
- Palanca, P.; Picher, T.; Sanz, V.; Gomez-Romero, P.; Llopis, E.; Domenech, A. y Cervill, A. (1990) Model compounds for the active sites of oxo-transfer molybdoenzymes. Synthesis, structural characterization, and electrochemical properties of [NH₄]₂[MoO₂{O₂CC(S)Ph₂}]₂. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 531-533.
- Pauff, J.M.; Zhang, J.; Bell, C.E. y Hille, R. (2008) *Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine*. *J. Biol. Chem.* 283: 4818-4824.
- Read, R.J. (2001) *Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 57: 1373-1382.
- Rebelo, J.M.; Dias, J.M; Huber, R.; Moura, J.J. y Romão, M.J. (2001) *Structural refinement of the aldehyde oxidoreductase from Desulfovibrio gigas (MOP) at 1.28 Å*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6: 791-800.
- Romão, M.J.; Archer, M.; Moura, J.J.; LeGall, J.; Engh, R.; Schneider, M.; Hof, P. y Huber, R. (1995) *Crystal structure of xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from D. gigas*. *Science* 270: 1170-1176.
- Romão, M.J.; Barata, B.A.; Archer, M; Lobeck, K.; Moura, I.; Carrondo, M.A.; LeGall, J.; Lottspeich, F.; Huber, R. y Moura, J.J. (1993) *Subunit composition, cryatallization and preliminary crystallographic studies of the Desulfovibrio gigas aldehyde oxidoreductase containing molybdenum and [2Fe-2S] centers*. *Eur. J. Biochem.* 215: 729-732.
- Romão, M.J.; Cunha, C.A.; Brondino, C.D. y Moura, J.J. (2002) *Molybdenum enzymes in reactions involving aldehydes and acids*. *Met. Ions Biol. Syst.* 39: 539-570.
- Thapper, A.; Boer, D.R.; Brondino, C.D.; Moura, J.J y Romão, M.J. (2007) *Correlating RPE and X-ray structural analysis of arsenite-inhibited forms of aldehyde oxidoreductase*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12: 353-366.
- Thapper, A.; Rivas, M.G.; Brondino, C.D; Ollivier, B.; Fauque, G.;Moura, I. y Moura, J.J. (2006) *Biochemical and spectroscopic characterization of an aldehyde oxidoreductase isolated from Desulfovibrio aminophilus*. *J. Inorg. Biochem.* 100: 44-50.
-

Truglio, J.J.; Theis, K.; Leimkuhler, S.; Rappa, R., Rajagopalan, K. y Kisher, C. (2002) *Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from Rhodobacter capsulatus*. Structure 10:115-125.

Turner, R.; Barata, B.; Bray, R.C.; Deistung, J.; LeGall, J. y Moura, J.J. (1987) *The molybdenum iron-sulphur protein from desulfovibrio gigas as a form of aldehyde oxidase*. Biochem. J. 243: 755-766.

Unciuleac, M.; Warkentin, E.; Page, C.C.; Boll, M. y Ermler, U. (2004) *Structure of a xanthine oxidase-related 4-hydroxybenzoil-CoA reductase with an additional [4Fe-4S] cluster and an inverted electron flow*. Structure 12: 2249-2256.

Wahl, R.C. y Rajagopalan, K.V. (1982) *Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of the molybdenum hydroxylases*. J. Biol. Chem. 257: 1354-1359.

Weil, J.A.; Bolton, J.R. y Wertz, J.E. (1995) *Electron paramagnetic resonance. Elementary theory and practical applications*. John Wiley and Sons Inc., New York, p 1-150.

Capítulo IV

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS



Conclusiones y Perspectivas Futuras

En este trabajo de tesis se presentan distintos estudios destinados a obtener y caracterizar enzimas mononucleares de molibdeno: nitrato reductasas de *Sinorhizobium meliloti* 2011 y aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas*, la primera de ellas involucrada en el metabolismo del nitrógeno y la segunda en el metabolismo anaeróbico de bacterias reductoras de sulfatos.

La primera parte del trabajo implicó la obtención, purificación y caracterización de enzimas derivadas de *S. meliloti* 2011. Para ello se debió poner a punto y optimizar técnicas de crecimiento del microorganismo y manejo de biorreactores, ensayos cinéticos, purificación de proteínas y su caracterización fisicoquímica básica. Por ello, uno de los principales logros de este trabajo de tesis además del avance en nuestro conocimiento del tema, es experimental ya que a partir de este trabajo se cuenta en la actualidad con un laboratorio de purificación y caracterización de metaloproteínas que no existía previamente, el cual tuvo que ser diseñado, montado y puesto en funcionamiento.

Se logró optimizar el crecimiento de *S. meliloti* 2011 para la producción de biomasa utilizando diferentes medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el cultivo en biorreactores operados en lote alimentado con glucosa, en medio LB modificado y en condiciones aeróbicas. Este método posibilita obtener grandes cantidades de biomasa en poco tiempo, lo que posibilita a futuro la producción de otras enzimas derivadas de este microorganismo.

Una vez optimizado el crecimiento del microorganismo se debió optimizar la inducción de las enzimas de interés mediante la utilización de diferentes inductores enzimáticos y condiciones experimentales. La inducción y producción óptima de NRs se logró en condiciones microaeróbicas mediante el agregado de nitrato y nitrito, a cultivos de *S. meliloti* 2011 crecidos a saturación en condiciones aeróbicas. Se obtuvo actividad NR tanto en membranas como en citoplasma, para lo cual fue necesario optimizar técnicas de extracción de proteínas de membrana mediante detergentes y su posterior purificación. Se evaluaron diversos tipos de cromatografía (intercambio iónico y tamiz molecular). Dado que no se consiguió purificar las proteínas mediante

las técnicas convencionales estándares en grado electroforético, se debió recurrir a la utilización de técnicas de purificación a partir de geles (electroelusión).

