

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ENZIMAS
REDOX DE COBRE Y MOLIBDENO
ESTUDIADAS POR MÉTODOS
COMPUTACIONALES BASADOS EN
EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS Y
ESPECTROSCÓPICAS**

María Cecilia Gómez

Director de Tesis: Dr. Carlos D. Brondino

Co-director de Tesis: Dr. Sergio D. Dalosto

Lugar de realización: Departamento de Física – FBCB-UNL

-2019-

A mis hijos...

"La perseverancia es fallar diecinueve veces y triunfar la vigésima"

Julie Andrews

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al CONICET por financiar mis estudios de posgrado con el otorgamiento de una beca interna, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL) por admitirme como estudiante doctoral y darme el espacio físico para desarrollar mis estudios, así como por dictar varios de los cursos que realicé en este tiempo, y a INTEC e IFIS-CONICET por brindarme también un lugar físico durante los primeros años de mi doctorado. Quiero agradecer a mis directores Carlos Brondino y Sergio Dalosto por su tiempo dedicado a mi formación, por los consejos, enseñanzas, críticas y quizás algún elogio. Sin duda en lo personal también ha influido su presencia.

De más está decir que agradezco a mi familia, en especial a mis hijos y esposo, que han tenido que aceptar mi falta de tiempo para compartir con ellos durante lo dedicado a este proyecto. A los amigos de la vida, secundario, facultad, laboratorio, los del pueblo, Paraná y a los de mi querido barrio Santa María. Agradecer a mis compañeros de trabajo, por los mates, aún los de Julio, las charlas, el día a día, las cuidadas de los hijos, arimadas en auto, por prenderme las computadoras cuando no podía ir personalmente a trabajar, por los momentos de catarsis y de apoyo cuando esto parecía no tener fin, y por supuesto por las tortas. Un agradecimiento especial en recuerdo del tiempo y el cariño compartido con el tímido Hugo cuyo trabajo forma parte de esta investigación, pero que lamentablemente decidió partir tempranamente, sin llegar ver parte del fruto de su trabajo.

Por último, y no por eso menos importante, quiero darle las gracias a mis compañeros de docencia por ayudarme a crecer día a día, a Carlos por brindarme la oportunidad de incursionar en ese rol y a los alumnos por obligarme a ser mejor día a día. De manera especial agradecer a mi grupito de alumnas del 2016 que me acompañaron en un año tan importante para mi y con ellas a nuestro ángel de la guarda Dani que siempre estará presente.

Publicaciones

Parte de los resultados del presente trabajo de tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

- JC Cristaldi, MC Gómez, PJ González, FM Ferroni, SD Dalosto, AC Rizzi, MG Rivas, CD Brondino (2018) Study of the Cys-His bridge electron transfer pathway in a copper-containing nitrite reductase by site-directed mutagenesis, spectroscopic, and computational method *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862: 752–760.
- MC Gómez, NI Neuman, SD Dalosto, PJ González, JJG Moura, AC Rizz, CD Brondino (2015) Isotropic exchange interaction between Mo and the proximal FeS center in the xanthine oxidase family member aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* on native and polyalcohol inhibited samples: an EPR and QM/MM study *J Biol Inorg Chem* 20:233-242

Índice

Agradecimientos	3
Publicaciones	4
Índice	5
Abreviaturas y Símbolos	8
Resumen	10
Abstract	13
Introducción	16
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Capítulo 1: Proteínas mononucleares de molibdeno	21
1.1. Introducción	22
1.1.1. Molibdeno: Propiedades del elemento químico	22
1.1.2. El Mo en biología	22
1.1.3. La familia de la XO: aspectos generales de esta familia, características estructurales de la AOR y su comparación con otros miembros	24
1.1.4. Aspectos generales del mecanismo de reacción	28
1.1.5. Reacción Enzimática de la <i>DgAOR</i>	29
1.1.5.1. El mecanismo catalítico	29
1.1.5.2. Mecanismos de reacción propuestos para la XO evaluados por métodos computacionales a nivel QM	31
1.1.5.3. Mecanismo catalítico propuesto para los miembros de la XO por métodos computacionales utilizando la aproximación QM/MM	34
1.1.5.4. Mecanismo catalítico de la <i>DgAOR</i>	37
1.1.5.4.1. Diferencias con el mecanismo de la XO	37
1.1.6. La cadena de TE interproteína de <i>DgAOR</i> . Su caracterización mediante EPR	39
1.1.6.1. Los inhibidores de la <i>DgAOR</i>	40
1.1.6.2. EPR de la <i>DgAOR</i>	42
1.1.6.3. Análisis teórico (o simulación) de los espectros de EPR	45
1.1.6.4. Análisis de los cambios en J	46
1.2. Objetivos	47
1.3. Materiales y métodos	47
1.3.1. Estudio del mecanismo catalítico de <i>DgAOR</i>	47
1.3.2. Estudio del proceso de TE	50
1.4. Resultados y conclusiones	52
1.4.1. Estudio del mecanismo catalítico de <i>DgAOR</i>	52

1.4.2. Estudio del proceso de TE	56
1.4.2.1. Obtención de las estructuras optimizadas con Mo(VI) y Mo(V)	56
1.4.2.2. Cambios conformacionales en el camino químico Mo- FeS1 en condiciones de inhibición	58
1.4.2.3. Cambios en las densidades de espín en las formas inhibidas de AOR	58
1.4.3. Conclusiones	60
Capítulo 2: Proteínas mononucleares de cobre	62
2.1. Introducción	63
2.1.1. Cobre: Propiedades del elemento químico	64
2.1.2. El cobre en biología	65
2.1.3. Sitios de Cu en proteínas	66
2.1.4. La familia multicobre oxidasa. Nitrito reductasa de Cu y su comparación con otras enzimas relacionadas	68
2.1.4.1. La Familia multicobre oxidasa	68
2.1.4.2. Nitrito reductasas. Descripción estructural y funcional	69
2.1.5. CuNir como objeto de estudio del grupo de trabajo	72
2.2. Objetivos	74
2.3. Materiales y métodos	75
2.3.1. Obtención de estructuras	75
2.3.2. Interacción Nir/variante-NO ₂ ⁻	78
2.3.3. Interacción de intercambio T1-T2	78
2.4. Resultados y conclusiones	79
2.4.1. La estructura de la SmNir y sus variantes resuelta por Métodos computacionales	79
2.4.1.1. SmNir <i>wild-type</i>	79
2.4.1.2. H171D	82
2.4.1.3. C172D	84
2.4.2. Interacciones NO ₂ ⁻ -T2 e interacciones T1-T2	87
2.4.2.1. Interacción Nir/variante-NO ₂ ⁻	87
2.4.2.2. Interacción de intercambio T1-T2	90
2.4.3. Conclusiones	91
Conclusiones	93
ANEXO I: Fundamentos teóricos de los métodos computacionales empleados y de EPR	95
1. Métodos computacionales	95
1.1. Introducción	95
1.2. Mecánica clásica	96
1.2.1 Dinámica molecular	97
1.3. Mecánica Cuántica	98
1.3.1. Teoría del funcional de la densidad (DFT)	99
1.4. Métodos híbridos QM/MM	100
2. Introducción a la técnica de EPR	102

2.1. Interacción Zeeman	103
2.2. Interacción hiperfina	105
2.3. Anisotropía de los parámetros g y A	106
2.4. Procesos de relajación	108
2.5. La interacción de intercambio J y su relación con la velocidad de TE entre dos centros paramagnéticos	109
Anexo II: Recursos computacionales y experimentales	112
Bibliografía	115

Abreviaturas y Símbolos

A Parámetro hiperfino

AO Ascorbato oxidasa

AOR Aldehído oxidoreductasa

ASP Código de tres letras correspondiente al aminoácido ácido aspártico

AZ Azurina

B Campo magnético

CYS Código de tres letras correspondiente al aminoácido cisteína

ΔB_{pp} Ancho de línea pico a pico

ΔE Diferencia de energía

DFT Teoría del funcional de la densidad

Dg *Desulfovibrio gigas*

DMSOR Dimetil sulfóxido reductasa

EPR Acrónimo en inglés de Resonancia paramagnética electrónica (Electron Paramagnetic Resonance)

ET *electron transfer*

FAD Dinucleótido de flavina y adenina

g Tensor g

GLU Código de tres letras correspondiente al aminoácido ácido glutámico

GPU *Graphics processing unit*

h Constante de Planck

hCP Ceruloplasmina humana

HIS Código de tres letras correspondiente al aminoácido histidina

I Espín nuclear

λ Parámetro de energía de reordenación nuclear

k_{et} Velocidad de reacción

K_{ic} Constante de inhibición

MET Código de tres letras correspondiente al aminoácido metionina

MM Mecánica molecular

MoCo Cofactor de molibdeno

μ Momento magnético

μ_b Magnetón de Bohr

m_s Orientación del momento angular del espín

NiR Nitrito reductasa

NPT Ensemble isobárico
NVE Ensemble microcanónico
NVT Ensemble canónico
v Frecuencia fija de microondas
QM Mecánica cuántica
QM/MM Mecánica cuántica/Mecánica molecular
s espín
Sm *Sinorhizobium meliloti*
SO Sulfito oxidasa
t1 tiempo de relajación espn-red
T1 Centro de cobre de tipo T1
t2 tiempo de relajación espín-espín
T2 Centro de cobre de tipo T2
TE Transferencia electrónica
v Velocidad de relajación
wt *wild-type*
XO Xantino oxidasa

Resumen

Las metaloenzimas son proteínas que contienen en su estructura al menos un cofactor metálico esencial para su función y que resultan de gran importancia para los seres vivos al estar involucradas en diversos procesos biológicos. El molibdeno y el cobre son dos ejemplos de metales que se encuentran en sitios metálicos de proteínas biológicamente relevantes. El primero se encuentra mayormente en estructuras mononucleares de Mo acomplejado a un derivado orgánico llamado pterina. Las metaloenzimas que lo contienen suelen tener además cofactores adicionales por ejemplo de hierro-azufre (FeS), que participan en procesos de transferencia electrónica (TE). El cobre suele formar dos tipos diferentes de sitios metálicos denominados T1 y T2. Ejemplos de estas proteínas y que constituyen el tema de estudio en la presente tesis son la aldehído oxidoreductasa obtenida de la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*) y la nitrito reductasa de cobre del organismo desnitrificante *Sinorhizobium Meliloti* (*SmNir*).

La *DgAOR* cataliza la conversión de aldehídos a sus respectivos ácidos carboxílicos en una reacción redox que involucra 2 electrones. Es una molibdo-proteína homodimérica, cuyos monómeros son catalíticamente independientes. Cada monómero está formado por dos dominios. El de mayor tamaño incluye al sitio activo, sitio mononuclear de molibdeno acomplejado con un derivado de pterina, y el menor incluye dos centros de TE del tipo [2Fe-2S]. El sitio de Mo está coordinado a dos ligandos ecuatoriales provistos por los azufres de la pterina, un oxo ecuatorial que es exclusivo de esta proteína, ya que éste es reemplazado por un azufre en todas las otras proteínas relacionadas estrechamente a *DgAOR*, un grupo oxo apical y un sitio lábil catalítico OH_x , el cual es el sitio de interacción con el sustrato. La *DgAOR* fue la primer enzima mononuclear de Mo cuya estructura fue resuelta por rayos X y la primera en ser resuelta a una resolución de $\sim 1 \text{ \AA}$.

La *SmNir* participa en la vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno catalizando la conversión de NO_2^- a NO en una reacción redox que requiere un electrón. Es una proteína homotrimérica clasificada dentro de la subfamilia denominada "Nirs Verdes" que contiene dos tipos de cobre por monómero, un centro T1, que es un centro de TE, y un centro T2 que es el sitio activo de la enzima. Los dos centros de cobre están unidos por un puente CYS-HIS. El mecanismo de reacción aceptado para esta proteína implica la unión del NO_2^- al T2 y su reducción a NO. El electrón necesario para llevar a cabo esta reacción, el cual es provisto por una

pseudoazurina, es cedido al T2 a través del puente CYS-HIS. Existe un debate sobre si la TE se da a través del camino covalente puro que une T1-T2 o si dicha transferencia se realiza por el puente hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$ que “cortocircuita” el camino covalente CYS-HIS. Si bien no se conoce la estructura por rayos X de la *SmNir*, se supone que es similar a nitrito reductasas de cobre obtenidas de otras fuentes.

Esta tesis se encuadra en un proyecto de investigación en el que se persigue dilucidar el mecanismo de reacción de estas enzimas, así como entender aspectos estructurales y funcionales de sus centros metálicos mediante el uso de técnicas experimentales de biología molecular, cinéticas, espectroscópicas y estructurales, combinadas con técnicas computacionales. Las técnicas computacionales se usan para entender distintos aspectos estructurales/funcionales que no pueden ser resueltos experimentalmente y/o para racionalizar determinados resultados experimentales a nivel molecular. El objetivo del presente trabajo es estudiar distintos aspectos del mecanismo catalítico de la *DgAOR* y de la *SmNir* utilizando la metodología híbrida *Quantum Mechanics-Molecular Mechanics (QM/MM)*. La región del sitio activo y cofactores metálicos de interés de todos los sistemas estudiados son tratados a nivel QM, mientras que el resto de la proteína y las aguas de solvatación a nivel MM con el fin de no perder interacciones estéricas y coulómbicas con el entorno proteico. Los cálculos computacionales fueron realizados principalmente con los programas Gaussian y AMBER.

Se evaluó el mecanismo catalítico de la *DgAOR* sobre la base de una propuesta implementada para estudiar las propiedades catalíticas de la enzima xantino oxidasa, una enzima estrechamente relacionada con la *DgAOR*. El punto de partida fue obtener por métodos QM/MM la estructura de la *DgAOR*, lo cual mostró un muy buen acuerdo con los datos cristalográficos. Nuestro aporte al problema en cuestión fue evaluar mediante cálculos computacionales que la presencia de un O ecuatorial en la *DgAOR* no resulta en procesos catalíticos inviables, como si ocurre con la xantino oxidasa y otras proteínas de su familia. El modelo utilizado incluyó en la región cuántica átomos de residuos que forman la cavidad hidrofóbica dónde se lleva a cabo la reacción catalítica, constituyendo el modelo utilizado más completo a la fecha. Nuestros resultados muestran que la energética del proceso es favorable con un oxígeno en la posición ecuatorial, lo cual está en línea con los resultados experimentales. Otro logro importante de este trabajo fue obtener estructuras QM/MM de un intermediario catalítico, también obtenido experimentalmente, que permitió reinterpretar con un mejor ajuste la estructura de rayos X del mismo. También se estudió el proceso de TE Mo-FeS1, donde FeS1 es el centro de hierro-azufre próximo al Mo, estudiando los cambios en la densidad de espín en el cofactor de molibdeno. Estos estudios se hicieron para la forma *resting* de la enzima, la cual se asume es la que inicia el

ciclo catalítico, y en formas inhibidas con polialcoholes, las cuales modelan interacciones sitio activo-sustrato. Estos estudios se hicieron a partir de resultados de rayos X obtenidos previamente para estas formas de la enzima. Los resultados obtenidos se racionalizaron sobre la base de los valores obtenidos para la interacción de intercambio J Mo-FeS1 obtenidos experimentalmente, siendo J un parámetro proporcional a la velocidad de TE. El aumento de J de aproximadamente dos veces en condición de inhibición alcohólica, en conjunto con los resultados computacionales, sugieren que la TE es favorecida cuando el sustrato se une al sitio activo, facilitando así la reconversión de la enzima al estado *resting*. Adicionalmente, el estudio de las propiedades electrónicas del cofactor de pterina y sitio de Mo mostró que el efecto regulador de la TE sobre el camino químico Mo-FeS1 estaría gobernado por la presencia/ausencia del ligando lábil del Mo OH_x.

Cálculos computacionales de *SmNir* permitieron obtener las estructuras tridimensionales de las formas *wild type* y de las variantes H171D y C172D. H171D y C172D son dos variantes de la *SmNir* donde se permutaron los residuos CYS e HIS del puente CYS-HIS por ácido aspártico. Las estructuras cuaternarias obtenidas corresponden a trímero y en todas ellas se asumió la presencia de 2 Cu/monómero. Adicionalmente se obtuvo la estructura de una forma de C172D con un solo cobre por monómero en el T2 y las de *SmNir* y H171D con nitrito unido al T2. Las estructuras de H171D y C172D mostraron que los iones cobre se coordinaron a los sitios donde fueron realizadas las modificaciones y que los cambios estructurales sufridos se localizaron principalmente en dichos sitios. El puente de hidrógeno N^{δ1}H...O=C, propuesto como camino de TE en las Nirs verdes, se conservó en la estructura *wild type* y en la variante C172D, mientras que no se pudo formar en la variante H171D. Cabe mencionar que esta última demostró ser inactiva catalíticamente por métodos experimentales. La inactividad de H171D fue hipotéticamente atribuida a dos factores: la incapacidad del T2 modificado para unir nitrito, o a la no formación del puente N^{δ1}H...O=C. Los cálculos computacionales mostraron que el costo energético para remover el ligando apical agua del T2 en el estado *resting* de la *SmNir* y en H171D es muy similar, lo que sugiere que esa no es la causa de la falta de actividad de H171D, además de que el nitrito se une prácticamente de la misma manera al T2 en los dos casos. De los resultados obtenidos se infirió que la pérdida de actividad de H171D se debe probablemente a la pérdida del puente hidrógeno N^{δ1}H...O=C, hecho sobre el cual hay además fuertes evidencias experimentales.

Abstract

Metalloenzymes are proteins that contain in their structure at least one metallic cofactor which is essential for catalysis. They are very important in living organisms because they play key roles in many biological processes. Molybdenum and copper are two examples of metal ions found in metal sites of proteins with relevance in biology. The first one is mainly found in mononuclear Mo structures linked to an organic molecule called pterin. Metalloenzymes that contain this structure usually have also additional cofactors, for example iron-sulfur centers (FeS), which participate in electron transfer reactions (ET). Copper usually form two different types of metallic centers called T1 and T2. Representative examples of these proteins are the aldehyde oxidoreductase, from the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*), and the copper nitrite reductase, from the denitrifying organism *Sinorhizobium Meliloti* (*SmNir*). The characterization of some aspects of both proteins is the subject of this PhD thesis.

DgAOR catalyzes the conversion of aldehydes to the respective carboxylic acids in a two-electrons redox reaction. It is a homodimeric molybdoprotein in which monomers are catalytically independent. Each monomer is constituted by two domains. The biggest one contains the active site, a mononuclear molybdenum site linked to a pterin moiety, whereas the other has two ET centers of the [2Fe-2S] type. The Mo is bound to two equatorial ligands provided by the pterin moiety, to one equatorial oxo ligand that is found solely in this protein as this atom is replaced by a sulfur atom in closely related proteins, an apical oxo group and to a catalytic labile site named OH_x, which is the site for interaction with the substrate. *DgAOR* was the first mononuclear Mo-enzyme characterized by X-ray crystallography, and the first one whose structure was solved at a resolution of ~1 Å.

SmNir participates in the denitrifying way of the nitrogen cycle catalyzing the conversion of NO₂⁻ to NO in a one-electron redox reaction. It is a homotrimeric protein, that is classified in a green Nirs family, containing two copper centers in each monomer, an ET center of type T1, and a T2 center that is the active site of the enzyme. Both coppers centers are linked for a CYS-HIS bridge. The accepted reaction mechanism implies the bonding of NO₂⁻ to T2 and its reduction to NO. The necessary electron for this reaction, which is provided by a pseudoazurin, is given to T2 through the CYS-HIS bridge. There is a debate whether ET occurs through the pure covalent pathway that binds T1-T2, or through a mixed pathway that involves the N^{δ1}H...O=C hydrogen bridge that shortcuts the covalent CYS-HIS bridge. Although the X-ray structure of the *SmNir* is

unknown, it is supposed that its structure is quite similar to copper nitrite reductases found in other organisms.

This thesis is part of a research project that aims to elucidate the reaction mechanism of these enzymes, as well as to understand structural and functional aspects of their metal centers by means of molecular biology, kinetic, spectroscopic and structural experimental techniques, together with computational calculations. The last one is used to understand different structural/functional aspects that cannot experimentally be addressed and/or to rationalize experimental results at molecular level. The aim of this work is to study different aspects of *DgAOR* and *SmNir* catalytic mechanisms using the hybrid methodology Quantum Mechanics-Molecular Mechanics (QM/MM). The active site region and those of the metallic cofactors are performed at QM level. In order not to lose steric and coulombic interactions with the protein environment, the rest of the protein and the solvation waters are treated at MM level. Computational calculations were performed mainly with Gaussian and AMBER software.

DgAOR catalytic mechanism was evaluated on the basis of a proposal for study of the catalytic properties of the xanthine oxidase enzyme, a closely related protein with *DgAOR*. We firstly obtained the *DgAOR* structure by QM/MM, which showed a good agreement with crystallography data. Our contribution was to evaluate by computational calculations that the presence of an equatorial O ligand in *DgAOR* instead of a sulfido ligand does not result in a non-viable catalytic process, which happens with xanthine oxidase and other proteins belonging to its family. The used model included in the quantum region residue atoms that form the hydrophobic cavity where the catalytic reaction occurs, with this being the most complete model used until now. Our results show that the energetic of the process is favorable with an oxygen ligand in the equatorial position, which is in line with the experimental results. Another important achievement of this work was to obtain QM/MM structures of a catalytic intermediate, which was also obtained experimentally, that allowed us to reinterpret X-ray crystal data. Also, it was evaluated the ET process $Mo \rightarrow FeS1$, where FeS1 is the iron-sulfur proximal center to the Mo atom, studying the changes in the spin density on the molybdenum cofactor. These studies were performed on the resting state of *DgAOR*, which is assumed to initiate the catalytic cycle, and on inhibited states with polyalcohols, which model active site-substrate interactions. These studies were based on previous X-ray results of these inhibited forms of the enzyme. The results obtained were rationalized on the basis of the experimentally obtained values for the exchange interaction $J_{Mo-FeS1}$, with J being a parameter proportional to the ET rate. The ~2 times increase in J upon alcohol inhibition together with the computational results suggest that the ET is favored when the substrate is bound to the active site, facilitating the return at the resting

state of the enzyme. Additionally, the study of the Mo site electronic properties shows that the process that regulates the distribution of the unpaired spin density on the Mo(V) site is governed by the presence/absence of the equatorial OH_x ligand.

Computational calculations on *SmNir* allowed us to obtain the 3-D structures of the wild type form and the variants H171D and C172D. H171D and C172D are two *SmNir* variants where the HIS and CYS residues of the CYS-HIS bridge were changed to aspartic acid. The quaternary 3-D structures were obtained as dimer structures assuming 2 Cu/monomer. Additionally, it was obtained a C172D form with only one copper per monomer at T2 site, and those of *SmNir* and H171D with nitrite bound at T2. The H171D and C172D structures showed their copper sites coordinated to the inserted-ASP ligands, as well as to the rest of the unmodified copper ligands. The N^{δ1}H...O=C hydrogen bridge, which is proposed to be part of the ET pathway in green Nirs, was kept in the wild type and C172D structures, but lost in the H171D form. It is important to note that H171D was shown to be inactive by experimental methods. The inactivity of H171D was hypothetically attributed to two factors: the inability of the modified T2 to bind nitrite, or the loss of the N^{δ1}H...O=C bridge. Computational calculations suggest that the energetic cost to remove the water T2 apical ligand of the resting state *SmNir* and H171D is quite similar, and also that nitrite binds T2 in a similar way in both cases. Hence, our results strongly suggested that the loss of activity of H171D is likely due to the loss of the N^{δ1}H...O=C hydrogen bridge, a fact on which there is strong experimental evidence.

Introducción

La química bioinorgánica es una disciplina que estudia la función que cumplen *in vivo* diferentes elementos inorgánicos [1–3]. Surge de la unión de la biología y la química inorgánica, debido a la identificación de elementos inorgánicos que cumplen funciones importantes en sistemas vivos. Los metales de transición son algunos de estos elementos y su importancia radica en que forman parte de las proteínas, dando origen a lo que se denominan metaloproteínas. Los organismos vivos han ido evolucionando desarrollando mecanismos de transporte, incorporación, almacenamiento, regulación de las concentraciones y disponibilidad de los diferentes metales de transición biológicamente relevantes, entre los que se pueden distinguir Zn, Mn, Co, Fe, Mo, W, V, Ni y Cu [3].

Procesos como asimilación de nutrientes de los suelos, eliminación de elementos tóxicos del aire y de los suelos, generación de gases ambientales, respiración celular y fotosíntesis, entre otros, involucran una serie de ciclos biogeoquímicos que son esenciales para el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas. Los ciclos del nitrógeno, azufre y carbono son ejemplos de los anteriores y resultan de vital importancia para los seres vivos. Estos procesos son catalizados por metaloenzimas que contienen cofactores metálicos (centros de Mo, Fe, Cu o hemos) u orgánicos en su estructura, ya sea en el sitio activo o participando en procesos de TE, e involucran distintas reacciones de óxido-reducción (redox). Los mecanismos de reacción de dichas enzimas corresponden a un campo de investigación básica muy activo en un área de frontera entre la química bioinorgánica, la biofísicoquímica, la biofísica, la biología y la bioquímica [4–8]. El objetivo de las investigaciones es entender las bases moleculares de los distintos procesos que ocurren en estos ciclos y de sistemas que están acoplados a la generación de ATP, a fin de obtener información relevante para comprender la bioenergética celular o encontrar soluciones a problemas mundiales actuales del medio ambiente [4,9,10].

Si bien las estructuras de estas enzimas son diferentes, la mayoría presenta una organización y un mecanismo de reacción general esquematizado en la Fig. 1 [4,8,11,12]. Poseen un canal que va desde la superficie hacia el interior proteico a través del cual el sustrato ingresa para interactuar con el sitio activo (M) que está al final de dicho canal (M representa un sitio metálico). Este sitio activo está unido a una cadena de TE en la que intervienen otros cofactores redox (CR) que cumplen funciones específicas de TE. Entre los CR más encontrados en metaloenzimas están los centros Fe-S, centros de Cu tipo 1 y grupos hémicos, los cuales

participan, junto con el camino químico que une los distintos CR y el sitio activo, en procesos de TE desde o hacia el dador/aceptor externo de electrones. En otras palabras, la TE en la enzima se produce a través de un camino químico que involucra además de los cofactores redox mencionados residuos de la proteína, moléculas de agua y en algunos casos moléculas orgánicas extra proteína e involucra enlaces covalentes y/o no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

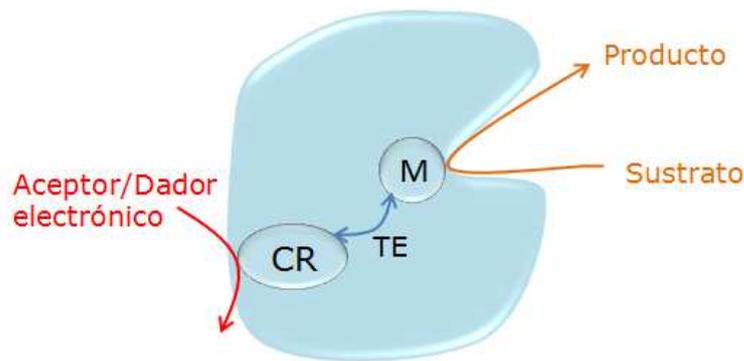


Fig. 1 - Esquema general de la estructura de metaloenzimas.

Las reacciones redox catalizadas por enzimas pueden ser reductivas u oxidativas, y en ambas necesariamente se produce la reducción de un agente y la oxidación de otro.

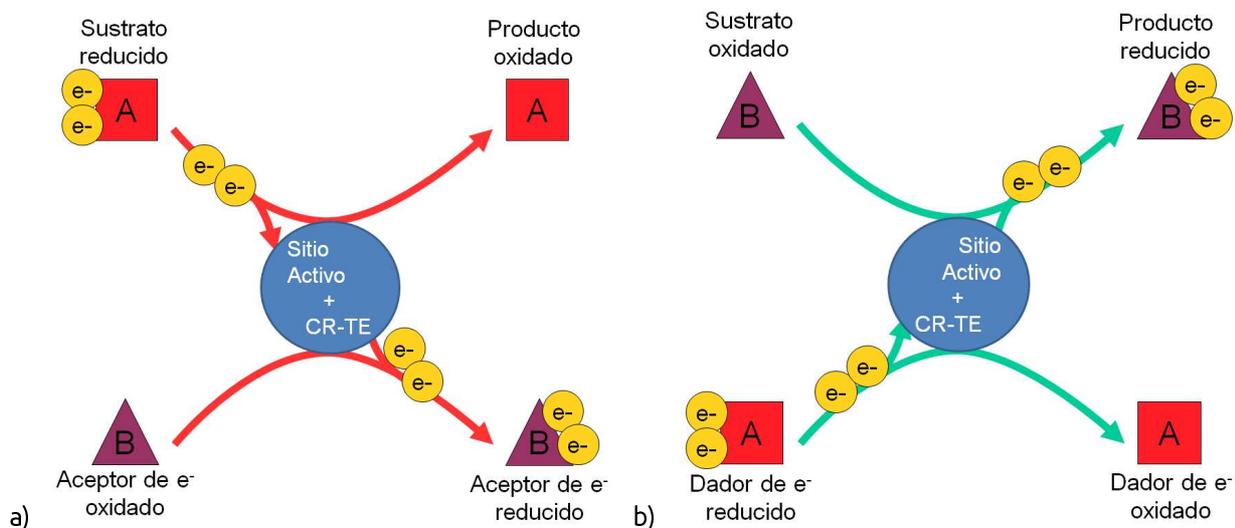


Fig. 2 - Representación de los mecanismos enzimáticos redox a) oxidativo y b) reductivo. En el mecanismo oxidativo el sustrato reducido se oxida en el sitio activo, éste capta los electrones para cederlos a un aceptor de electrones oxidado que al tomarlos se reduce. En el mecanismo reductivo el sustrato está inicialmente en forma oxidada, y se reduce tomando los electrones en el sitio activo que provenían de la oxidación de un dador electrónico. A: agente reductor; B: agente oxidante.

En reacciones del tipo oxidativas ilustradas en la Fig. 2.a, el sustrato A que está reducido cede los electrones involucrados en la reacción redox al sitio activo con la obtención de un producto oxidado. Posteriormente, los electrones son captados por un aceptor de electrones B oxidado produciendo la reducción del mismo. Para el caso de las reacciones reductivas Fig. 2.b, el sitio activo toma los electrones, cedidos por un dador electrónico A, y produce la reducción del sustrato oxidado B generando un producto reducido.

En los siguientes capítulos se abordará el estudio de las proteínas nitrito reductasa de cobre de *Sinorhizobium Meliloti* (*SmNir*) y aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*), que contiene molibdeno. Estas dos proteínas son ejemplos representativos de enzimas que siguen el mecanismo general descrito en las Fig. 1 y Fig. 2. La estructura cristalográfica de la *SmNir* no se conoce al momento de este trabajo, mientras que la de la *DgAOR* está ampliamente documentada[13–17]. Los centros redox de las mismas son estudiados mediante el uso de distintas técnicas espectroscópicas pero, dado que son paramagnéticos en determinados estados redox de las proteínas, en nuestro grupo de investigación se utiliza principalmente la espectroscopía paramagnética electrónica (EPR). También se evalúan las propiedades cinéticas de las proteínas mediante estudios cinéticos de estado estacionario monitoreados por espectroscopía UV-VIS y técnicas electroquímicas. Mi aporte al tema es el estudio de las propiedades electrónicas de estos centros metálicos, la evaluación de propiedades estructurales y mecanismos catalíticos de estas proteínas mediante herramientas computacionales. Lo que se persigue es utilizar métodos computacionales para racionalizar los resultados experimentales.

Los fundamentos teóricos de los métodos computacionales empleados, así como los de la técnica de EPR que son necesarios para entender los cálculos computacionales, son dados al final del manuscrito en un Anexo. Si bien algunos de los conceptos incluidos en el Anexo están dirigidos a un lector especializado, se intentó escribirlos de la manera más simple posible tratando de no perder la rigurosidad científica que éstos implican.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es estudiar distintos aspectos del mecanismo catalítico de las metaloenzimas nitrito reductasa de cobre (Cu-Nir) del organismo desnitrificante *S. meliloti* (*SmNir*) y aldehído oxidorreductasa (AOR) del organismo reductor de sulfato *D. gigas* (*DgAOR*), utilizando la metodología híbrida *Quantum Mechanics-Molecular Mechanics* (QM/MM). Estudiar el mecanismo de reacción de estas enzimas implica estudiar aspectos como la interacción enzima-sustrato, el mecanismo de TE intraenzima, las propiedades electrónicas de los centros metálicos, reacciones de transferencia de protones, entre otros.

Esta tesis se encuadra en un proyecto de investigación más amplio en el que se persigue dilucidar el mecanismo de reacción de las enzimas *DgAOR* y *SmNir*, mediante la combinación de técnicas experimentales de biología molecular, cinéticas, espectroscópicas y estructurales, con técnicas computacionales.

Objetivos específicos

Para la *DgAOR*:

1. Evaluar mediante métodos computacionales QM/MM el mecanismo catalítico de la enzima. Para esto se realiza el modelado de las estructuras de los posibles intermediarios, la búsqueda de los estados de transición y el cálculo de la energética del proceso.
2. Evaluar las propiedades electrónicas de los cofactores metálicos de la enzima mediante métodos computacionales y correlacionarlas con mediciones espectroscópicas de EPR y resultados estructurales. Se pretende entender cómo es el mecanismo disparador de la TE intraproteína cuando el sustrato o un análogo de él se une al sitio activo de la enzima.

Para la *SmNir*

1. Obtener *in silico* la estructura 3D de la proteína *as-purified*. Para lograr este objetivo se propone refinar mediante el empleo de técnicas de mecánica clásica, mecánica cuántica y

la técnica híbrida QM/MM, una estructura inicial obtenida con la técnica de modelado por homología utilizando como molde la estructura cristalográfica de otra Nir que posea un elevado porcentaje de identidad de secuencia con la *SmNir*.

2. Sobre de los resultados obtenidos en el objetivo específico 1, estudiar la estabilidad de variantes de la proteína obtenidas *in-silico*. Esto persigue evaluar cómo cambios puntuales en los ligandos del Cu afectan la estructura molecular y electrónica de los sitios metálicos, el camino de TE y la eficiencia catalítica de la enzima. Este trabajo se contrastará con resultados de estudios cinéticos y espectroscópicos de las mismas variantes obtenidas mediante técnicas de biología molecular.
3. Estudiar para ambos tipos de sistemas, *as-purified* y variantes, la estabilidad de las interacciones nitrito-sitio activo y T1-T2.

Capítulo 1: Proteínas mononucleares de molibdeno

1.1. Introducción

1.1.1. Molibdeno: Propiedades del elemento químico

El molibdeno (Mo) es un metal de transición ubicado en el grupo 6 período 5 de la tabla periódica, siendo el elemento 42 en la misma, y posee una configuración electrónica $[Kr]4d^55s^1$ (ver Fig. 3). Se conocen siete isótopos naturales de Mo, de los cuales ^{95}Mo y ^{97}Mo tienen espín nuclear distinto de cero (5/2), con abundancia natural de 15,92% y 9,55% respectivamente [18]. El Mo puede encontrarse en una amplia gama de estados de oxidación, con valores que varían de -II a +VI, y con un número de coordinaciones de entre 4 y 8 átomos [3,18]. Su abundancia terrestre lo ubica en la posición 53 [2], siendo su concentración en la corteza terrestre de alrededor de 1,5 ppm y en el océano de 1×10^{-2} ppm [1].

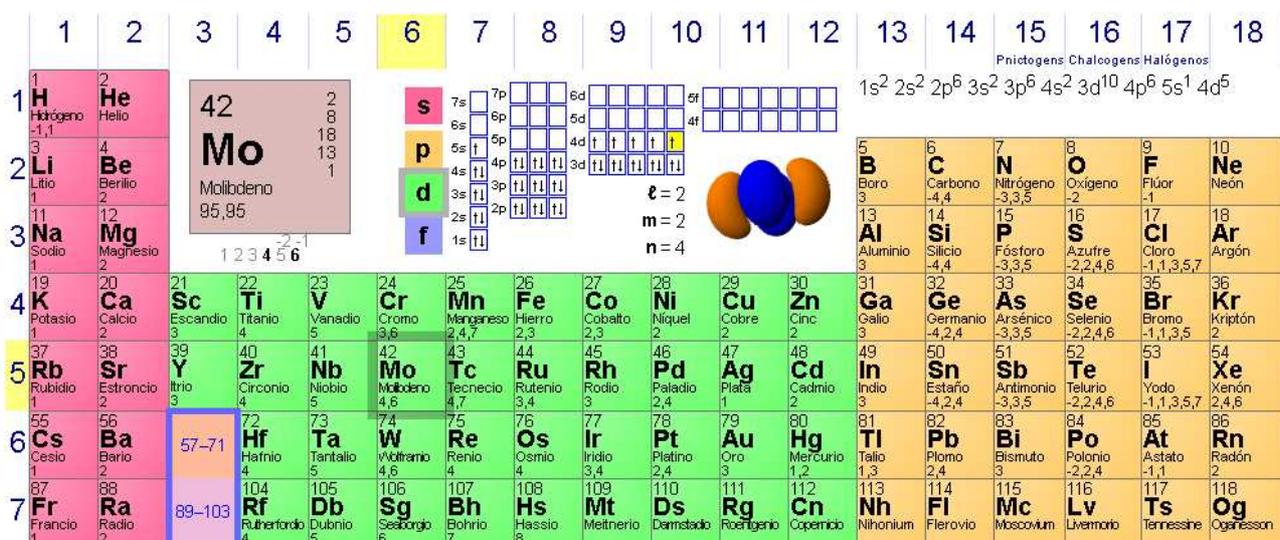


Fig. 3 - Tabla periódica de los elementos resaltando la ubicación del Mo y la configuración electrónica de dicho elemento (Figura modificada de Dayah, 2014)[19]

1.1.2. El Mo en biología

El molibdeno es uno de los elementos químicos esenciales en biología debido a que no existe organismo vivo en la superficie de la tierra que no posea al menos una proteína con este metal en su estructura [2,4,7,11,20–22]. Por otro lado, es de crucial importancia en ecología, ya que se encuentra presente en diversas enzimas que catalizan reacciones redox involucradas en los ciclos de nitrógeno, azufre y carbono, por lo que tiene implicancias en procesos relacionados con el efecto invernadero, polución de aguas, remediación de suelos, entre otros [4,20,23,24]. El

molibdeno en biología sólo utiliza los estados de oxidación VI, V y IV y cataliza reacciones de óxido reducción donde se intercambian 2 electrones [2]. Las proteínas que contienen Mo más estudiadas son de dos tipos: proteínas con cofactores metálicos hetero multinucleares, como la nitrogenasa, y proteínas mononucleares de molibdeno, como la aldehído oxidoreductasa. Se han reportado otras proteínas de Mo que no entrarían en las clasificaciones mencionadas pero con estructura y función aún no bien caracterizada. En las primeras el Mo se encuentra en estructuras multinucleares acompañado de hierro[22]; dado que dicho tipo de proteínas no es objeto de esta tesis no se explicará en detalle el centro metálico correspondiente. Las segundas contienen un centro mononuclear de molibdeno donde el ion metálico se halla coordinado a un cofactor orgánico llamado piranopterina.

Las proteínas mononucleares de Mo pueden ser divididas en tres familias, cuyos nombres se originan en la proteína más estudiada del grupo o en la primera que fue caracterizada: familia de la xantina oxidasa (XO), familia de la dimetil sulfóxido reductasa (DMSOR) y familia de la sulfito oxidasa (SO) (ver Tabla 1). Si bien las proteínas de cada familia presentan características estructurales bastante similares, catalizan diferentes reacciones [7,11,20,22,25].

Tabla 1 - Sitio de Mo para las diferentes familias de proteínas mononucleares de Mo y ejemplos de las reacciones catalizadas por miembros de cada una. Tanto X como Y pueden ser átomos de oxígeno, azufre o selenio

Familia	Xantino Oxidasa	Dimetil Sulfóxido Reductasa	Sulfito Oxidasa
Sitio de Mo			
Ejemplos	XO: xantina + H ₂ O ácido → ácido úrico + 2H ⁺ + 2e ⁻ AOR: aldehído + H ₂ O → ácido carboxílico + 2H ⁺ + 2e ⁻	DMSO: (CH ₃) ₂ SO + 2H ⁺ + 2e ⁻ → (CH ₃) ₂ S + H ₂ O	SO: SO ₃ ⁻ + H ₂ O → SO ₄ ²⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻

Todas estas proteínas contienen en el sitio activo el átomo de Mo unido a una (familias de la XO y SO) o dos (familia de la DMSOR) moléculas de piranopterina (ver Fig. 4), completando su coordinación con distintos átomos como oxígeno, azufre y/o selenio (ver Tabla 1). A su vez, las moléculas de piranopterina pueden incluir un grupo pirofosfato o un nucleótido unido a un grupo pirofosfato (Fig. 4) [20,25,26]. Esta molécula fue llamada inicialmente cofactor de Mo (*MoCo* en inglés) pero, dado que el tungsteno también forma cofactores con el ligando

piranopterina, actualmente se lo designa como cofactor pterínico para independizarse del metal que contiene [26,27]. Una generalidad estructural adicional en las diferentes familias es la presencia de otros cofactores metálicos como grupos hemo, centros de hierro-azufre (FeS) y cofactores orgánicos como flavín adenín dinucleótido (FAD), todos ellos involucrados en TE intra e inter proteína [22,28].

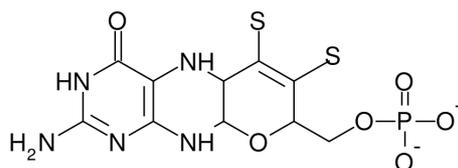


Fig. 4 - Ligando Piranopterina incluyendo un grupo pirofosfato

La casi totalidad de las proteínas mononucleares de Mo presentan un mecanismo de reacción que consiste en la transferencia de un átomo de oxígeno de una molécula de solvente hacia el sustrato en reacciones de oxidación (o viceversa en procesos de reducción). En reacciones oxidativas este proceso involucra la reducción del Mo en 2 electrones, variando su estado de oxidación entre Mo(VI) y Mo(IV) [20]. Por ejemplo, las hidroxilasas catalizan una hidroxilación oxidativa, realizan el clivaje de un enlace C-H y tienen como sustratos una gran diversidad de aldehídos y/o heterociclos aromáticos, mientras que los miembros de las familias SO y DMSOR catalizan la transferencia de un átomo de oxígeno desde o hacia un sustrato que contiene un par de electrones disponible.