Dentro del primer objetivo de este trabajo, se logró aislar una nitrato reductasa de membrana (NR_m) con características novedosas. Esta es una proteína mononuclear de Mo asociada a membrana con funciones NR y distinta a NarGHI dado que en el genoma de *S. meliloti* no se reportan genes homólogos que codifiquen para este tipo de proteínas. La evaluación de las propiedades moleculares, cinéticas y de UV-vis permitieron concluir que es una proteína mononuclear de Mo y que presenta el cofactor molibdopterina guanina dinucleótido (MGD), típico de las proteínas de la familia de la DMSOR. El estudio con inhibidores de esta enzima indica que el perfil fisiológico de la misma está relacionado con mecanismos desasimilativos y de respiración de nitratos.

También dentro del primer objetivo, se logró purificar una enzima con actividad dual NR-NiR a partir de la fracción citoplasmática de *S. meliloti* 2011. Este tipo de comportamiento rara vez se observa en la naturaleza y es la primera vez que se reporta para rizobacterias. Los estudios moleculares, cinéticos y de UV-vis sugieren que es una proteína de Mo. Estudios adicionales deben realizarse para confirmar esta hipótesis.

Las dos enzimas NR parecen cumplir funciones dentro de un metabolismo desasimilativo, asociándose con perfiles respiratorios de nitratos dada su sensibilidad a agentes como clorato y resistencia a amonio, características que presentan las NaR. La actividad NiR de NR-NiR es resistente a amonio por lo que no cumpliría funciones primarias en metabolismos asimilativos.

Entre los resultados pendientes de los estudios realizados en esta primera parte restan la determinación certera del tamaño de las distintas subunidades que componen los complejos enzimáticos aislados, y una secuenciación del extremo N-terminal de cada una de las subunidades y/o secuenciación *de novo*, que permitan identificar los genes responsables de la actividad al utilizar el reporte del genoma completo de *S. meliloti*. Si bien estos estudios ya fueron comenzados, hasta ahora no se han obtenido resultados que permitan obtener conclusiones definitivas. Otro de los trabajos pendientes es una caracterización por RPE que hasta el momento no se ha

podido realizar por requerimiento de muestra, dada las dificultades para obtener las cantidades necesarias que requiere un estudio de este tipo.

La segunda parte de este trabajo se orientó a entender detalles finos estructurales del sitio activo de la enzima *DgAOR*. Para ello se combinaron estudios estructurales, cinéticos y de RPE. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo y que fueron publicados recientemente, han demostrado que propiedades que se consideraban generales para todos los miembros de la familia de la XO, no son válidas para esta enzima. Entre los mayores logros experimentales de esta parte hay que mencionar el método empleado para determinar reversibilidad de un inhibidor dado (método descrito en III-2.2). La combinación de esta metodología con estudios cinéticos estándares nos permitió determinar sin duda que inhibidores considerados inactivadores irreversibles de la XO como el cianuro inhiben reversiblemente a la enzima *DgAOR*. Los estudios de actividad desarrollados sobre muestras cristalinas demuestran que la enzima es activa en ausencia de un ligando azufre.

Estos dos resultados, la reversibilidad de la inhibición con cianuro y el hecho de que la muestra cristalina sea activa, confirman por primera vez que el ligando azufre no se encuentra presente en el sitio activo de Mo y por ende no es esencial para la catálisis, lo que determina que esta proteína pertenece a una subclase dentro de la familia de la XO.

Los resultados de RPE en muestras tratadas con polialcoholes, EDO y GOL, sugieren que el sitio piramidal cuadrado del Mo está altamente distorsionado en condiciones de inhibición. Esto produce un cambio en la estructura electrónica del sitio de Mo favoreciendo un acoplamiento magnético mayor con el centro FeS proximal (FeS1). Este resultado de RPE se correlaciona con los datos estructurales obtenidos por difracción de rayos-X a partir de muestras inhibidas con los polialcoholes, los que indican claramente que el sitio activo interactúa con las moléculas de ambos alcoholes. La interacción del átomo de Mo con la molécula de alcohol, que involucra la pérdida del ligando OH_x y la unión del alcohol al átomo de Mo en un motivo tipo η^2 , permite observar un enlace directo entre el átomo de Mo y uno de los átomos de C de la molécula de alcohol. Este hecho constituye también uno de los resultados novedosos de nuestro trabajo en *DgAOR*, ya que es la primera evidencia estructural que demuestra una unión del tipo Mo–C en sistemas biológicos.

El hecho de que el complejo enzima-álcohol muestre una interacción directa Mo–C en condiciones reversibles de inhibición sugiere que estructuras similares pueden presentarse como especies intermedias de la reacción enzimática. La confirmación de esta posibilidad es uno de los problemas a elucidar en el área de las molibdo proteínas.

En los últimos años, estudios de caracterización bioquímica, espectroscópica y estructural en muchas proteínas que contienen sitios activos mononucleares de Mo han permitido un gran avance en la comprensión de estos sistemas. No obstante, los resultados de esta tesis demuestran que el entendimiento de la naturaleza exacta de los procesos moleculares que ocurren durante la catálisis está lejos aún de ser elucidado completamente, y constituye uno de los principales desafíos a resolver en los próximos años.