1.1.3. La familia de la XO: aspectos generales de esta familia, características estructurales de la AOR y su comparación con otros miembros

La familia de la XO es una de las más ampliamente estudiadas debido a la gran diversidad de organismos vivos que las contienen, los cuales pueden ser desde bacterias del género *archaea* e hipertermófilas hasta vertebrados superiores [20]. A excepción de la aldehído oxidoreductasa (AOR), proteína objeto de estudio de esta tesis, y la monóxido de carbono deshidrogenasa, los miembros de la familia catalizan la hidroxilación de carbonos presentes en heterociclos aromáticos [29], de acuerdo con:



Esta reacción implica la ruptura del enlace C-H y la formación de un enlace C-O donde R es un heterociclo aromático. En el caso de la AOR el sustrato es un aldehído y el carbono a ser hidroxilado es el que contiene dicha función.

Los miembros de la familia XO se caracterizan por tener, además de un sitio metálico de Mo, centros de hierro-azufre (FeS) y cofactores flavínicos que actúan como centros de TE. La Fig. 5 muestra una comparación de los dominios que poseen las proteínas miembros de la familia XO. Con ligeras diferencias en cuanto a su organización, los dominios de los centros metálicos muestran una alta similitud dentro de la familia, por otro lado, la AOR carece del dominio FAD. La xantina deshidrogenasa de *R. capsulatus* se organiza en dos subunidades, XdhA, que corresponde a los dominios FeS y FAD, y XdhB, que incluye el sitio de unión de Mo, mientras que la CO deshidrogenasa de *O. carboxydovorans* posee tres subunidades CoxP (centros [2Fe-2S]), CoxM (sitio de unión de FAD) y CoxG (sitio de Mo) [6].

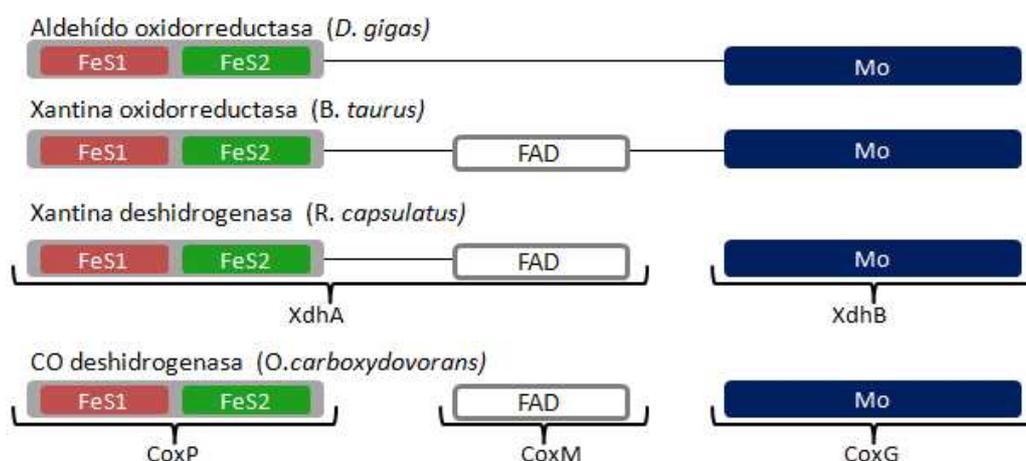


Fig. 5 -Comparación de los diferentes dominios presentes en miembros de la familia XO

La *DgAOR* es una proteína homodimérica (~100 kDa por monómero) que es estudiada por tener dos roles importantes: el primero es un rol fisiológico relacionado a la generación de equivalentes de reducción para aldehídos citoplasmáticos brindando energía a la célula bacteriana; el segundo le confiere propiedades detoxificantes al tener de sustratos un amplio rango de aldehídos alifáticos de cadenas largas y cortas y aldehídos aromáticos[30]. La *DgAOR* fue la primer enzima mononuclear de Mo cuya estructura fue resuelta por rayos X y, también, la primera en ser resuelta a una resolución de casi 1 Å [14,31]. Cada monómero es catalíticamente independiente del otro [30] y, como se dijo antes, presenta dos dominios llamados dominios Mo y FeS. El dominio Mo es el de mayor tamaño y contiene al sitio activo; el dominio FeS contiene

dos centros [2Fe-2S] denominados FeS1 y FeS2. La Fig. 6 muestra la estructura cristalográfica de uno de sus monómeros identificando con colores distintos cada dominio (PDB 1VLB).

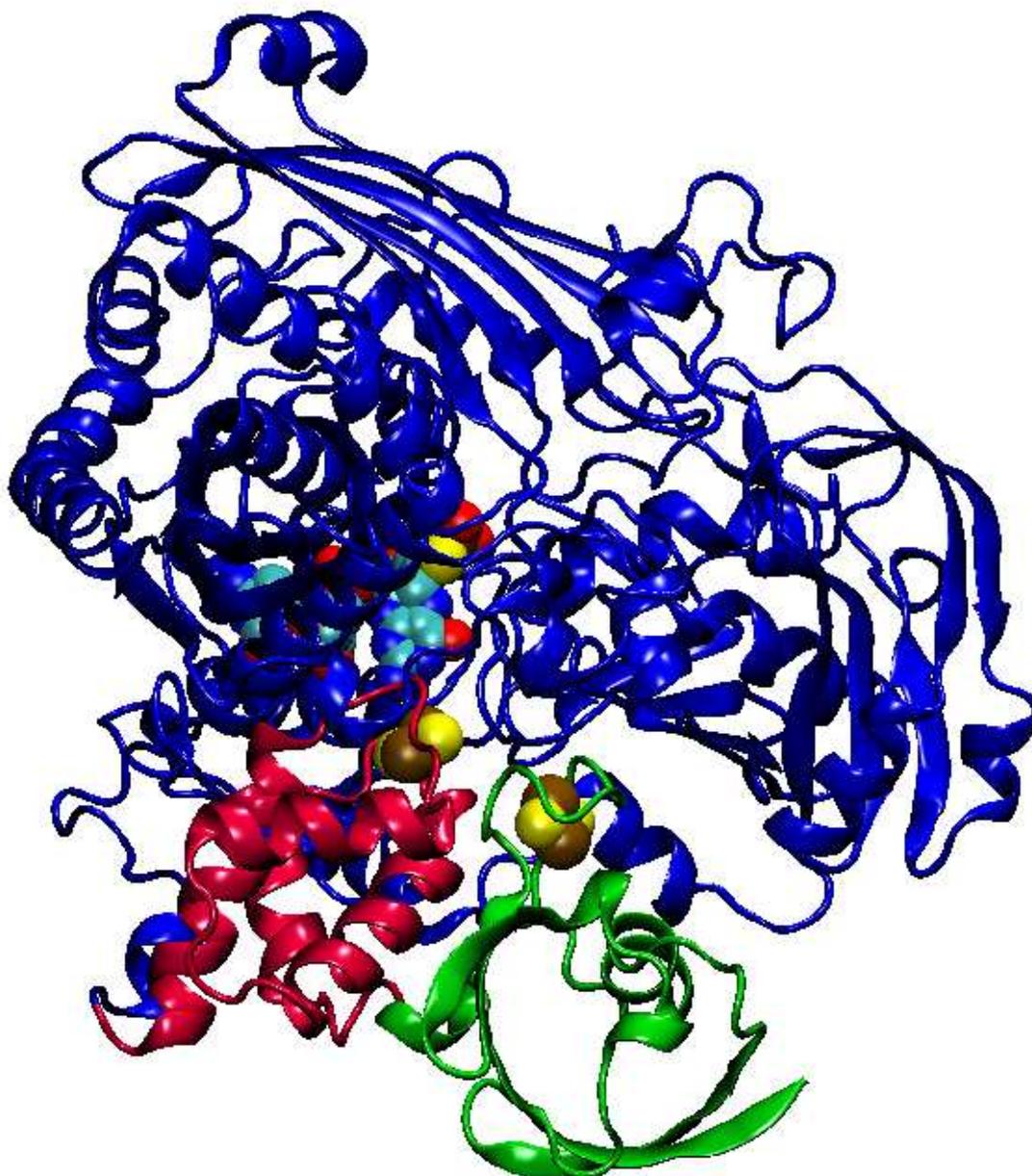


Fig. 6 - Estructura coloreada por dominios de *DgAOR* (azul dominio Mo, rojo y verde dominios FeS, rojo corresponde FeS1 y verde a FeS2). Las esferas en colores corresponden a los átomos de los cofactores metálicos.

El Mo se encuentra en un sitio con geometría piramidal cuadrada distorsionada en la familia XO. Ninguno de los ligandos coordinados al metal son parte de la proteína. Estos corresponden a dos azufres del grupo ditioleno de una molécula de piranopterina, un grupo oxo apical, un ligando sulfido ecuatorial (S_{ecu}) y un grupo OH_x ecuatorial cuya naturaleza hidroxilo o agua no

pudo aún ser determinada [15,20,22,25,32](Fig. 7.a). Cabe mencionar que en el caso particular de la AOR bacteriana, el ligando ecuatorial sulfuro se encuentra reemplazado por un grupo oxo (OR1) (Fig. 7.b). Esta forma de la enzima, denominada forma "desulfo" [15], ha sido encontrada también en estructuras catalíticamente inactivas de xantino oxidasa [33]. Inicialmente se pensó que para AOR la estructura "desulfo" obtenida correspondía a una forma inactiva y que la pérdida del azufre se debía a los procesos de cristalización; la resulturación de la enzima en forma monocristalina mostró que la incorporación del azufre se producía en la posición apical, en lugar de la ecuatorial, lo que originó una controversia acerca de la posición del ligando S de la XO[15]. Posteriormente, ensayos cinéticos de estado *resting* utilizando cristales de la AOR en su forma "desulfo" mostraron que dicha forma de la AOR corresponde a la forma catalíticamente competente. Esto confirmó que el azufre en la posición ecuatorial no es esencial en AOR para la catálisis y que dicha modificación podría explicar por qué actúa sobre sustratos diferentes al resto de los miembros de la familia XO[17].

El *MoCo* de esta familia contiene un nucleótido unido al grupo fosfato terminal, encontrándose especies con las bases guanina, citosina, adenina e hipoxantina [34,35]. Si bien aún no se conoce el rol de los distintos nucleótidos, se asume que la función del cofactor es la misma en todos los casos, ya que la estructura principal de la pterina está conservada.

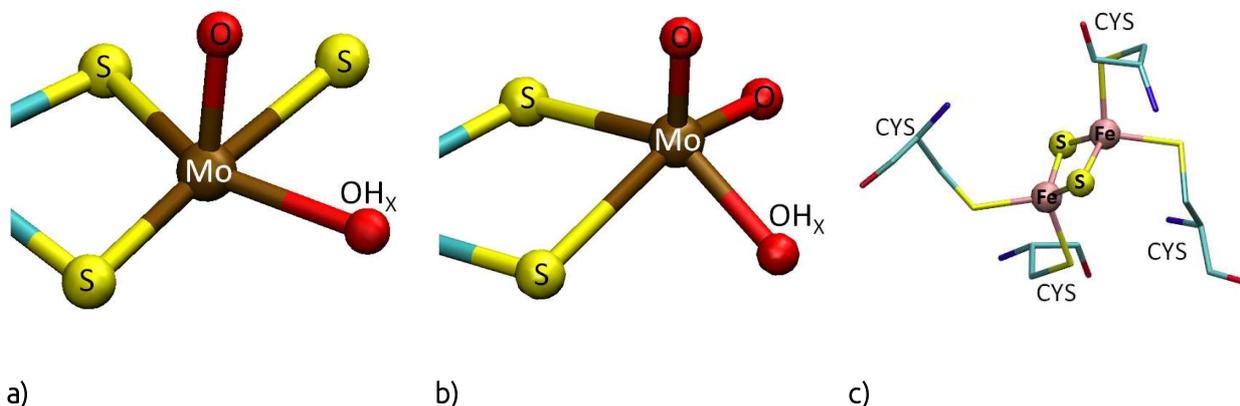


Fig. 7 - Estructuras del sitio activo de XO PDB 3ETR (a), AOR (b) y del centro FeS del tipo [2Fe-2S] (c). Los hidrógenos no se muestran por tratarse de estructuras cristalográficas.

Los centros FeS que contienen la mayoría de los miembros de la familia XO son del tipo [2Fe-2S] (Fig. 7.c). Estos corresponden a arreglos casi planares formados por dos átomos de Fe unidos a dos átomos de S inorgánico. Los átomos de Fe se unen a su vez a dos azufres de las

cadena lateral de residuos de cisteína de la proteína, presentando geometría de coordinación tetraédrica.

Los centros Mo y FeS se encuentran conectados por un camino químico formado por los ligandos de los iones metálicos y aminoácidos de la proteína que constituye el camino de TE[36] (Fig. 8). Las distancias Mo-FeS1, FeS1-FeS2 y Mo-FeS2 son de aproximadamente 15, 12 y 24 Å respectivamente, las cuales son distancias que caen en el rango en el que se ha observado TE en enzimas redox y de TE.

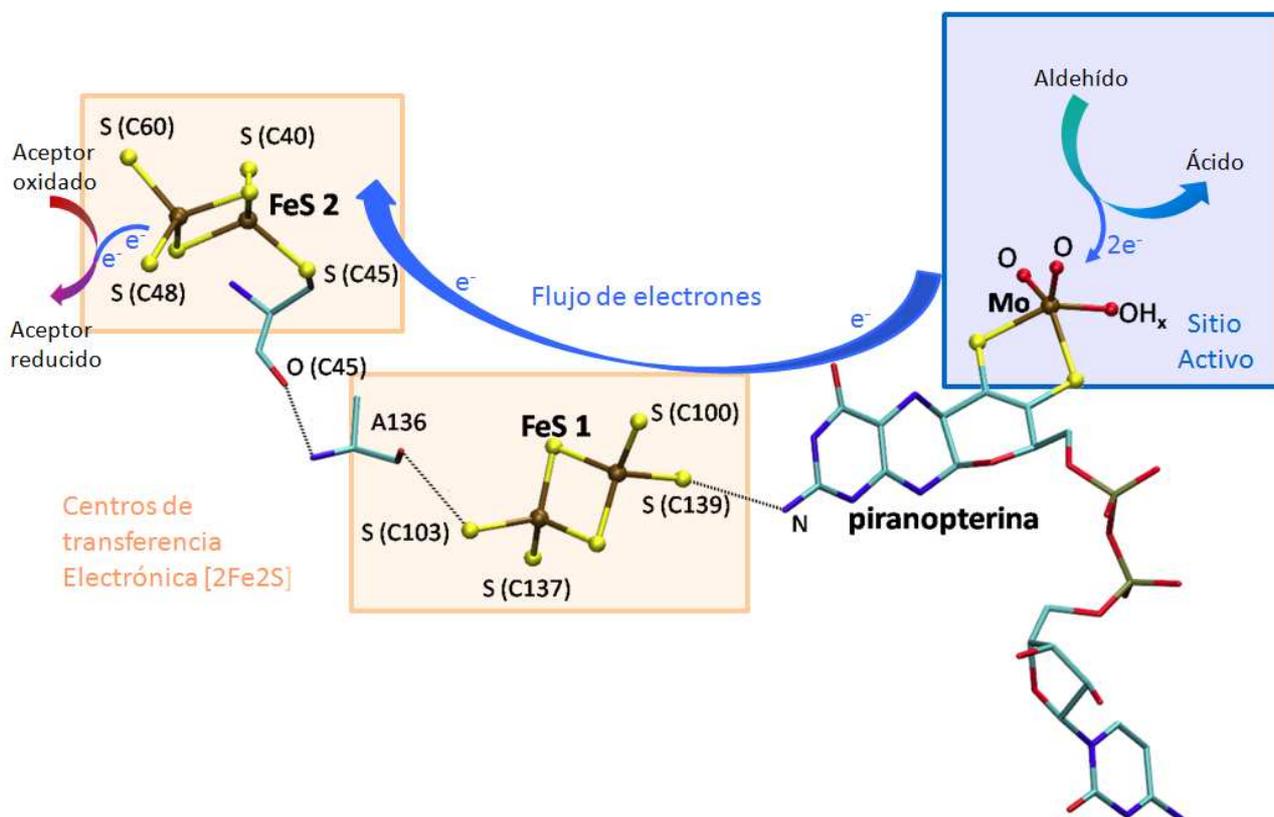


Fig. 8 - Cadena de TE y mecanismo catalítico propuesto para la AOR

1.1.4. Aspectos generales del mecanismo de reacción

La Fig. 8 muestra un esquema general de cómo se produce el mecanismo catalítico de la AOR. El sustrato aldehído se une al sitio activo, coordinándose al Mo en el estado Mo(VI), donde es oxidado a ácido. Los dos equivalentes de reducción son luego transferidos, a través del camino químico que une los cofactores redox, a un aceptor externo de electrones que se postuló

que es una flavodoxina [36]. Teniendo en cuenta los dominios y la actividad redox de la AOR, podemos dividir el proceso catalítico de esta enzima en tres etapas (ver Fig. 8):

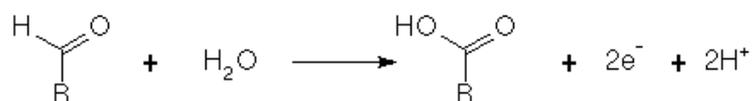
- i) la interacción del sitio activo de la enzima con el sustrato;
- ii) la oxidación del sustrato para formar el producto;
- iii) la TE intra-proteína mediada por los distintos cofactores redox y el camino químico que los une, y la cesión de los electrones a un aceptor externo FAD, el cual puede ser utilizado como *partner* fisiológico de diversas oxidorreductasas [6,14,16,17,29,30,37-42].

Durante el presente trabajo de tesis se abordarán principalmente aspectos relacionados a los dos primeros procesos.

1.1.5. Reacción Enzimática de la DgAOR

1.1.5.1. El mecanismo catalítico

Como se explicó antes, la reacción catalizada por la *DgAOR* es una reacción de hidroxilación, la transferencia reversible de un átomo de oxígeno del agua al sustrato [20,43,44] de acuerdo con la reacción:



Ec. 2

Como sucede con otras Mo-enzimas hidroxilasas, durante la catálisis enzimática la *DgAOR* recibe electrones del sustrato que son posteriormente cedidos a un aceptor de electrones externo de acuerdo con el esquema de la Fig. 9 [45].

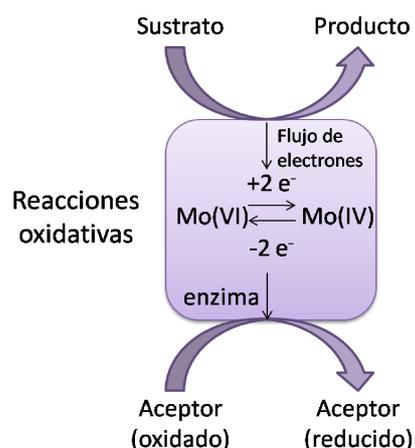


Fig. 9 - Esquema de la reacción oxidativa realizada por la *DgAOR*

A nivel molecular, el mecanismo de reacción aceptado para los miembros de la familia XO implica que el sustrato interactúa con el sitio activo reaccionando con el grupo OH_x del cofactor de Mo [32] de acuerdo con el esquema de la Fig. 10 en una reacción redox de dos electrones [46] que involucra la reducción de Mo(VI) a Mo(IV). La *DgAOR* es un miembro de la familia XO que cataliza la conversión de un amplio rango de aldehídos a sus respectivos ácidos carboxílicos entre los que podemos mencionar acetaldehído, propionaldehído, benzaldehído, y salicilaldehído. Ensayos de sustratos de la XO como xantina, purina, allopurinol, y N-metil nicotinamida mostraron que dichos compuestos no funcionan como sustratos para la *DgAOR* [29].

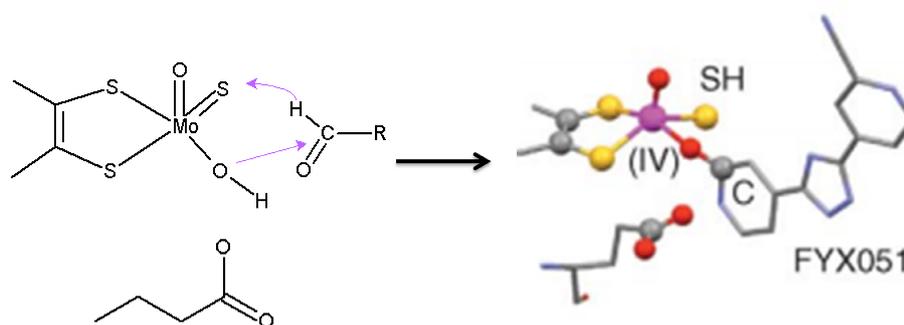


Fig. 10 - Mecanismo aceptado para todos los miembros de la familia XO que tienen un átomo de S en la posición ecuatorial del cofactor de Mo e implica la interacción del sustrato con el ligando OH_x del Mo y la transferencia del H del grupo aldehídico del sustrato al azufre ecuatorial (izquierda). Estructura del centro activo de la proteína xantina dehidrogenasa bobina (BXDH) con un producto unido (Figura modificada de Brondino y col. 2006 [11]) como ejemplo de las estructuras utilizadas para proponer el mecanismo catalítico actualmente más aceptado de la AOR. Compuesto FYX-051 = 4-[5-pyridin-4yl-1H-[1,2,4] triazol-3yl] pyridine-2- carbonitrile (derecha). En ambas figuras se esquematiza la región del cofactor de Mo hasta el ditioleno.

El mecanismo catalítico general presentado en el párrafo anterior y esquematizado en la Fig. 10 ha sido ampliamente estudiado tanto de forma experimental [15,32,34,43,47–55] como mediante el uso de modelos computacionales [15,48,56–66]. El más aceptado actualmente se basa en estructuras cristalográficas obtenidas en diferentes estados intermedios claves del mecanismo catalítico (por ejemplo la estructura de la Fig. 10. derecha). Éste propone un ataque nucleofílico del ligando OH_x sobre el carbono carbonílico del sustrato, dando lugar al enlace C-O, y la protonación del grupo ecuatorial $\text{Mo}=\text{S}$ para obtener el ligando $\text{Mo}-\text{SH}$ y permitir la reducción del Mo (Fig. 10-izquierda) [14,15,48].

El mecanismo brevemente explicado arriba ha sido aceptado para todos los miembros de XO asumiendo que en la posición ecuatorial del ligando del Mo hay un átomo de S. Como ha sido explicado en la sección 1.1.3., existe una forma "desulfo" de las proteínas miembros de la familia XO, en la cual la posición ecuatorial está ocupada por un átomo de O que reemplaza el S. Se ha demostrado que esta forma, si bien es inactiva para la mayoría de los miembros de la familia XO, en *DgAOR* resulta ser catalíticamente activa. No se ha estudiado en profundidad un mecanismo catalítico similar o alternativo sobre la forma "desulfo" de *DgAOR*, sólo se menciona al respecto en el trabajo de Metz [62] que ya que el átomo de O posee un tamaño menor al del S, esa variante de la proteína podría tener eventualmente un átomo de Mo hexacoordinado, añadiendo un enlace directo Mo-C con el sustrato.

1.1.5.2. Mecanismos de reacción propuestos para la XO evaluados por métodos computacionales a nivel QM

Desde el punto de vista teórico se han realizado numerosos estudios que evalúan la energética de la reacción enzimática por medio de cálculos computacionales, en su mayoría a nivel de mecánica cuántica (QM) utilizando con frecuencia, para los cálculos del mecanismo de XO, la estructura de *DgAOR* debido a que fue obtenida con una muy alta resolución. Estos estudios se realizaron principalmente sobre modelos reducidos del sitio activo utilizando dos posibles enfoques: i) de forma concertada, es decir que todos los cambios producidos por el mecanismo se llevan a cabo en simultáneo en un solo paso; y ii) mecanismos que contemplan estados intermedios y estados de transición [15,48,56–66]. Se describirán los mecanismos más relevantes para cada enfoque. Dentro de los segundos, el primer mecanismo por pasos fue propuesto en 1997 por Bray *et al.* [58]) con el nivel teórico B3LYP/Lanl2DZ (ver Fig. 11). Inicia con la transferencia del hidruro al grupo sulfuro y la unión del sustrato formaldehído al Mo por medio del átomo de C del último, ambas modificaciones corresponden al paso I1 cuya energía no

fue informada y tampoco se propone un estado de transición entre el sistema con el sustrato libre y el estado I1. El siguiente paso corresponde al estado de transición TS1, tiene una barrera de 8,4 kcal/mol y da lugar a la unión del C del sustrato con el O del grupo hidroxilo ecuatorial del Mo manteniendo el enlace de dicho C con el átomo de Mo, que a su vez se reduce de Mo(VI) a Mo(IV). Este modo de unión fue propuesto también experimentalmente a partir de estudios por ENDOR [67] y aunque la reacción involucrada tiene precedentes químicos [68], la propuesta fue posteriormente criticada por Manikandan *et al.*, cuyos análisis de ENDOR no avalaron la existencia de un enlace directo Mo-C[55]. En el estado final el producto se libera como ácido fórmico.

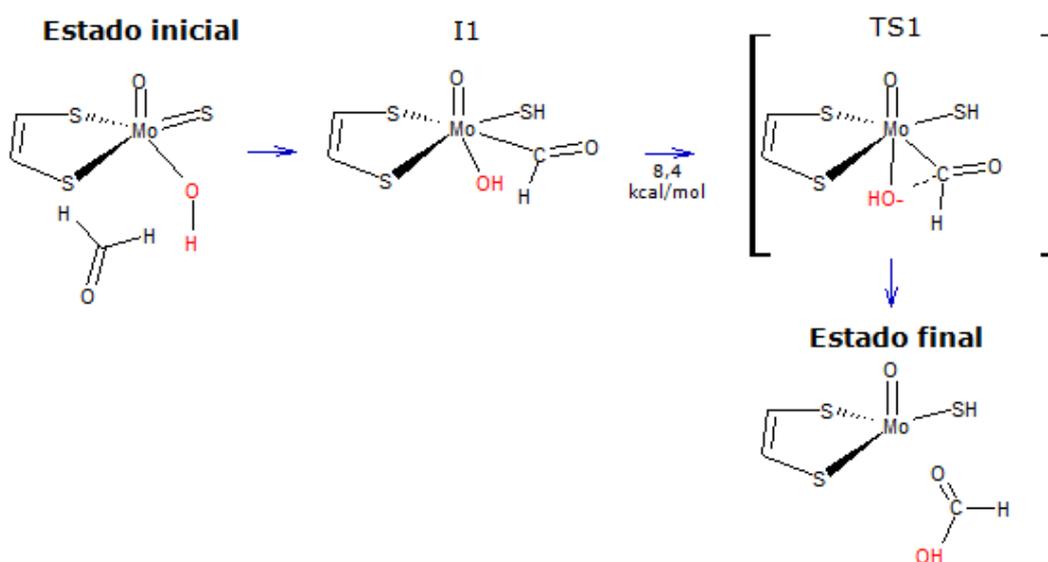


Fig. 11 - Mecanismo propuesto por Bray et al.[58]

Un estudio posterior corresponde al trabajo realizado por Voityuk *et al* [66] usando el funcional BP86, cuyos aspectos relevantes son: reconoce que el O ecuatorial corresponde a un grupo hidroxilo (o agua) en lugar de un grupo oxo, y que dicho átomo se une al C carbonílico del sustrato mediante un ataque nucleofílico, con la formación de un intermediario tetrahédrico (I1); comienza la transferencia del átomo de hidrógeno al azufre (TS1); el sustrato oxidado queda unido al centro de Mo reducido y se completa la transferencia del H al sulfuro (I2). En el estado final se libera el producto (ver Fig. 12). No pudieron encontrarse los estados de transición entre el estado inicial e I1 ni entre I2 y el estado final.

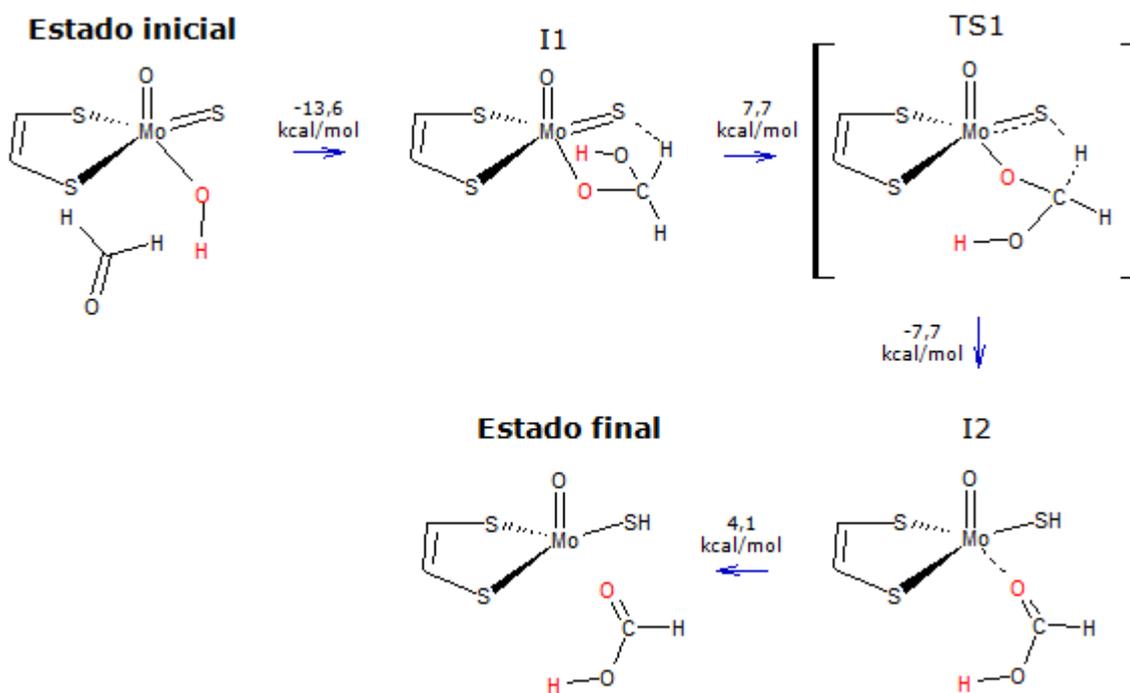


Fig. 12 - Mecanismo propuesto por Voityuk et al. [66]

El mecanismo concertado fue estudiado en primera instancia con métodos *ab initio* (UMP2) por Illich *et al* [61] pero, debido a que las energéticas encontradas son excesivamente mayores, dichos estudios no resultan comparables con los de Voityuk[66]. Posteriormente, en el trabajo de Zhang *et al* [64], se realizó una aproximación sobre dicho mecanismo utilizando la teoría del funcional de densidad, con el funcional B3LYP, encontrando una barrera de 13,5 kcal/mol al estado de transición TS1 (ver Fig. 13 flechas verdes). Con este mismo nivel de cálculo se evaluó un mecanismo por pasos comparable al propuesto por Voityuk *et al* [66], obteniendo barreras de 17,8 y 5,4 kcal/mol para los estados TS1 y TS2 respectivamente (ver Fig. 13 flechas azules). Las conclusiones de dicho trabajo fueron que el mecanismo concertado era energéticamente más conveniente que el mecanismo por pasos para el sistema con formaldehído como sustrato y que en este sistema la presencia de una molécula de agua cercana al sitio, que actúa como ácido de Lewis, es clave para promover la adición nucleofílica del grupo hidroxilo al sustrato. En relación al mecanismo por pasos, si bien la barrera entre el estado inicial y el estado de transición TS1 de 17,8 kcal/mol indicaría que alcanzar dicho paso está prohibido energéticamente, hay evidencia experimental en contra de que exista un paso limitante del mecanismo por pasos en XO [43].

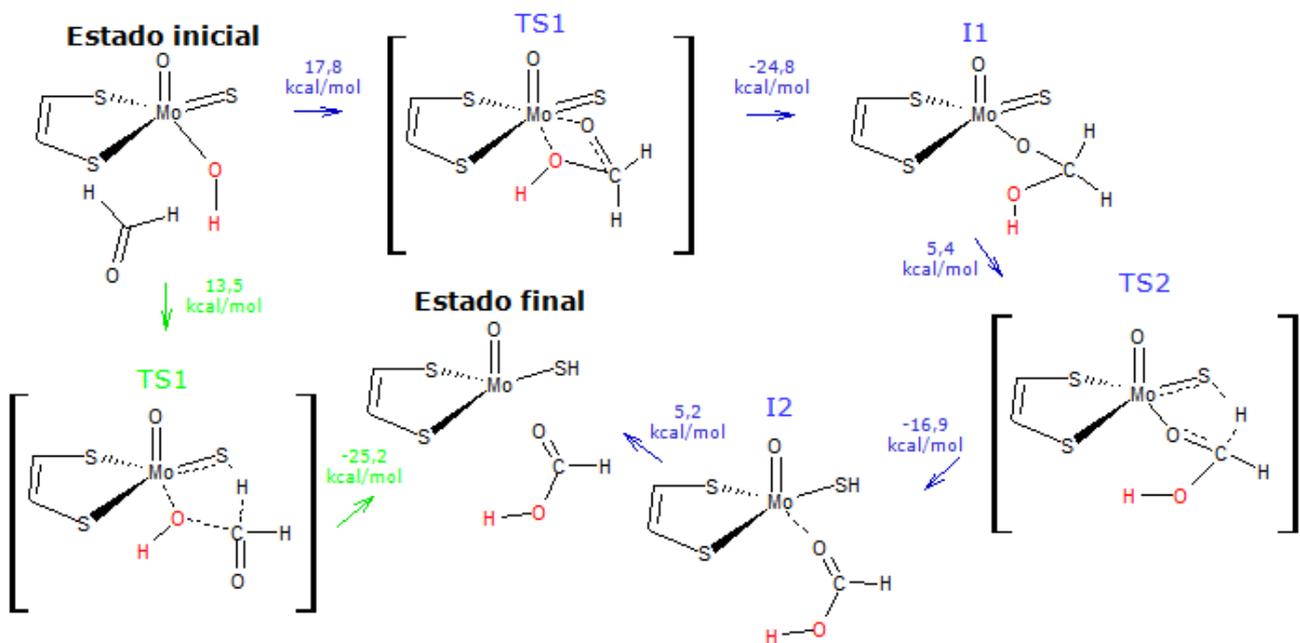


Fig. 13 - Mecanismos evaluados por Zhang *et al* [64]

Otra aproximación sobre el mecanismo concertado se realizó con métodos *ab initio* con el ligando ecuatorial desprotonado (grupo oxo en vez de OH) y como ligando formamida [65]; dicho estudio obtuvo barreras energéticas de 35-42 kcal/mol que resultan prohibitivamente altas.

1.1.5.3. Mecanismo catalítico propuesto para los miembros de la XO por métodos computacionales utilizando la aproximación QM/MM

Todos los enfoques teóricos mencionados anteriormente corresponden a modelos con ciertas limitaciones: barreras de energía excesivamente altas, estados que no son compatibles con resultados experimentales y, además, corresponden a modelos que incluyen solamente parte del cofactor y el sustrato, desestimando las contribuciones del entorno proteico. Recién en 2009 Sebastian Metz hizo la primera aproximación incluyendo la contribución estérica y energética de la proteína, estudiando cinco diferentes mecanismos a nivel QM/MM, incluyendo en la región cuántica el residuo GLU869, en los dos distintos estados de protonación posibles para dicho aminoácido, y una molécula de agua que interacciona con ese residuo y el sustrato[69]. De los cinco mecanismos propuestos sólo tres son energéticamente favorables: a) mecanismo concertado (ver Fig. 14 flechas verdes), b) activado por el centro metálico (ver Fig. 14 flechas rojas) y c) catalizado por una base de Lewis (ver Fig. 14 flechas azules). Estos mecanismos involucran el movimiento del hidrógeno del OH_x ecuatorial al residuo GLU869, la unión del O ecuatorial con el C carbonilo del sustrato y la transferencia del H del carbono carbonilo del

sustrato al S ecuatorial. En la Fig. 14 pueden verse las barreras energéticas de dichos mecanismos, los pasos intermediarios y los estados de transición hallados. El mecanismo más favorable es el tercero de los mencionados (ver Fig. 14 flechas azules), donde, en el primer paso (TS1), el residuo GLU869 participa activamente desprotonando el grupo hidroxilo del cofactor. Esta transferencia es esencial para la actividad de la enzima y además tiene dos ventajas: primero, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo se vuelve más nucleofílico; segundo, la protonación del GLU869 perturba el grupo carbonilo del sustrato e induce un flujo electrónico al oxígeno del carbonilo, de esta manera se fortalece la electrofilicidad del C carbonílico del sustrato. El siguiente paso consiste en la formación de un enlace C-O entre el cofactor activado y el sustrato (TS2), obteniendo un intermediario tetraédrico (I2). El último paso corresponde a la transferencia del H del sustrato hacia el sulfuro ecuatorial (TS3) con la obtención del producto final (Estado final B). El mecanismo activado por el centro metálico difiere del anterior en cómo se obtiene el intermediario tetraédrico I2 (Fig. 14 flechas rojas): el sustrato primero forma un enlace C-O, de su carbono carbonílico al átomo de O coordinado al centro metálico, al mismo tiempo que se une con el O del grupo carbonilo al Mo (TS1), formando un complejo bidentado (I1).

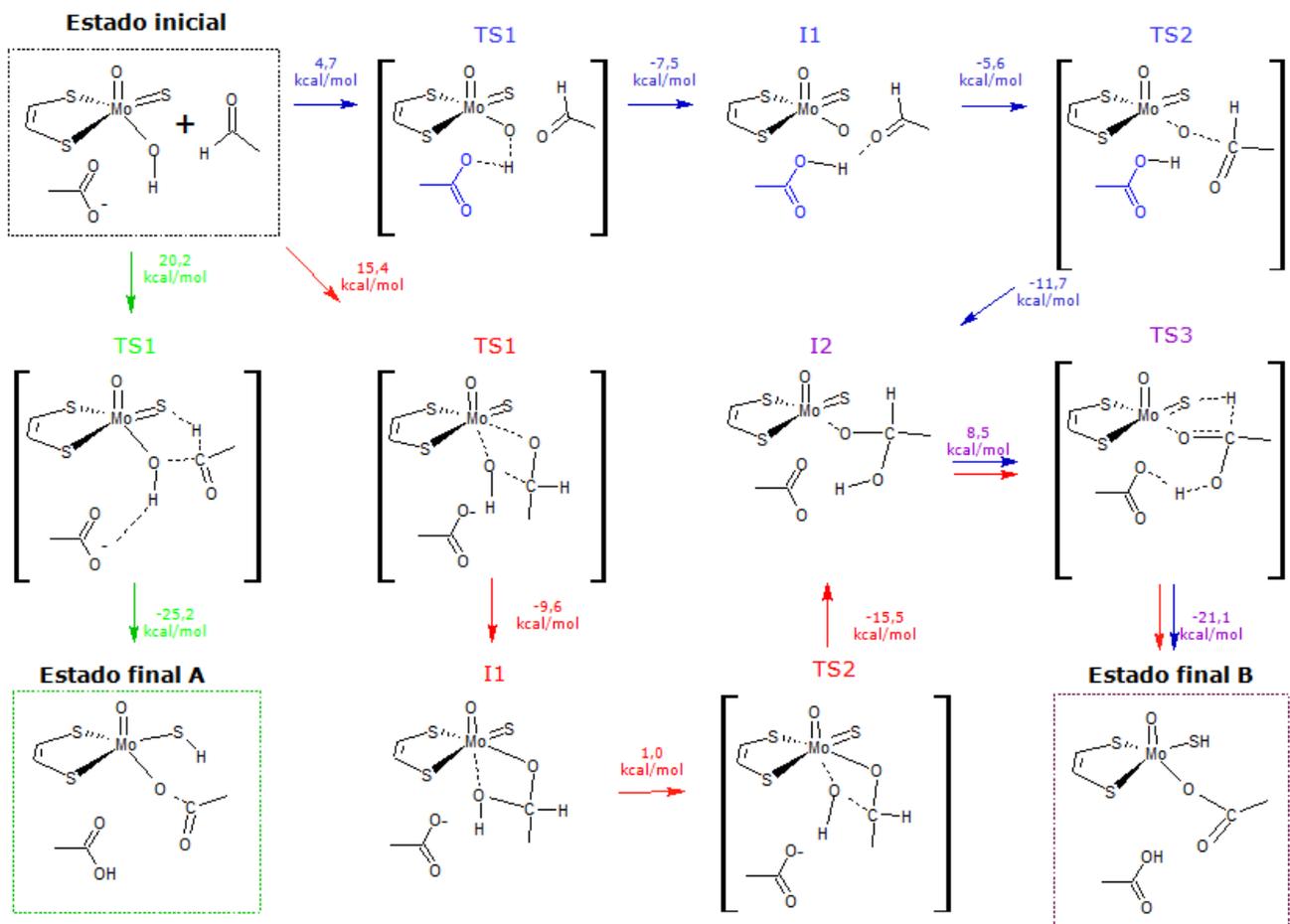


Fig. 14 - Mecanismos propuesto por Metz et al [62]. En verde el mecanismo concertado, en rojo el activado por el centro metálico y en azul catalizado por una base de Lewis, identificada con color azul en los pasos TS1, IM1 y TS2 de ese mecanismo. Los estados cuyo título y energía se encuentra en color violeta son comunes entre los mecanismos azul y rojo.

Si bien el factor limitante de la reacción, según estos autores, correspondería a la formación del intermediario tetraédrico al producirse el enlace C-O, para el mecanismo más favorable se obtiene que el principal efecto del GLU869 consiste en disminuir la barrera del ataque nucleofílico, lo cual convierte a la transferencia del H al S como el paso limitante en la reacción. Los dos mecanismos descartados corresponden a la variante con el residuo GLU869 protonado inicialmente y a la que incluía la molécula de agua entre el GLU869 y el sustrato. Las razones que llevaron a rechazar esos mecanismos son que la primera tuvo una barrera energética demasiado alta mientras que el mecanismo con el agua adicional no mostró una disminución de la energía.

1.1.5.4. Mecanismo catalítico de la DgAOR

1.1.5.4.1. Diferencias con el mecanismo de la XO

En este trabajo se propone un mecanismo catalítico para la DgAOR similar al mecanismo c propuesto por Metz *et al.* (ver Fig. 14). Este último involucra al GLU869 actuando como base de Lewis, y resultó ser el mecanismo más favorable de los estudiados para XO [69].

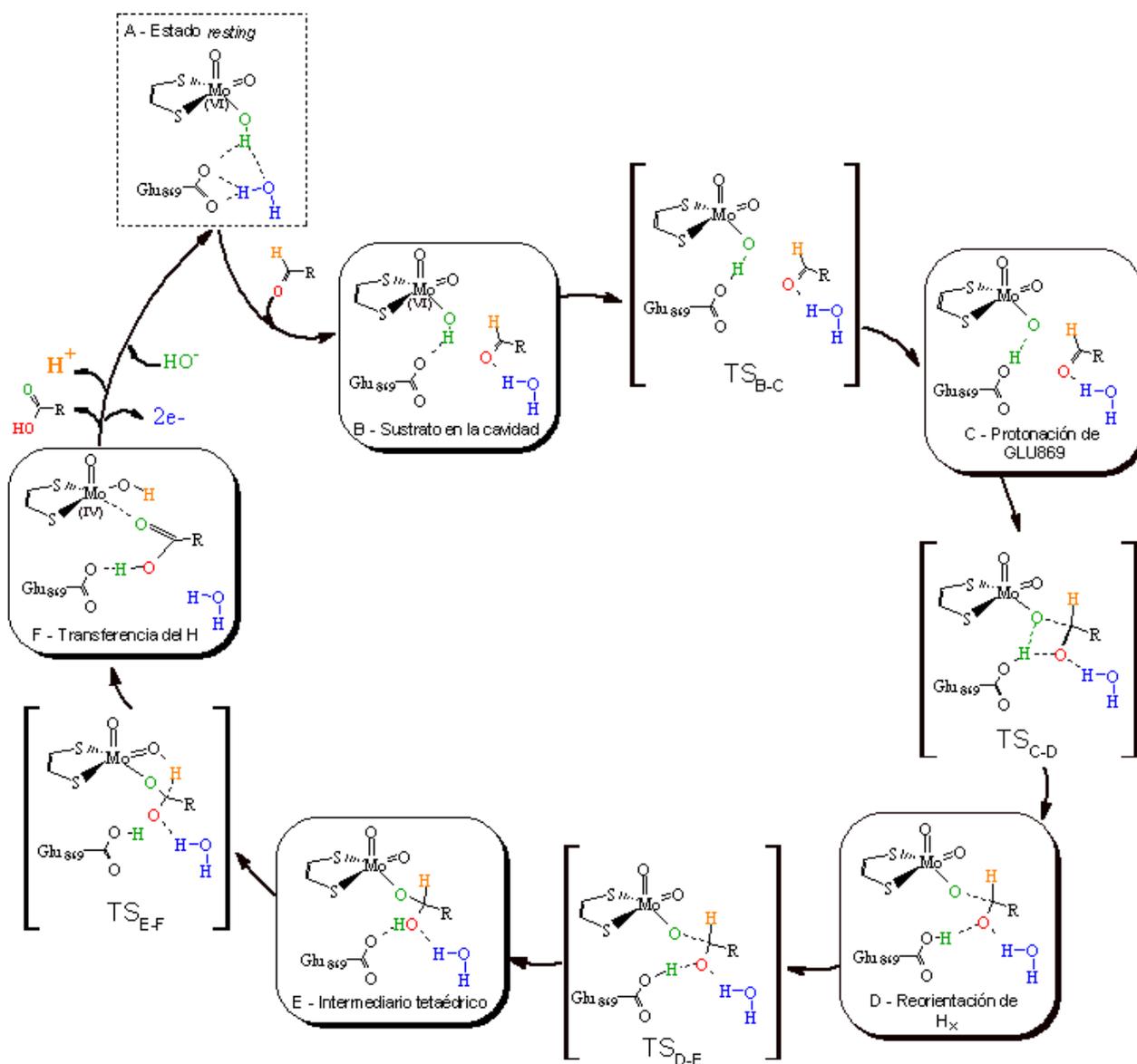


Fig.15 - Mecanismo catalítico propuesto para la DgAOR. Los estados intermedios están con marco cerrado mientras que los estados de transición se encuentran entre corchetes

La diferencia fundamental entre ambos mecanismos radica en que en este trabajo de tesis el cofactor de Mo fue modelado en la forma "desulfuro", es decir respetando los átomos obtenidos

de la cristalografía de la *DgAOR*, en vez de considerar el sulfuro ecuatorial como se hizo en el trabajo de Metz y en los trabajos descritos en 1.1.5.2. y 1.1.5.3.. Como se explicó en la sección 1.1.3., el fundamento para mantener el ligando oxo ecuatorial en nuestra propuesta es que está demostrado que la forma “desulfo” para la AOR bacteriana es activa [17].

En la Fig.15 se muestran los distintos pasos que involucran nuestra propuesta para el mecanismo catalítico de la *DgAOR* y que fueron evaluados con métodos QM/MM. El procedimiento empleado para realizar los cálculos se explica en la sección “Materiales y Métodos”.

El mecanismo propuesto involucra la participación del aminoácido catalítico GLU869 mediante la formación de un estado intermediario con el GLU869 protonado (GLU869-H_x), siendo H_x el protón cedido por el grupo OH_x (grupo lábil catalítico formado por el oxígeno catalítico, O_{cat} , y el protón H_x , ambos átomos en color verde en la Fig.15) ligado al Mo (ver Fig.15). El estado **A** corresponde a la proteína en estado *resting* lista para comenzar un ciclo catalítico. El ligando ecuatorial del Mo grupo catalítico OH_x , se asume como OH, el residuo GLU869 se encuentra desprotonado y ambos grupos establecen puentes de hidrógeno entre sí. Adicionalmente el O de GLU869 forma un puente de hidrógeno con un agua que se encuentra próxima al sitio de Mo y que se identifica en azul en la Fig.15. Los estados intermediarios se identifican con las letras **B a F** e involucran el paso por cuatro estados de transición ($\text{TS}_{\text{B-C}}$, $\text{TS}_{\text{C-D}}$, $\text{TS}_{\text{D-E}}$, $\text{TS}_{\text{E-F}}$) identificados con corchetes en la figura correspondiente (ver Fig.15). En el estado **B** el sustrato se ubica en la cavidad a una distancia que le permite tener interacción sustrato-sitio activo débil, mientras que el sitio activo y el residuo GLU869 se mantienen esencialmente como en el estado **A**. El agua cercana al sustrato (molécula de agua en azul en la Fig.15) se aleja del GLU869 y establece un puente hidrógeno con el O del grupo aldehído del sustrato (O_{ald} , átomo en color rojo en la Fig.15), proceso que ocurre conservando el puente hidrógeno entre GLU869 y el OH_x . El estado de transición $\text{TS}_{\text{B-C}}$ corresponde al proceso de transferencia del H_x del OH_x hacia el O del GLU869. En el estado **C** el grupo lábil catalítico ligado al Mo se encuentra como grupo oxo, mientras que el residuo GLU869 está protonado producto de la transferencia del H_x . Este H establece un puente de hidrógeno con el O_{cat} , no interaccionando aún con el sustrato pero al mismo tiempo volviendo al O_{cat} más reactivo. Para el estado $\text{TS}_{\text{C-D}}$ el sustrato se acerca al sitio activo y al GLU869 de manera que se establece una competencia por el H_x entre el GLU869, el O_{cat} y el O_{ald} , lo que vuelve al C_{ald} más electrofílico, favoreciendo su interacción con el O_{cat} . En el estado **D** el sustrato continúa acercándose al sitio activo, el H_x si bien permanece unido al O de GLU869, ahora se ubica en la dirección de los átomos O de GLU869 y el O_{ald} , perdiendo la interacción de puente de hidrógeno con el O_{cat} . En otras palabras, el OH_x del GLU869 experimenta una rotación en

dirección del O_{ald} , estableciendo enlace puente de hidrógeno únicamente con el sustrato. El estado de transición siguiente TS_{D-E} corresponde al sustrato aún más cerca del sitio activo lo que produce una menor distancia de enlace $O_{cat}-C_{ald}$, y la transferencia del H_x al C_{ald} . El estado **E** está caracterizado por un complejo sustrato-sitio activo donde el sustrato adopta una estructura tetraédrica centrada en C_{ald} , que adquiere como cuarto ligando al O_{cat} , este último aún ligado de forma ecuatorial al Mo. Notar que se va a usar la palabra sustrato para designar a la molécula de aldehído unida al sitio de Mo pero que no se quiere significar con esto que representa una molécula de aldehído. El H_x se une al O_{ald} que forma otro vértice del tetraedro. El H_x establece un puente de hidrógeno con el O de GLU869. En nuestra propuesta, El TS_{E-F} involucra la realización de dos procesos: i) la transferencia del H unido al C (H_C , vértice restante del tetraedro y átomo en color amarillo en la Fig.15) del complejo sitio activo/sustrato al grupo oxo ecuatorial (O_{ecu} denominado en la cristalografía como OR1) ligado al Mo (correspondiente al grupo sulfuro en XO); y ii) la reducción del Mo(VI) a Mo(IV). El estado **F**, en el cual el Mo se encuentra como Mo(IV), consiste en el producto formado alejado del Mo pero a una distancia en la que aún existe cierta interacción sitio activo-producto. El H_C se encuentra completamente transferido al OR1, mientras que el H_x permanece unido al O_{ald} . Junto con el producto se libera el protón H_C y dos electrones que son transferidos al aceptor externo a través de una reacción de TE mediada por el camino químico que se describe en la Fig. 8. Por último, la incorporación de un grupo OH proveniente del solvente en la posición ecuatorial del Mo vuelve al sistema al estado inicial para comenzar un nuevo ciclo.

1.1.6. La cadena de TE interproteína de DgAOR. Su caracterización mediante EPR

Como ya se dijo al comienzo de la tesis, en este trabajo se tiene como objetivo estudiar experimental y teóricamente los cambios producidos en la cadena de TE de DgAOR en el estado *resting* y cuando esta enzima se encuentra realizando su actividad catalítica. Si bien el primero de los estados no tendría ninguna complicación para ser evaluado experimentalmente, en el segundo no se puede trabajar con los sustratos activos de DgAOR ya que no se ha obtenido hasta la fecha intermediarios catalíticamente competentes que permitan evaluar la constante J en esa situación. Por ello, utilizaremos compuestos inhibidores reversibles e irreversibles que funcionan como análogos de sustratos y que forman complejos estables con el sitio activo. De esta manera se pretende evaluar la interacción de intercambio J entre el ion Mo y el centro FeS1, la cual, como se explica en el Anexo 1 está relacionada con la k_{et} en procesos de TE cuando el camino químico y de TE es el mismo.

1.1.6.1. Los inhibidores de la AOR

Numerosos trabajos han demostrado que moléculas inhibidoras de la actividad catalítica de miembros de la familia XO, como arsenito, etilenglicol (EDO) y glicerol (GOL), interaccionan directamente con el sitio de molibdeno dando lugar a complejos estables de Mo(VI)[16,40,70,71]. En 2009 fueron reportadas las propiedades cinéticas de la *DgAOR* con estos inhibidores y analizadas las estructuras cristalográficas de los complejos con EDO y GOL[17]. Este trabajo demostró que en la *DgAOR* ambos inhibidores se coordinan al átomo de Mo y lo hacen reemplazando al ligando OH_x de éste. Desde el punto de vista funcional se vio que si bien ambas moléculas funcionan como inhibidores reversibles, GOL tiene carácter competitivo con los sustratos mientras que EDO presenta un patrón de inhibición mixto[17].

Comparando el sitio de Mo en cristalografías de rayos X para los casos inhibidos antes mencionados y la forma no inhibida, la estructura resuelta de la *DgAOR* no inhibida (Fig. 16.a) indica que los ligandos del Mo corresponden a dos grupos oxo, uno en posición apical (OM1) y otro ecuatorial (OR1), y un grupo hidroxilo en posición ecuatorial (OH_x), que establecería un puente de hidrógeno con el residuo GLU869. El ligando OH_x presenta una distancia de enlace Mo-O de aproximadamente 2,0 Å, ligeramente mayor a los otros dos O ligados al Mo, cuyas distancias son Mo-OR1 1,9 Å y Mo-OM1 1,7 Å. Para las especies inhibidas con EDO y GOL el entorno del Mo sufre un reacomodamiento debido a la ausencia del ligando OH_x y la coordinación con los alcoholes (Fig. 16.b,c). En estos casos, el ligando ecuatorial del Mo sigue siendo oxo, mientras que el ligando apical es identificado como un grupo hidroxilo. Se observa también que los alcoholes establecen puente hidrógeno con una cadena de agua, próxima al centro Mo y al residuo GLU869, facilitando la interacción entre ellos y el metal.

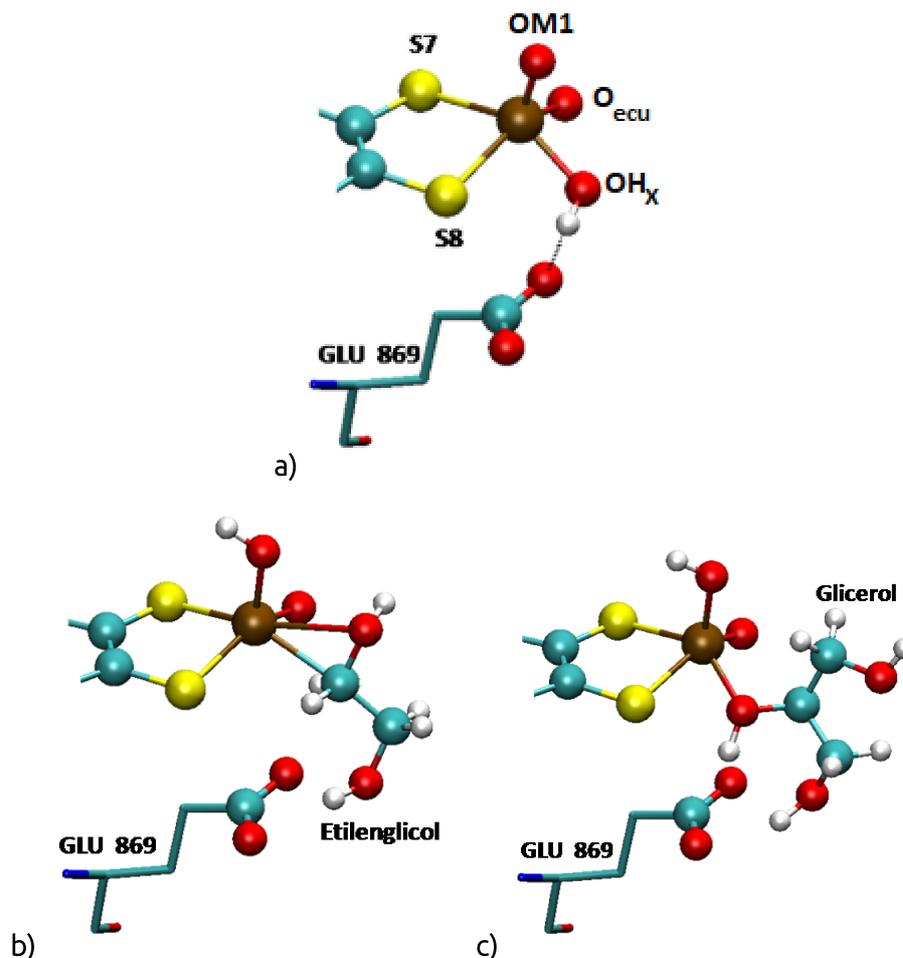


Fig. 16 - Representación de los sitios activos de *DgAOR* en su forma no inhibida (a) y los complejos *DgAOR*-EDO (b) (PDB 3FC4), *DgAOR*-GOL (c) (PDB 3FAH)

La coordinación del metal con el inhibidor EDO se da tanto con el átomo C2 como con el O2, a 2,4 y 2,7 Å respectivamente del Mo (ver Fig. 16.b). Ambos grupos hidroxilos del alcohol se encuentran estabilizados por puentes de hidrógeno, uno de ellos (O2H) lo establece con el ligando apical del centro metálico (OM1H), mientras que el otro con el grupo carboxilato del residuo GLU869. Cabe destacar que las posiciones de los átomos de H al no ser informadas en las cristalografías fueron añadidas mediante programas de modelado, solamente a los fines ilustrativos de los grupos, por tal motivo las orientaciones de los mismos pueden no estar en línea con la formación de los puentes de hidrógeno mencionados en la oración anterior. El C2 se encuentra aproximadamente coplanar a los átomos S7, S8, y OR1 del sitio metálico, mientras que el enlace C2-O2 de EDO es prácticamente perpendicular a dicho plano.

El GOL se coordina al metal de una manera diferente que el EDO (ver Fig. 16.c). Este inhibidor permanece unido sólo por el átomo O2 al Mo, a una distancia de 2,0 Å, ocupando la posición del átomo de O del OH_x de la forma no inhibida, mientras que el C2 se encuentra a 2,7

Á. Por otro lado, el enlace C2-O2 se encuentra en el plano definido por los átomos S7, S8, y OR1 del sitio de Mo. El GOL también forma dos puentes de hidrógenos pero en este caso el O2 lo hace con el residuo GLY697; el otro enlace es entre otro grupo hidroxilo del alcohol con el residuo catalítico GLU869.

A partir de las descripciones estructurales y funcionales comentadas se observa que las formas inhibidas presentadas tienen comportamientos similares al de los sustratos y, por ende, pueden ser utilizadas para obtener información relevante sobre el paso del mecanismo catalítico correspondiente a la situación en la que se forma el producto de la reacción, con el mismo aun permaneciendo a una distancia de enlace del átomo Mo.

1.1.6.2. EPR de la DgAOR

Como se comentó en secciones anteriores, la AOR contiene tres centros metálicos: centro de Mo y los 2 centros del tipo [2Fe-2S] (Fig. 6), que en estados de oxidación determinados (ver Tabla 2) presentan un valor de $S=1/2$ por lo cual pueden ser estudiados mediante EPR para obtener información sobre la estructura electrónica de cada centro y evaluar la existencia de interacciones espín-espín entre ellos.

Tabla 2 - Estados de oxidación y configuraciones electrónicas de los diferentes centros redox presentes en AOR. Resaltados en anaranjado los que pueden dar señal de EPR

Mo: Mo \rightarrow [Kr] 4d ⁵ 5s ¹	[2Fe-2S]: 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

Los miembros de la XO son ejemplos de proteínas que presentan acoplamiento entre espines mediados por interacciones débiles de superintercambio isotrópico en sistemas biológicos [11,12,72]. Si bien estas proteínas presentan acoplamiento entre centros de a pares (Mo-FeS1 y FeS1-FeS2), en este trabajo nos centraremos en el estudio del acoplamiento Mo-FeS1 de acuerdo con el objetivo 2 propuesto para la AOR. La razón de ello es que este acoplamiento está mediado por el camino químico que se muestra en la Fig. 17, y ha sido postulado como el camino de TE entre el Mo y FeS1 durante la catálisis. Esta reacción de TE involucra el pasaje de electrones desde la piranopterina a la CYS139, por medio de un puente hidrógeno entre el N terminal del cofactor y el azufre del aminoácido mencionado (ver Fig. 17).

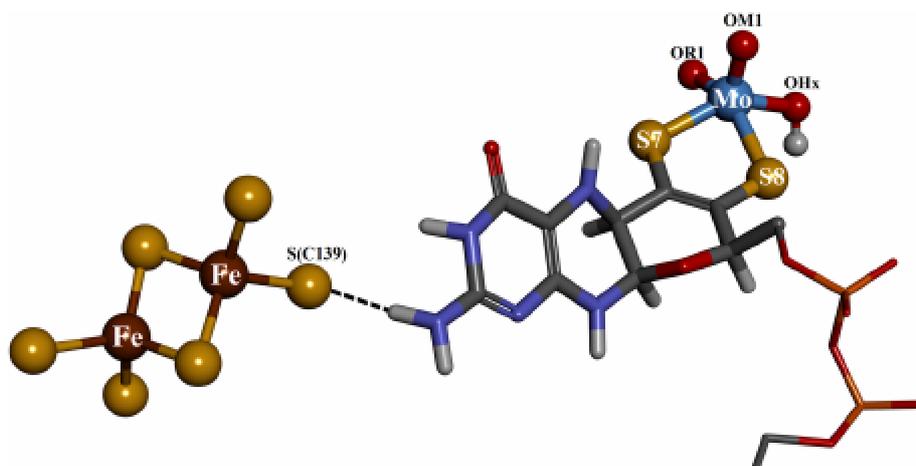


Fig. 17 - Camino químico de TE entre el sitio de Mo y el centro FeS1

Los estudios mediante EPR analizados en este trabajo corresponden a muestras *wild-type* de *DgAOR* y a las formas inhibidas con alcoholes antes mencionados [73]. Todos los espectros (ver Fig. 18) fueron obtenidos en banda X. Las muestras *wild-type* preparadas en D_2O fueron reducidas con exceso de ditionito durante 20 minutos, bajo condiciones anaeróbicas, obteniéndose la señal de EPR denominada *slow* (Fig. 18. panel izquierdo espectro a) que puede ser detectada en el rango de temperatura de 4-150 K [20]. La muestra se prepara en D_2O para “anular” la interacción hiperfina que presenta el sitio de Mo(V) con un protón intercambiable con solvente y, de esta manera, simplificar el análisis de los espectros de EPR. El mismo espectro pero a 20 K se muestra en la Fig. 18. panel derecho espectro a).

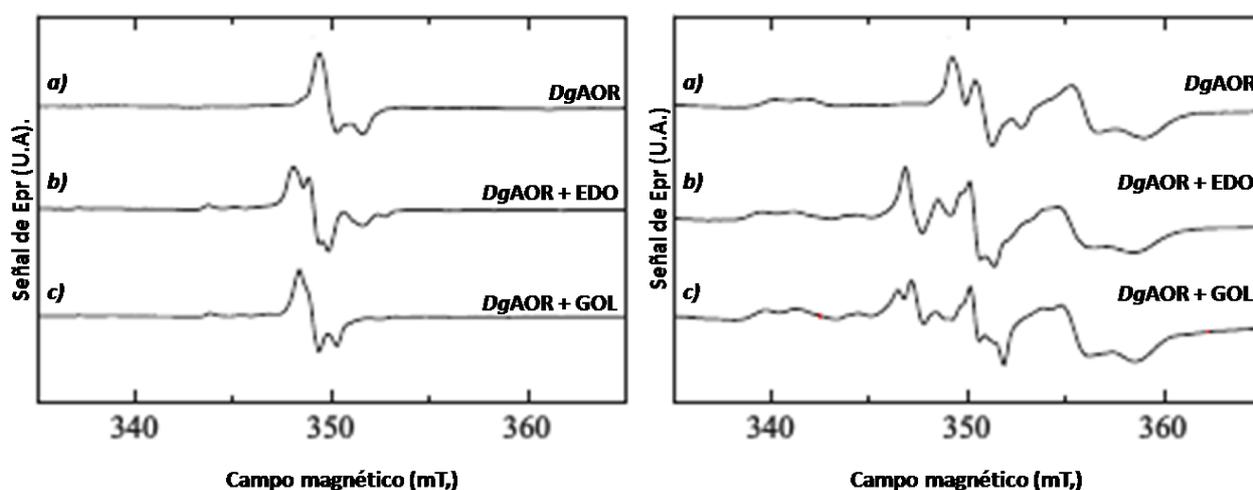


Fig. 18 - Espectros de EPR de *DgAOR* reducida con ditionito en condiciones de temperatura 140 K (panel izquierdo) y 20 K (panel derecho) con frecuencia de microondas de 9,65 GHz y D_2O como solvente. Las señales corresponden a la denominada *Slow a*), a la forma inhibida con EDO b) y al complejo con GOL c).

La señal *slow* tiene simetría aproximadamente axial con los siguientes valores de $g_x=1,971$, $g_y=1,969$, $g_z=1,959$. En los espectros a bajas temperaturas puede verse que dicha señal sufre un desdoblamiento debido al acoplamiento con el FeS1 y, adicionalmente, se observan las señales de los dos centros FeS (FeS1, $g_x = 2,023$, $g_y = 1,938$, $g_z = 1,919$; FeS2, $g_x = 2,060$, $g_y = 1,998$, $g_z = 1,900$). Cabe destacar que la señal a 140 K no muestra el acoplamiento Mo-FeS1 debido a la alta velocidad de relajación del centro FeS1 en esas condiciones de temperatura[74], que impide detectar el acoplamiento. En la señal a 20 K puede observarse el efecto de la presencia del FeS2 sobre el g_x de la señal del FeS1, y si bien podría esperarse un desdoblamiento de la señal del FeS1 por su interacción con el Mo, este no se observa debido a que sólo alrededor de un 10% del Mo está como Mo(V), mientras que los dos centros FeS están totalmente en su forma paramagnética con $s=1/2$. Esto determina que sólo un 10% del par Mo-FeS1 se encuentra magnéticamente acoplado y dicho efecto se vuelve imperceptible.

En las muestras de *DgAOR* con EDO (Fig. 18, espectros b) o GOL (Fig. 18, espectros c) se pueden observar las señales de EPR de los diferentes cofactores metálicos de la proteína y el efecto de la temperatura en el desdoblamiento de la señal de Mo por la interacción con FeS1. La señal a 140 K presenta simetría rómbica (EDO, $g_x = 1,978$, $g_y = 1,972$, $g_z = 1,968$; GOL, $g_x = 1,977$, $g_y = 1,973$, $g_z = 1,966$ Fig. 18.a) en vez de la típica señal axial de la especie *slow*. Esta característica de la señal indica una mayor distorsión del sitio de Mo en presencia de alcoholes lo cual está en línea con los cambios estructurales mencionados anteriormente (ver sección 1.1.6.1.).

Otra diferencia importante con las señales de las muestras inhibidas, es que el desdoblamiento que sufre la señal de Mo(V) es aproximadamente dos veces mayor que la observada en la forma no inhibida. Por otra parte, los espectros asociados a los centros FeS en todas las formas de *DgAOR* indican una dependencia, esencialmente idéntica, entre los valores g y la temperatura, lo que sugiere, y ha sido confirmado por cristalografía de rayos X[11], que tanto las estructuras de los mismos como los caminos químicos que los conectan no se ven afectados por la inhibición de la proteína.

Los resultados de EPR en *DgAOR* han permitido identificar que el camino químico Mo-FeS1 (Fig. 17) es capaz de transmitir una débil interacción de intercambio [72,74,75], la cual puede ser detectada a temperaturas inferiores de los 60 K. A su vez, las muestras tratadas con inhibidores como GOL y EDO han demostrado que en los sistemas inhibidos la interacción de intercambio Mo-FeS1 aumenta significativamente y que dicha interacción depende de la naturaleza del inhibidor[17].

1.1.6.3. Análisis teórico (o simulación) de los espectros de EPR

Con el objetivo de tener una interpretación más precisa de las señales obtenidas por EPR y de poder cuantificar el valor de J , se realizaron simulaciones de los espectros utilizando el toolbox EasySpin [76] bajo el programa MATLAB®. Si bien la $DgAOR$ corresponde a un sistema de 3 espines y debería ser analizado con un Hamiltoniano de espín completo, que incluya tanto los términos Zeeman asociados a los centros de tres espines el desdoblamiento de la señal de Mo se debe únicamente al acoplamiento Mo(V)-FeS1, mientras que el que se produce sobre la señal del g_x de FeS1 se debe al intercambio con FeS2 [75,77]. Por ello, el sistema puede estudiarse considerando dos pares de espines interactuantes independientes entre sí, centrando nuestro análisis en el par Mo-FeS1. El Hamiltoniano de espín, para el par Mo-FeS1 está dado por la Ec. A1.5 (ver Anexo I) donde \mathbf{g}_1 y \mathbf{g}_2 son las matrices g asociadas al Mo(V) y FeS1, respectivamente, J es la constante de interacción de intercambio isotrópico, \mathbf{I} es la matriz unidad, \mathbf{D} es tensor simétrico de segundo orden con traza cero, y el resto de los símbolos tienen su significado usual en resonancia magnética. Se asume que \mathbf{D} está determinado por la interacción dipolo-dipolo bajo la aproximación de dipolo puntual, ya que existen experimentos con sistemas modelo que muestran que la aproximación dipolo puntual es apropiada para analizar pares de espines interactuantes con $S=1/2$ separados al menos 3,4 Å que presenten intercambio [78].

Las simulaciones de los espectros experimentales a 20 K (Fig. 19, espectros negro) utilizando la Ec. A1.5 del Anexo I se muestran en rojo. Los valores de g para Mo fueron obtenidos en los espectros a altas temperaturas (espectros a 140 K en Fig. 18 panel izquierdo), mientras que los del FeS1 a 50 K, ya que a esta temperatura el espectro de FeS1 no muestra acoplamiento FeS1-FeS2. Estos valores fueron usados para simular el desdoblamiento de la señal de Mo(V) a bajas temperaturas (Fig. 19) provocado por el acoplamiento magnético Mo(V)-FeS1. El valor de J obtenido para la señal *slow* fue de $-16,6 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ mientras que para las señales de los complejos $DgAOR+EDO$ y $DgAOR+GOL$ el valor obtenido de J en ambos casos fue de $-33,3 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$. En línea con lo observado cualitativamente en el experimento, los valores de J incrementan aproximadamente 2 veces en las muestras con los inhibidores respecto del obtenido en la señal *slow*.

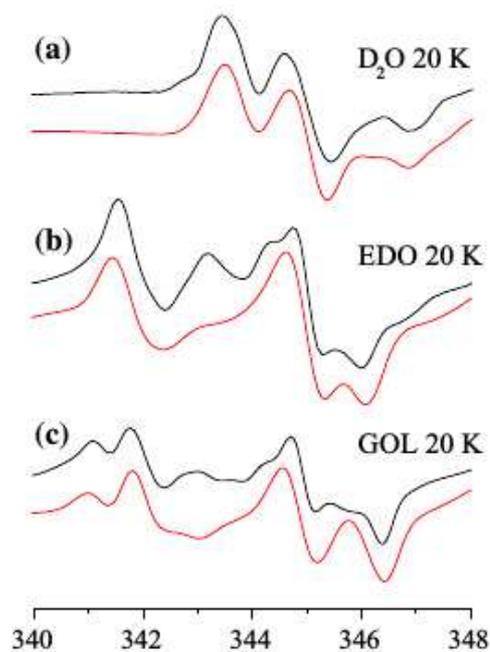


Fig. 19 - Espectros de EPR a 20 K del centro de Mo(V) junto con la simulación obtenida usando la Ec 1.2.3 (rojo). para $DgAOR$ reducida y con solvente D_2O (a) ($m = 9,64$ GHz) (a), $DgAOR$ -EDO (b) y $DgAOR$ -GOL (b y c con $m = 9,49$ GHz).

1.1.6.4. Análisis de los cambios en J

La magnitud de la interacción de intercambio entre dos centros paramagnéticos queda determinada principalmente por la distancia entre ellos y la topología estructural del camino químico que los une [79,80]. La dependencia de J con la distancia fue analizada empíricamente por Hoffman *et al.* [79], quienes establecieron que J disminuye con una exponencial decreciente para caminos químicos largos ($|J| < 0,1 \text{ cm}^{-1}$). El segundo factor, la topología del camino químico, condiciona tanto la magnitud como el signo de J. Es evidente que cuando más largo es el camino químico, menor es el J, en línea con lo establecido por Hoffman *et al.*, mientras que, si bien no hay una razón a priori, el J asociado a caminos químicos largos es siempre antiferromagnético ($J < 0$).

El valor de J puede ser analizado en base al modelo cualitativo propuesto por Kahn que usa orbitales moleculares no ortogonales centrados en cada especie paramagnética, siendo el valor de J proporcional a las densidades electrónicas superpuestas en los átomos del puente químico $\rho(i) = \Phi_1(i)\Phi_2(i)$ [80] donde, para el sistema estudiado, Φ_1 y Φ_2 son los orbitales magnéticos de Mo(V) y FeS1 respectivamente. Debido a que el puente que une Mo y FeS1 en

DgAOR es muy extenso, (Fig. 17), se espera que la densidad de espín desapareado esté deslocalizada entre todos los átomos que forman el puente para favorecer a la transmisión de la interacción de intercambio.

Trasladando la información anterior a nuestro caso en estudio se pueden plantear tres hipótesis que explicarían los cambios en J: a) modificación de la distancia entre los centros; b) cambios en los orbitales moleculares del centro FeS1; c) cambios en los orbitales moleculares del Mo. La hipótesis b se descarta sin necesidad de recurrir a estudios adicionales, debido a que, como se discutió arriba, las señales de EPR del centro FeS1 no sufren modificaciones entre las formas inhibidas y la no inhibida. En este trabajo se propone realizar un estudio teórico-computacional para obtener las estructuras de los tres sistemas y con dichas estructuras encontrar cual de las hipótesis restantes es correcta.

1.2. Objetivos

1. Evaluar mediante métodos computacionales QM/MM el mecanismo catalítico de la enzima. Para esto se realiza el modelado de las estructuras de los posibles intermediarios, la búsqueda de los estados de transición y el cálculo de la energética del proceso.
2. Evaluar las propiedades electrónicas de los cofactores metálicos de la enzima mediante métodos computacionales y correlacionarlas con mediciones espectroscópicas de EPR y resultados estructurales. Se pretende entender cómo es el mecanismo disparador de la TE intraproteína cuando el sustrato o un análogo de él se une al sitio activo de la enzima.

1.3. Materiales y métodos

El equipamiento computacional, así como los equipos de obtención de espectros de EPR y UV-VIS discutidos en este trabajo están descritos en el Anexo II.

1.3.1. Estudio del mecanismo catalítico de *DgAOR*

Los cálculos computacionales se realizaron utilizando el método ONIOM (ONIOM-EE) (ver Anexo I) basados en diferentes estructuras de *DgAOR*, resueltas por el grupo colaborador de Portugal [81]. El sistema se preparó inicialmente con la estructura correspondiente al estado *resting* de la enzima (estructura adaptada de la cristalografía PDB 1VLB[39]). La estructura fue

solvatada con una esfera de agua de 35 Å de radio centrada en el átomo de Mo y se agregaron átomos de Na para neutralizar las cargas del sistema. Tanto las aguas de solvatación como los átomos de hidrógeno de todos los residuos proteicos fueron relajados, para evitar contribuciones estéricas espúreas, con métodos clásicos utilizando el código NAMD[82] y el campo de fuerzas CHARMM22[83]. Luego se calcularon las cargas de Mulliken para el cofactor de Mo, los centros FeS y la molécula de bicarbonato, presente en la estructura cristalográfica, para ser usadas en los cálculos QM/MM. En particular, por razones computacionales el cofactor de Mo fue tratado con dos niveles de cálculo. QM para los átomos de piranopterina y los ligandos del Mo y MM para la región de fosfatos y nucleótido. Entonces, el modelo QM/MM correspondiente al estado *resting* de la proteína consistió en 163 átomos en la región QM, incluyendo los átomos del cofactor de Mo que integran los dos anillos de piranopterina, el grupo ditioleno y los ligandos del Mo; la cadena lateral del aminoácido GLU869, los átomos de los aminoácidos PHE 425, PHE494, ALA531, PHE532, ARG533, GLY534, TYR535, LEU626, GLY696, GLY697, SER698 que forman parte de la cavidad y estabilizan los ligandos del Mo y la carga del GLU869. El resto del sistema es tratado de forma clásica (ver Fig. 20. El átomo O_{ecu} corresponde a OR1 en la cristalografía [39] mientras que el O apical es OM1).

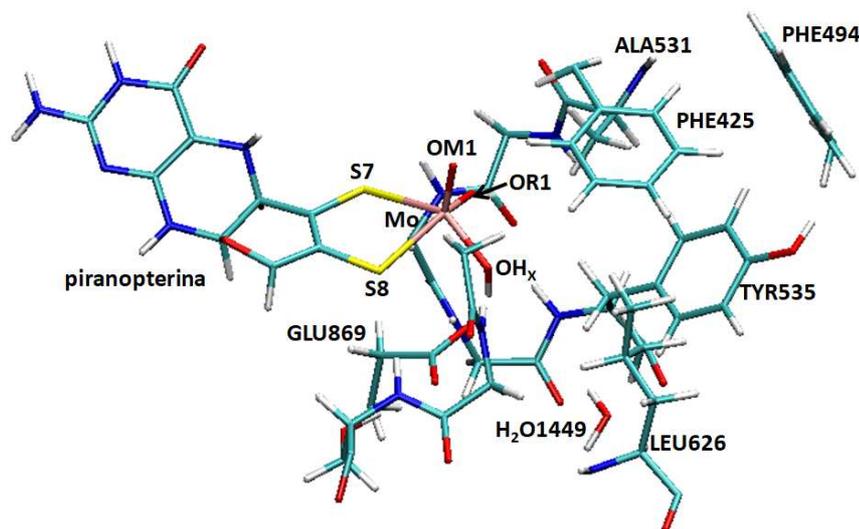


Fig. 20 - Representación de la región cuántica utilizada para el cálculo de la estructura del estado *resting* de la enzima. Los átomos no visualizados corresponden a la región clásica del sistema. Por claridad en la imagen se identifican solo los residuos catalíticos o que forman parte de la cavidad hidrofóbica, la molécula de agua cercana al GLU869 y los átomos del sitio activo de Mo

La metodología empleada consistió en evaluar la energética de los estados intermediarios y de transición (TS) que fueron en líneas generales obtenidos de la propuesta de Metz *et al.* Para la obtención de los estados intermediarios se partió de la estructura optimizada del estado

resting agregando la molécula del sustrato/producto y modificando las coordenadas de los átomos del sitio para obtener aproximaciones iniciales de cada estado que luego fueron optimizados. Las posiciones de los átomos de sustrato/producto iniciales se obtuvieron respetando la posición del grupo aldehído de las estructuras cristalográficas de *DgAOR* con diferentes sustratos [81] reemplazando, cuando correspondiera, el R original del sustrato por el correspondiente al benceno. La región cuántica del sistema se conservó igual al estado *resting* incorporando solamente a dicha región los átomos del sustrato/producto en la cavidad (ver Fig. 21). La región cuántica se describió con el funcional WB97XD [84] y con la base 6-31G* en los átomos C, S, N, O e H, mientras que para el átomo de Mo se seleccionó la base con *effective core potential* (ECP) LANL2DZ[85–87]. Para la región clásica se utilizó el campo de fuerzas AMBER modificando las cargas de los átomos de los centros FeS, molécula de bicarbonato y los átomos del cofactor de Mo para utilizar las cargas de Mulliken calculadas.

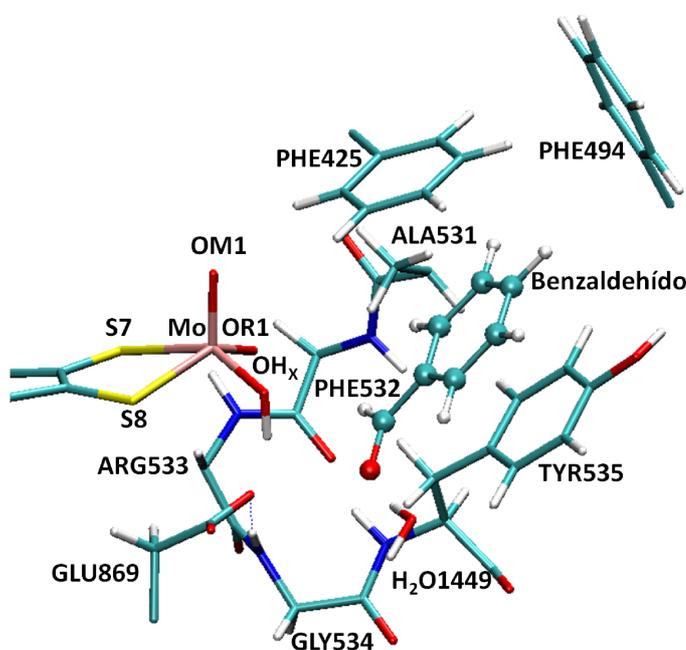


Fig. 21 - Representación del sustrato en la cavidad cuántica utilizada en los cálculos. Por claridad no se representan los átomos cercanos al aminoácido GLU869 que ya fueron mostrados en la Fig. 20. El sustrato benceno se representa con *CPK* mientras que el resto del sistema con *licorice*

Para las optimizaciones se dejaron libre de movimiento el átomo de Mo, los átomos de su primera esfera de coordinación que incluyen: los grupos oxo, S7, S8 y OH unidos a él; la cadena lateral del residuo GLU869, las cadenas laterales de los residuos que forman la cavidad de unión del sustrato y cuando corresponda, el sustrato/producto.

Las diferencias fundamentales de nuestra metodología en relación a lo realizado por Metz *et al.* radican en cómo se obtuvieron los estados de transición, ya que no se consiguió emplear el algoritmo Berny [88] ni el método STQN [89,90], porque el programa Gaussian no funcionó correctamente con el sistema QM/MM que adoptamos. Se intentó además hacer los cálculos considerando solo la parte cuántica del sistema, pese a que esta aproximación hacía perder la contribución del entorno proteico, procedimiento que también fue descartado ya que los cálculos no arrojaron resultados aceptables. La metodología que se utilizó para determinar como se pasaba de un estado intermediario a otro, sea a través de un TS o produciéndose de manera espontánea, fue perturbar al sistema en pasos de $\sim 0,1 \text{ \AA}$, fijando la coordenada de reacción (por ejemplo el desplazamiento del H_x del O_{cat} del Mo al O del GLU869 para obtener el estado TS_{B-C} , o el acercamiento del sustrato al sitio activo), seguido de procesos de relajación hasta obtener la energía del sistema en esas condiciones. Esto permitió obtener el desplazamiento de los átomos siguiendo el gradiente de energía. Este procedimiento fue repetido hasta lograr que el sistema llegue al estado final de cada paso. Adicionalmente, algunos de los estados intermediarios mostrados en la Fig. 15 corresponden a estados cuyas estructuras fueron obtenidas por cristalografía de rayos X en *DgAOR* de las cuales algunas ya han sido publicadas en el PDB [81]

Para buscar el estado de transición TS_{B-C} la coordenada de reacción que se utilizó fue el desplazamiento del H_x del O_{cat} al O del GLU869. Para los estados TS_{C-D} y TS_{D-E} se realizó el movimiento del sustrato en dirección al O_{cat} . Por último la coordenada de reacción del TS_{E-F} correspondió a la transferencia del H_C desde el sustrato hacia el O_{ecu} del Mo.

1.3.2. Estudio del proceso de TE

El estudio de las propiedades electrónicas de átomos por métodos computacionales requiere tener la estructura tridimensional del sistema en estudio. En nuestro caso, además, queremos evaluar si ocurren modificaciones en dichas propiedades o en la estructura del camino químico en presencia de inhibidores, que pueden ser interpretados como análogos de sustratos, para entender el comportamiento de dicho puente durante la catálisis enzimática y la razón por la cual el parámetro J duplica su valor en los espectros de EPR cuando el sitio de Mo se encuentra coordinado a diferentes moléculas.

Si bien se conocen las estructuras de *DgAOR* no inhibida e inhibidas con alcoholes EDO y GOL, estas tres estructuras fueron obtenidas con el Mo oxidado, es decir en estado +VI. Dado que los cálculos teóricos pretenden complementar los ensayos experimentales realizados con

muestras con Mo(V) ($S=1/2$), para poder llevar a cabo nuestro trabajo precisamos obtener las tres estructuras de los sistemas con el Mo en ese estado de oxidación.

Previo a obtener las estructuras con el Mo en la forma de Mo(V), obtuvimos las estructuras optimizadas computacionalmente en las formas inhibidas y no inhibida con el Mo(VI). Lo que se persiguió fue poder comparar las estructuras obtenidas computacionalmente con las cristalográficas, y así poner a punto las técnicas utilizadas en la obtención de las estructuras desconocidas. La estructura de *DgAOR* no inhibida usada para los cálculos computacionales se encuentra depositada en el PDB bajo el código 1VLB [39]. Para el caso de los complejos inhibidos con alcoholes, estos últimos fueron agregados a la estructura no inhibida, en las posiciones correspondientes a las moléculas de EDO y de GOL de acuerdo con las estructuras 3FC4 y 3FAH, respectivamente[17]. La protonación de los residuos de la proteína se obtuvo para pH 7 utilizando el programa *pdb2pqr*[91], que emplea el algoritmo *propka*[92,93] y con verificación visual de los residuos catalíticamente relevantes. Además se removieron las aguas cristalográficas, se solvató el sistema con una esfera de agua de 30 Å de radio, centrada en el Mo y se agregaron iones Na^+ para neutralizar las cargas.

Para la optimización de las posiciones atómicas se utilizó la metodología híbrida QM/MM, explicada en el Anexo 1, empleando el software Gaussian 09[94]. La región cuántica incluye el cofactor de molibdeno, con el grupo citidina dinucleótido truncado, saturando la coordinación con un grupo metilo; los inhibidores (cuando corresponda) y el residuo GLU869, debido a su importancia en la formación de puentes de hidrógeno con los inhibidores y átomos ligandos del Mo. Se utilizó el funcional WB97XD[84], con la base 6-31G* para todos los átomos a excepción del Mo. Para reducir el número de electrones que tiene el Mo se utilizaron pseudopotenciales, tratando explícitamente sólo los electrones de la última capa, la base elegida para este átomo fue Lanl2DZ[86,95] que incluye correcciones relativistas. Los átomos que conforman la región MM fueron tratados con el campo de fuerza AMBER e incluyen todos los demás residuos de la proteína, los centros FeS, las aguas de solvatación y los iones Na^+ .

Luego de obtener las estructuras con Mo(VI) se realizaron optimizaciones de la estructura con la configuración electrónica Mo(V), dejando libres de movimiento los átomos del cofactor de Mo, los inhibidores, el grupo COO^- del residuo GLU869 y los átomos H de la región MM. En relación a los inhibidores EDO y GOL, se asumieron todos los oxígenos protonados debido a dos razones: a) los alcoholes poseen un valor de pK_a muy elevado en medios acuosos (próximo a 14), lo cual sugiere que los polialcoholes están completamente protonados en la solución antes de entrar al canal de ingreso del sustrato; b) el carácter reversible de los alcoholes como inhibidores

y el valor competitivo de la constante de inhibición ($K_{i,c}$), que sugiere que los alcoholes se unen con menos fuerza que los sustratos al Mo[17]. Discusiones posteriores nos hicieron cuestionar si la interacción Mo-O2 podría disminuir el valor de pKa del alcohol, se procedió entonces a evaluar las energías del sistema con las formas alcóxido de los alcoholes y su interacción con la DgAOR.

1.4. Resultados y conclusiones

1.4.1. Estudio del mecanismo catalítico de DgAOR

Con la configuración de los diferentes sistemas explicados en secciones anteriores, pudimos obtener las estructuras optimizadas de los estados **A**, **B**, **C**, **E** y **F**. El estado **D** fue replanteado como un estado transiente denominado **D*** que será explicado más abajo.

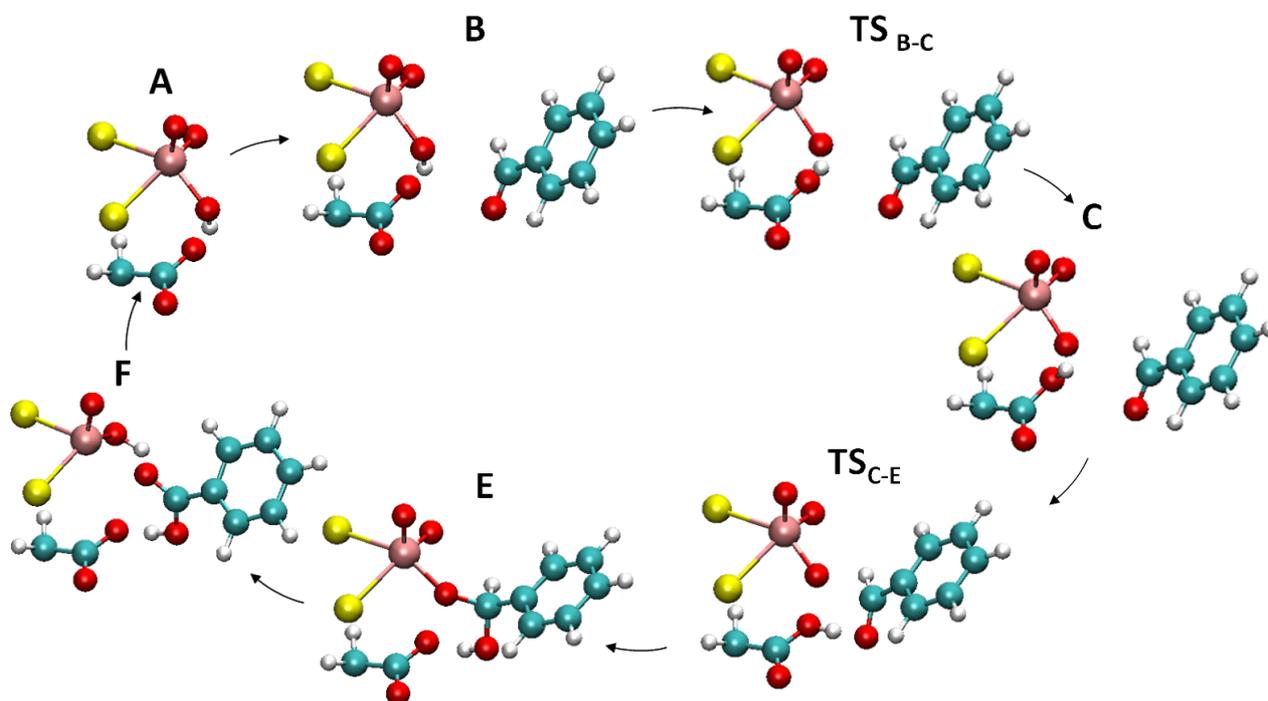


Fig. 22 - Estructuras finales de los estados obtenidos para el mecanismo catalítico de DgAOR estudiado en este trabajo. Los aminoácidos que forman parte de la cavidad hidrofóbica no se incluyen para claridad en la imagen.

Los estados de transición informados en este trabajo no son estructuras finales optimizadas como estados de transición sino que son potenciales estados de transición debido a que, como ya se explicó más arriba, no se pudo realizar la búsqueda de los mismos por el algoritmo Berny

implementado en Gaussian. La Fig. 22 muestra las estructuras finales obtenidas para cada estado.

La estructura obtenida para el estado **A** (ver Fig. 22 estado **A**) es muy similar a la obtenida en estudios cristalográficos preliminares (estructura aún no reportada) y también a los resultados de los cálculos computacionales presentados en 1.1.5.2. y 1.1.5.3.. La distancia Mo-O_{cat} es de 1,92 Å, compatible con un grupo OH en sistemas mononucleares de Mo. Es importante mencionar que se evaluó una estructura alternativa para el estado *resting* en la cual se asumió al ligando OH_x como grupo oxo y el GLU869 protonado (GLU869-H_x). Para ello se computó la energética de transferencia del H_x desde el grupo lábil catalítico al O del GLU869. Con este procedimiento se encontró que existe solo un mínimo de energía para el protón H_x unido al O_{cat} y que mover el H_x en dirección del GLU869 para protonar su grupo carboxilato es ~13 kcal/mol mayor y, por lo tanto, energéticamente desfavorable. Dicha conclusión es consistente con los datos cristalográficos disponibles para este estado, los que indican que la distancia Mo-O corresponde a la de un grupo hidroxilo/agua. Para el resto de los ligandos del Mo las distancias son Mo-S7 2,48 Å, Mo-S8 2,59 Å, Mo-O_{ecu} 1,71 Å y Mo-OM1 (ligando apical del Mo) 1,70 Å. Por último, la distancia O_{cat}-H_x es de 1,00 Å, mientras que la de H_x con el O de GLU869 es de 1,69 Å. De comparar los estados A y B puede observarse que la incorporación del sustrato en la cavidad implica una reorganización del entorno molecular alrededor del sustrato. Esto consiste en un aumento del volumen de la cavidad y una distorsión de la molécula de sustrato, en la que el plano del grupo aldehído, que se presenta coplanar en forma libre, pasa a tener un ángulo de 9,6° respecto al plano definido por el anillo del benceno (Fig. 22 estado **B**). El sitio de Mo presenta ligeras modificaciones en las distancias de enlace pero del orden de 0,01 Å. Debido a la presencia del sustrato en la cavidad para el estado intermediario **B** se encontró que la transferencia del H_x del O_{cat} al GLU869 se encuentra energéticamente favorecida, al contrario de lo observado para el estado **A**, obteniendo así el estado **C**. El estado de transición **TS_{B-C}** se produce cuando la distancia O_{cat}-H_x es de ~1,36 Å, mientras que la distancia del H_x al O del GLU869 es de ~1,39 Å. Debido a la baja barrera de energía que tiene el **TS_{B-C}** (ver Tabla 3 y Fig. 23) y que las energías de los estados **B** y **C** son prácticamente iguales, pensamos que puede existir un equilibrio entre ambos estados. En la Tabla 3 y Fig. 23 se muestran las energías obtenidas por cálculo relativas al estado **B**.

Tabla 3 - Energías en kcal/mol relativas al estado **B** calculadas sobre el sistema QM

Estado	Energía QM relativa a B [kcal/mol]
B	0
TS_{B-C}	3
C	0
TS_{C-E}	+15,7
E	-2
TS_{E-F}	No pudo ser hallada
F	-17

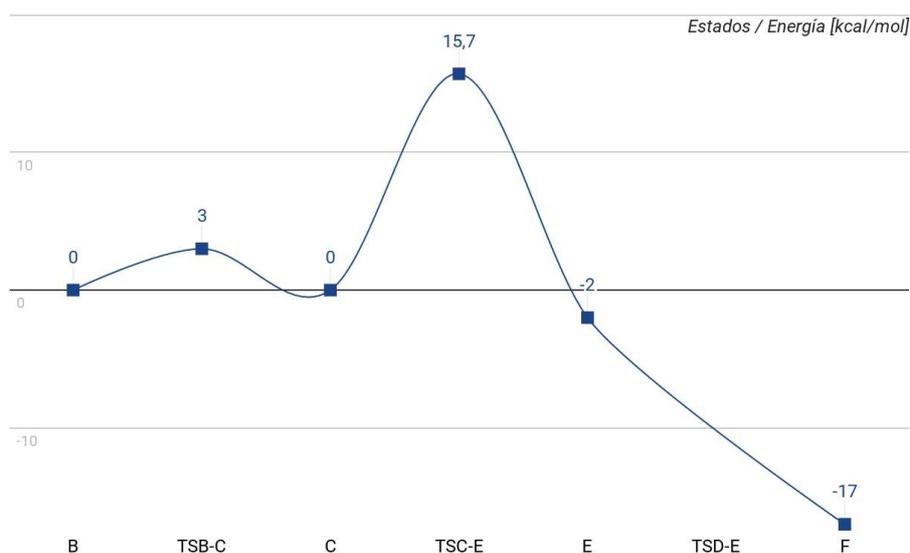


Fig. 23 - Perfil energético obtenido del mecanismo propuesto. Valores de energía en kcal/mol relativos al estado **B**.

En la búsqueda del estado de transición **TS_{C-D}** (ver Fig.15) notamos que el H_x permaneció unido al GLU869 mientras no se formó un enlace fuerte $O_{cat}-C_{ald}$ (distancia $O_{cat}-C_{ald} > 2,00 \text{ \AA}$) y que la formación del mismo produce la transferencia inmediata del H_x al sustrato para dar el estado **E**. De esta manera encontramos que lo que inicialmente había sido propuesto como una sucesión de los estados **TS_{C-D}**, **D** y **TS_{D-E}** es en realidad un proceso que se da de forma concertada, denominado ahora **TS_{C-E}**, y que involucra varios subprocesos que tienen lugar únicamente por el acercamiento del sustrato al sitio activo del Mo: i) el sustrato se acerca al sitio activo y al GLU869 de manera que se establece una competencia por el H_x entre el GLU869, el O_{cat} y el O_{ald} ; ii) la interacción del O_{ald} con el H_x vuelve más electrofílico el C_{ald} favoreciendo su interacción con el O_{cat} ; iii) se pierde la interacción del O_{cat} con el H_x y se produce la rotación del último en dirección al O_{ald} . Todos estos subprocesos aumentan constantemente la

energía de los distintos intermediarios, obteniéndose el máximo en el TS_{C-E} . Debido a estos resultados se concluyó que nuestra hipótesis inicial para la transición **C-D-E** no era correcta, ya que no se logró un estado **D** como intermediario. Cabe mencionar que el estado **D** propuesto en la Fig.15 si bien no está presente en el mecanismo de Metz *et al* ilustrado en la Fig. 14, fue incluido en nuestro trabajo ya que estos autores habían informado que para el caso particular de benzaldehído como sustrato se requería dicho paso intermedio previo a la formación del estado **E**, en el cual el grupo $(HCO)_{ald}$ adopta una conformación tetraédrica. En la Fig. 22 se muestran los resultados de los cálculos en los que no se incluyen los estados TS_{C-D} , **D** ni TS_{D-E} porque, como se dijo anteriormente, se dan de forma concertada. Consecuentemente, deberíamos cambiar la nomenclatura y redefinir los distintos estados y TS del proceso catalítico, lo cual no se hará para no complicar la nomenclatura. Entre las particularidades que notamos es importante remarcar que el estado de transición entre **C** y **E** (TS_{C-E}), el cual corresponde al momento en que el C_{ald} se encuentra a 2,03 Å del O_{cat} , presenta el grupo $(HCO)_{ald}O_{cat}$ levemente tetraédrico y las distancias de H_x al O del GLU869 y al O_{ald} son de 1,03 Å y 1,54 Å respectivamente (Fig. 22 estado TS_{C-E}). En el estado **E** la distancia $O_{cat}-C_{ald}$ es de 1,46 Å mientras que el ángulo entre el enlace $C_{ald}-O_{cat}$ y el plano que contiene el anillo del benceno es de 112,61°. El H_x permanece unido al O_{ald} , a una distancia de 1,00 Å, mientras que al O del GLU869 la distancia es de 1,66Å. La obtención del estado TS_{E-F} no pudo ser claramente establecida por cálculos, ya que no se pudo identificar un factor desencadenante del proceso de transferencia del H_c como en los casos anteriores. Probablemente la complejidad de este proceso haga que la obtención por métodos computacionales del estado de transición correspondiente no sea trivial, ya que la mínima perturbación del estado **E** en dirección del **F** produjo resultados que no convergieron o terminaban directamente en el estado **F**. En el estado **F** el grupo ácido del ahora ya considerado producto adopta una estructura planar, como es de esperar, siendo el ángulo entre el grupo benceno y el grupo ácido de 41,7°. La distancia $C_{ald}-O_{cat}$ es 1,24 Å y la distancia $Mo-O_{cat}$ 2,25Å.

Es importante mencionar que la estructura del estado intermediario **E** fue inicialmente propuesta por el grupo cristalográfico colaborador como un intermediario con el grupo $(HCO)_{ald}O_{cat}$ en conformación planar. Esta propuesta surgió a partir de una estructura cristalográfica con butiraldehído como sustrato (estructura aún no publicada en PDB), que ubicaba al grupo $(HCO)_{ald}O_{cat}$ en forma planar. Computacionalmente nosotros utilizamos diversas aproximaciones para obtener esa configuración, pero en todos los intentos el grupo $(HCO)_{ald}O_{cat}$ quedaba con una estructura tetraédrica, es decir, con la estructura propuesta en el mecanismo actual. La obtención *in silico* de este intermediario tetraédrico (también identificado por Metz *et al* en sus cálculos computacionales del mecanismo catalítico [69]) contribuyó para reinterpretar las densidades electrónicas de la difracción de rayos X de las estructuras de *DgAOR* con

acetaldehído y formaldehído como sustratos. De esta manera los cálculos computacionales contribuyeron a corregir las estructuras de estos estados intermedios de *DgAOR*, interpretando las densidades electrónicas obtenidas como las estructuras de los intermedios tetraédricos que en ambos casos mostraron un mejor ajuste que la propuesta original.

De los estados intermedios antes descritos tenemos información experimental proveniente de estructuras cristalográficas para los estados **A** y parcial del **E**, ya que la estructura cristalina de este intermedio con benzaldehído no ha podido ser obtenida [81]. Del estado **F** no contamos con una estructura cristalográfica debido a que solo disponemos de una estructura con el sustrato más alejado del sitio activo, lo que representa una captura durante la salida del producto.

El hecho que el mecanismo catalítico propuesto por Metz pudo ser reproducido considerando un oxígeno en lugar del sulfido ecuatorial, que las estructuras predichas por cálculo concuerdan con las obtenidas por estudios cristalográficos, y que las energías entre los estados intermedios y TS tienen valores dentro de los esperables para un mecanismo catalítico, consideramos que se puede concluir que el sistema *DgAOR* en la forma "desulfo" puede realizar la catálisis de acuerdo con el esquema de la Fig. 22. No obstante, es importante remarcar que el perfil energético de la *DgAOR* involucra un costo energético superior respecto de las enzimas que tienen un sulfido ecuatorial, lo cual explicaría porque la mayor parte de este grupo de enzimas han incorporado un S en lugar de un O.

1.4.2. Estudio del proceso de TE

1.4.2.1. Obtención de las estructuras optimizadas con Mo(VI) y Mo(V)

Se analizó la estabilidad energética de los ligandos de Mo en los diferentes estados de protonación posibles, es decir, OM1 como hidroxilo y OR1 como oxo, y, además, en la variante OM1 oxo y OR1 hidroxilo. Los resultados teóricos indican que la segunda configuración es energéticamente más favorable en aproximadamente 9 y 16 kcal/mol para los complejos con EDO y GOL respectivamente. Entendemos que las diferencias obtenidas en algunas distancias (ver Tabla 4) y en la protonación de los ligandos del Mo entre el cristal y los cálculos es atribuible a que las condiciones de cristalización no son necesariamente las que tiene el sistema *in vivo* y por lo tanto podría modificarse ligeramente la estructura durante la cristalización.

Tabla 4 - Distancias entre los átomos de Mo y sus ligandos para Mo(VI)

	No inhibida		+EDO		+GOL	
Mo(VI)	Rayos-X	QM/MM	Rayos-X	QM/MM OM1(=O) OR1(-OH)	Rayos-X	QM/MM OM1(=O) OR1(-OH)
Mo-OM1	1,74	1,72	2,08	1,71	2,08	1,70
Mo-OR1	1,79	1,73	1,75	1,97	1,75	1,90
Mo-OH _x	1,99	1,88				
Mo-S7	2,41	2,55	2,32	2,45	2,34	2,42
Mo-S8	2,49	2,66	2,39	2,50	2,41	2,47
Mo-C2			2,36	3,10	2,72	3,22
Mo-O2			2,69	2,23	2,12	2,12

El estudio de las energías del sistema con las formas alcóxido de los alcoholes y su interacción con la *DgAOR* arrojó que efectivamente la forma protonada es la más conveniente. En la siguiente tabla (Tabla 5) se muestran las distancias del sitio de Mo obtenidas para el sistema con Mo(V).

Tabla 5 - Distancias entre el átomos de Mo y sus ligandos para Mo(V)

	Slow	+EDO		+GOL	
Mo(V) QM/MM	OM1(=O) OR1(-OH) OH _x	OM1(=O) OR1(-OH) -O2(EDO)	OM1(-OH) OR1(=O) -O2(EDO)	OM1(=O) OR1(-OH) -O2(GOL)	OM1(-OH) OR1(=O) -O2(GOL)
Mo-OM1	1,71	1,70	1,89	1,70	1,89
Mo-OR1	1,94	1,90	1,70	1,90	1,70
Mo-OH _x	1,90				
Mo-S7	2,50	2,44	2,44	2,45	2,50
Mo-S8	2,57	2,45	2,45	2,46	2,47
Mo-C2		3,00	3,01	3,17	3,18
Mo-O2		2,15	2,17	2,11	2,10

1.4.2.2. Cambios conformacionales en el camino químico Mo- FeS1 en condiciones de inhibición

Con el objetivo de identificar si el camino sufría cambios estructurales, en presencia de los inhibidores, se realizó la superposición de las diferentes estructuras del camino químico Mo-FeS1. En la Fig. 24 puede apreciarse que las posiciones de los átomos de la pironopterina y del centro FeS1 no se ven modificadas entre los tres sistemas estudiados, por lo tanto las distancias de los centros y los enlaces involucrados no son los responsables de la modificación del valor de J. Esta superposición también refuerza la conclusión de que los orbitales moleculares del centro FeS1 no sufren modificación durante la inhibición con alcoholes, ya que no se observa modificación de la estructura y coordinación del centro.

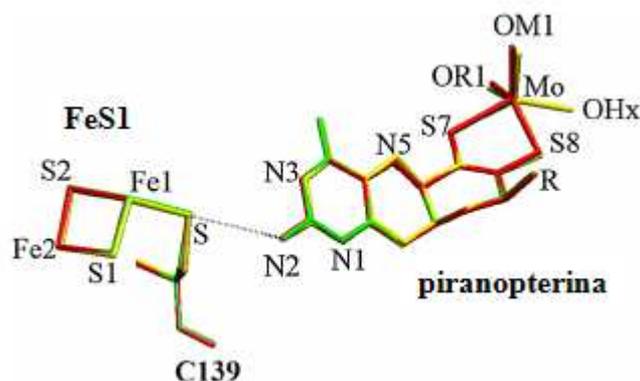


Fig. 24 - Superposición del camino químico entre el sitio de Mo y el centro FeS1 para las especies no inhibida (amarillo), inhibida con EDO (verde) e inhibida con GOL (rojo)

De esta manera, los cambios en J tienen que deberse a modificaciones en la estructura electrónica del Mo(V), fundamentalmente en la densidad de espín, ocasionadas por cambios estructurales observados en el entorno del Mo en las muestras inhibidas por alcoholes

1.4.2.3. Cambios en las densidades de espín en las formas inhibidas de AOR

Para las muestras de *DgAOR* inhibidas por alcoholes, los estudios de EPR muestran que la interacción de intercambio aumenta significativamente en comparación a la señal *slow* (ver secciones 1.1.6.2. y 1.1.6.3.). El hecho de que esta situación no se debe a modificaciones estructurales en el camino químico, ni en la estructura electrónica del FeS1, sugiere que el origen está en cambios de la estructura electrónica del Mo(V) en presencia de inhibidores.

Dado que los cambios estructurales experimentados en el centro Mo bajo la inhibición alcohólica deberían causar cambios en la estructura electrónica del Mo(V), se calcularon las densidades de espín sobre el cofactor pterina. Las densidades de espín obtenidas pueden verse en la Fig. 25 para la forma no inhibida (a), y las inhibidas con EDO (b) y GOL (c) (parte del ligando pterina no se incluye en la figura para ver mejor la distribución de la densidad de espín sobre el Mo(V) y sus ligandos). La densidad de espín en las formas inhibidas se encuentra más localizada en el átomo de Mo y menos en los ligandos de éste, aumentando de un 86% en la forma *wt* a 97% y 95% en presencia de EDO y GOL, respectivamente.

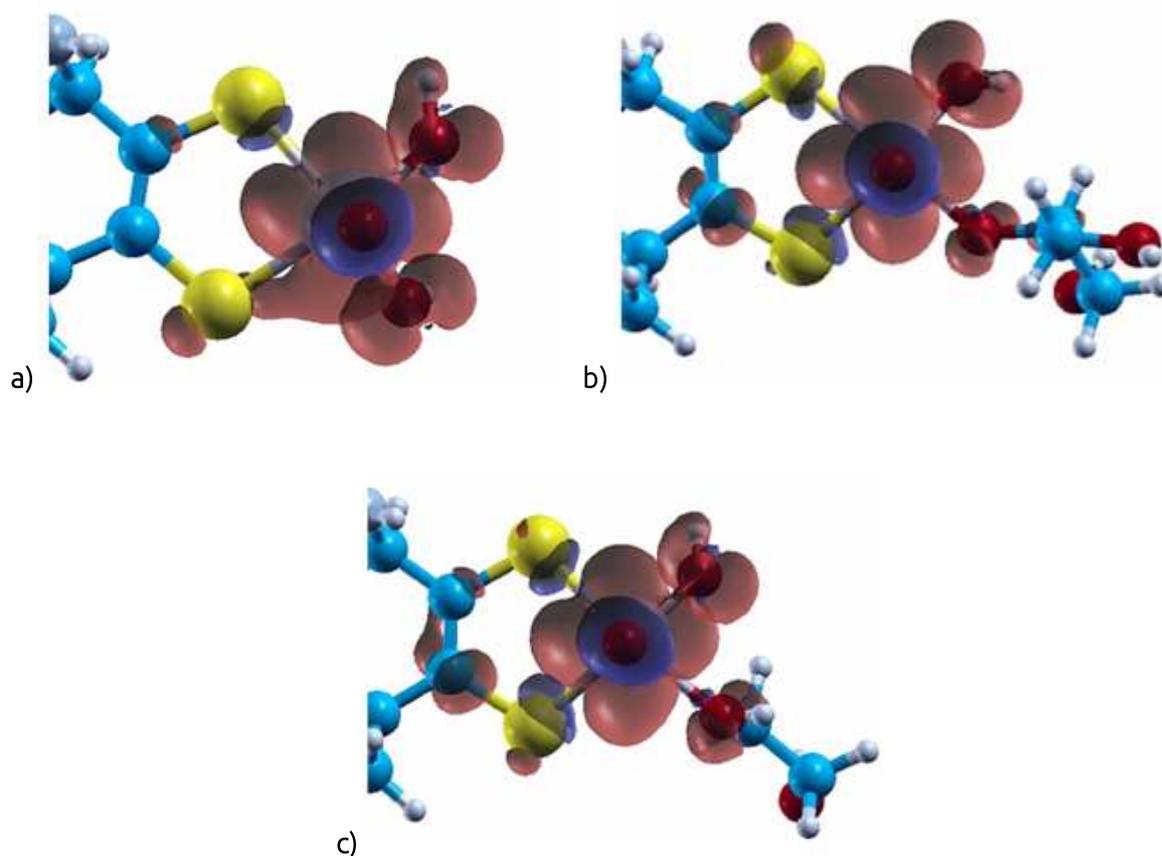


Fig. 25 - Densidades de espín sobre el sitio de Mo calculadas para la forma no inhibida (a), inhibida con EDO (b) e inhibida con GOL (c) (*isovalue* 0,002)

Estos cambios se deben fundamentalmente a la redistribución de la densidad de espín sobre el ligando catalítico OH_x de la proteína *wild-type*, el cual posee aproximadamente un 15% de densidad de espín, mientras que el átomo O2 de los alcoholes, que reemplaza este ligando en las formas inhibidas, posee una densidad de espín prácticamente nula. Consecuentemente, la densidad de espín del ligando OH_x se redistribuye en las especies inhibidas, acumulándose principalmente sobre el metal, en segundo lugar sobre la piranopterina, y en menor medida

sobre los ligandos oxo e hidroxilo. Este cambio en la densidad de espín, que claramente es la causa del incremento en la interacción espín-espín entre el metal y el centro FeS1 ($-16,6 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ para la forma *wild-type* y $-33,3 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ para las formas inhibidas), está en línea con el modelo cualitativo propuesto por Kahn, antes mencionado [80]. De acuerdo con este modelo, el incremento en J mediado por un camino químico implica una mayor deslocalización de la densidad de espín sobre el puente que une los dos centros interactuantes (ver Anexo I).

1.4.3. Conclusiones

El mecanismo catalítico de la *DgAOR* implica la unión del sustrato al Mo(VI), la oxidación del aldehído a su ácido correspondiente con la concomitante reducción del Mo(VI) a Mo(IV), seguido por la oxidación, mediada por dos electrones, desde Mo(IV) a Mo(VI) y así dejar la enzima preparada para iniciar un nuevo ciclo de catálisis. El hecho de que este último paso debe ser mediado por el ligando pterina hace que sus propiedades como conductor de electrones deban ser modificadas durante el ciclo catalítico, es decir, suprimidas durante la unión del sustrato al sitio de Mo(VI) para facilitar la oxidación del sustrato, y activada durante la salida del producto para permitir la reoxidación del Mo(IV) y así restablecer el estado *resting* de la enzima.

Los estudios discutidos y analizados en las secciones 1.4.1. y 1.4.2. pudieron ser realizados gracias a la información estructural experimental existente del estado *resting* y de formas inhibidas que modelan la interacción sitio activo-sustrato. Esta interacción puede modelarse debido a que los centros Mo y FeS1 en su forma paramagnética presentan un acoplamiento por intercambio J débil. El hecho de que J aumente ~2 veces en las formas inhibidas sugiere que la reacción de TE mediada por el camino químico Mo-FeS1 se ve favorecida en estas condiciones, lo que facilita el regreso de la enzima a la forma *resting*. El principal logro de este estudio fue poder determinar cómo cambia la densidad de espín, un parámetro relacionado con J, en las distintas formas de la enzima estudiadas. Ésto, en conjunción con los datos estructurales y de EPR, permitió hipotetizar que el proceso de TE Mo \rightarrow FeS1 en la *DgAOR* está regulado por el ligando catalítico lábil OH_x , ya que su sola presencia/ausencia modifica la distribución de la densidad de espín sobre el Mo; es decir, su presencia significa una deslocalización de la densidad de espín sobre el OH_x , mientras que su ausencia implica que la densidad de espín se deslocaliza en parte sobre el ligando pterina. Este mecanismo, el cual implicaría un mecanismo de TE regulado por un ligando del sitio de Mo, ha sido también sugerido para el proceso de TE entre las dos quinonas (QA y QB) del fotosistema II de bacterias, en el cual una molécula de bicarbonato ligada al Fe(II) situada en el medio del camino QA-QB regula el flujo de electrones[96]. En nuestra opinión, existen pocos ejemplos en biología en los cuales ocurren fenómenos de TE entre centros redox

gobernados por ligandos de primera y/o segunda esfera de coordinación del sitio activo metálico, proceso que creemos debería ser investigado en más detalle.

Un segundo aspecto que investigamos en este capítulo estuvo relacionado con la factibilidad desde un punto de vista teórico del mecanismo catalítico de la *DgAOR*. La diferencia fundamental entre la *DgAOR* y todos los otros miembros de la XO es la presencia de un O ecuatorial en lugar de un S. Es importante notar nuevamente que este S ecuatorial se consideraba esencial para la catálisis en todos los miembros de la familia de XO, ya que su reemplazo por un oxígeno los inactiva. El hecho que *DgAOR* no necesita de este ligando derribó un paradigma en esta familia de enzimas y fue un problema no exento de criticismo, ya que cálculos computacionales anteriores a los realizados por nosotros postulaban su inviabilidad desde un punto de vista energético. Nuestros resultados, si bien basados en esos cálculos anteriores, pero asumiendo un modelo mayor, muestran indudablemente que el mecanismo propuesto es factible desde un punto de vista computacional.

Entre los aspectos que necesitan de una investigación más profunda tanto desde el punto de vista experimental como teórico está el rol de los nucleótidos en los miembros de la familia XO, aspecto que, pese a que son enzimas investigadas desde hace más de medio siglo, no existe hasta el momento una hipótesis razonable sobre su función. En esta dirección, y considerando que los trabajos experimentales con dichas enzimas son muy dificultosos debido a que es prácticamente imposible obtener formas recombinante de las mismas, pensamos que un estudio sistemático racionalizado sobre la base de cálculos computacionales podría llegar a dar importantes pistas sobre el rol biológico de dichas moléculas en estas enzimas particulares.

Capítulo 2: Proteínas mononucleares de cobre

2.1. Introducción

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno puede ser representado como un triángulo (ver Fig. 26) donde se identifican cuatro procesos fundamentales: la fijación del nitrógeno, amonificación, nitrificación y desnitrificación[4,21]. Dichos procesos involucran una serie de reacciones redox realizadas por las maquinarias enzimáticas de distintos tipos de microorganismos, algunos de los cuales viven simbióticamente en los nódulos de las raíces y son ampliamente utilizados en agricultura como fertilizantes a causa de su capacidad para captar nitrógeno de la atmósfera, como es el caso de las rizobacterias[97]. El uso extensivo de estos bioinoculantes si bien ha producido un aumento en los rendimientos en los cultivos, ha ocasionado en simultáneo que se saturen vías metabólicas como la desnitrificante, causando problemas ambientales como la contaminación de los suelos por el nitrato, la producción de gases del efecto invernadero (N_2O), y la polución de las aguas de consumo[98].

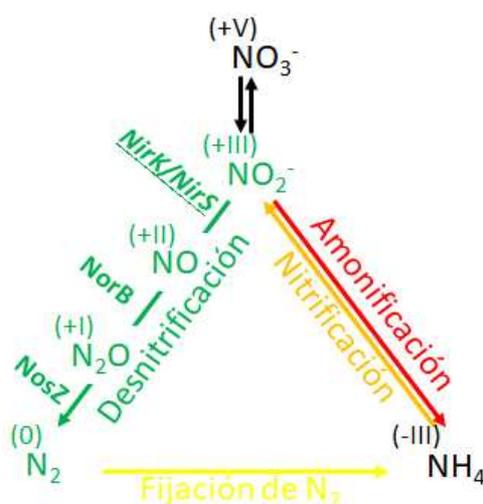
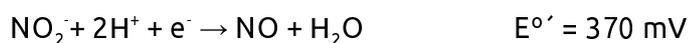


Fig. 26 - Ciclo biogeoquímico del nitrógeno y enzimas intervinientes en la vía desnitrificante

Las investigaciones básicas que se desarrollan en este tema persiguen ampliar el conocimiento sobre bioenergética celular a través del entendimiento de los distintos procesos que ocurren a nivel molecular en este ciclo.

La enzima nitrito reductasa (Nir) cataliza la reducción de nitrito a óxido nítrico en la vía desnitrificante del ciclo del nitrógeno (Fig. 26) de acuerdo con la reacción:



Las bacterias que intervienen en esta vía emplean dos tipos de Nirs diferentes para catalizar esta reacción, las que contiene un citocromo cd_1 (NirS) en su sitio activo y las que poseen un centro mononuclear de cobre (NirK).

2.1.1. Cobre: Propiedades del elemento químico

El cobre (Cu) es el elemento 29 de la tabla periódica ubicado en el grupo 11 período 4; su peso molecular es 63,55 g/mol y su configuración electrónica es $[Ar]4s^13d^{10}$ [3,18] (ver Fig. 27). El cobre es un metal rojizo, fuerte, suave y dúctil, ampliamente estudiado debido a que presenta una alta conductividad térmica y eléctrica. Es utilizado en muchas aleaciones y puede ser completamente miscible con oro [3], además, es fácilmente soluble en amoníaco, ácido nítrico y ácido sulfúrico en presencia de oxígeno. En la naturaleza se encuentra como metal en sulfuros, arseniuros, cloruros y carbonatos [3]. Su concentración en el océano es de 0,3 ppb [2]. El Cu se encuentra fundamentalmente en dos estado de oxidación I y II, y en raras ocasiones como III. El ion Cu forma complejos de coordinación con distinto número de ligandos, siendo los estados de coordinación más comunes desde 2 hasta 4 para el Cu (I) y 4, 5 o 6 para el Cu (II) [3,18].

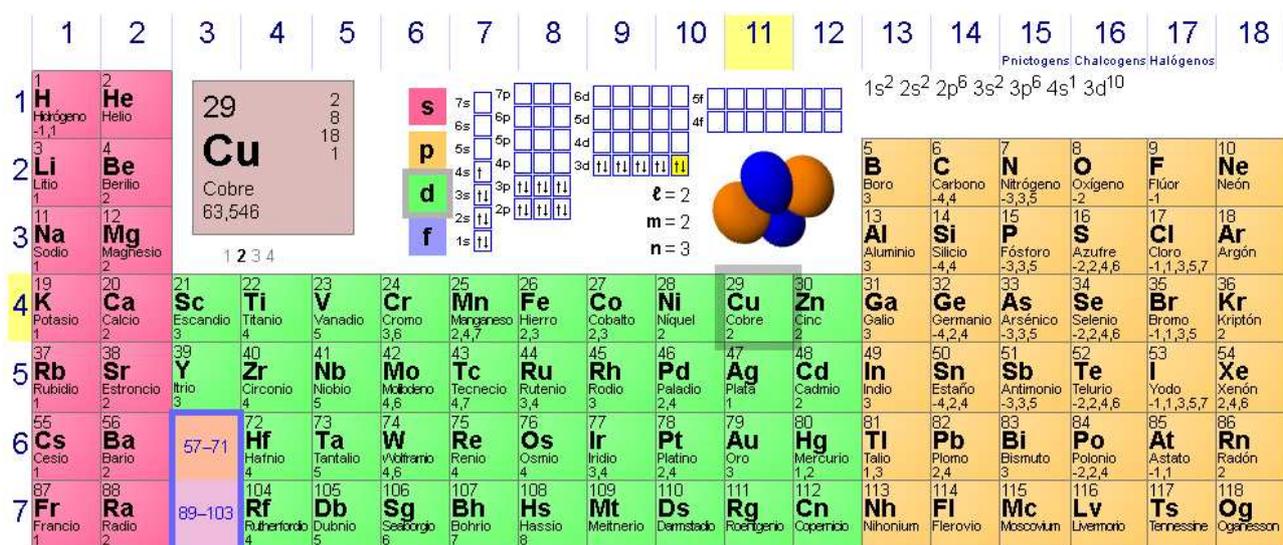


Fig. 27 - Tabla periódica de los elementos resaltando la ubicación del Cu y la configuración electrónica de dicho elemento (Figura modificada de Dayah, 2014) [19]

El Cu en estado I, ión cuproso, es un ión de capa cerrada por lo cual es diamagnético e incoloro y por lo tanto no puede ser detectado por espectroscopía óptica ni EPR [99]. Es el único ion monovalente biológicamente relevante y forma complejos con número de coordinación entre dos y cuatro átomos [99]; la especie tetra coordinada del Cu(I) está completamente saturada por

lo cual no tiene capacidad de unir sustratos[100]. El estado de Cu(II), ión cúprico, es el más frecuente para este metal[101] y si bien suele encontrarse penta y hexa coordinado, también se conocen complejos con 4 ligandos[100]. Debido a la configuración electrónica d^9 , presenta esferas de coordinación que originan geometrías distorsionadas en relación a los poliedros ideales, encontrados en otros metales. El Cu(II) es un ión Jan Teller que en los sistemas inorgánicos presenta una estructura predominante tetragonal con uno o dos ligandos apicales y más raramente en una estructura tetragonal pura[99]. A diferencia del Cu(I), el Cu(II) puede ser estudiado con espectroscopía óptica y EPR, lo que hace que se sepa mucho más sobre los sitios de Cu (II) en proteínas y en complejos de Cu. El espectro de EPR del Cu(II), el cual es debido a la presencia de un electrón desapareado en el orbital d de mayor energía, puede utilizarse para identificar si el centro de cobre es tetragonal, tetraédrico o bipiramidal trigonal[102]. Los espectros de UV-Vis de los complejos de Cu(II) presentan una o más bandas de absorción d-d, que son normalmente anchas y superpuestas, pudiendo obtener espectros de absorción óptica simples sólo para los centros tetraédricos o hexacoordinados[103]. Entre los iones divalentes de la primera fila de los metales de transición el Cu es el más pequeño, por lo que es el de mayor acidez de Lewis y forma numerosos complejos de Cu(II) que funcionan muy efectivamente como ácidos de Lewis catalizadores[104,105]. La mayoría de los compuestos cuprosos son rápidamente oxidados a cúpricos, mientras que la oxidación a Cu(III) es difícil de alcanzar. Los potenciales de reducción de soluciones acuosas de los iones Cu(I) y Cu(II) son de 0,52 V y 0,153 V respectivamente. La estabilidad relativa de ambos estados en esa condición depende muy fuertemente de la naturaleza de aniones o de otros ligandos presentes y varía considerablemente con el solvente o con la naturaleza de los átomos vecinos en un cristal[3]. Las diferencias en las formas de coordinación de los iones Cu(I) y Cu(II) junto con sus distintos radios iónicos (0,96 y 0,72 Å respectivamente) conducen a que las reacciones redox Cu(II/I) involucren grandes cambios geométricos en el sitio de Cu[100]. Estos cambios son útiles para los procesos de catálisis, ya que facilitan las reacciones oxidativas del sustrato unido[106], pero son desventajosos cuando se precisa una TE rápida desde o hacia el Cu[107].

2.1.2. El cobre en biología

El cobre es estudiado históricamente debido a que se encuentra en proteínas, incluyendo enzimas, tanto de plantas como de animales[108]. Las proteínas de Cu están involucradas en distintos tipos de funciones como ser transporte y activación de O_2 , transporte y almacenamiento del metal o reacciones redox utilizando el par Cu(II/I), ya sea para dar lugar a TE inter e intra proteína o para realizar transformaciones redox en el sustrato[100,109,110]. Es el segundo metal de transición más abundante en sistemas biológicos, luego del hierro, y el tercero

en humanos, luego del hierro y el zinc[111]. También es de gran importancia para la ecología debido a que algunas metaloenzimas que lo contienen participan por ejemplo en ciclos biogeoquímicos como el ya mencionado ciclo del nitrógeno, por lo que se relaciona con la contaminación de los suelos por nitrito o gases del efecto invernadero. En sistemas biológicos no se conocen situaciones en que el ión cobre actúe como ácido de Lewis [100,109].

2.1.3. Sitios de Cu en proteínas

Los sitios de Cu que estudiaremos [100,112] se han clasificado en dos tipos de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas y la estructura del sitio metálico[3]. T1 o cobre azul y T2 o normal. Existen otros sitios de Cu que no entran en esta clasificación como por ejemplo el CuA [113] y el T3.

El Cu del tipo T1 está involucrado frecuentemente en los procesos de TE y tiene una banda de transferencia de carga extremadamente intensa CYS-S \rightarrow Cu(II) ($\epsilon_M \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ver Fig. 28.a panel izquierdo), resultando en su color azul característico que le confiere el nombre[112,114]. En el espectro de EPR el $A||$ del Cu disminuye a menos de la mitad (menos de $70 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) del valor observado para los complejos de Cu normal (T2) (ver Fig. 28.a panel derecho). Estas características singulares están asociadas con un residuo de cisteína unido al Cu(II) en un sitio de geometría tetraédrica distorsionada con un enlace fuertemente covalente Cu-S. Los sitios de Cu azul pueden ser divididos en cuatro clases estructurales que ciclan entre los estados Cu(II) y Cu(I) en los procesos de TE. El sitio clásico es encontrado en plastocianinas y posee los ligandos CYS-S, (HIS-N)₂ y MET-S en una geometría tetraédrica distorsionada C_{3v} elongada[115], dónde el enlace Cu(II)-MET-S es de aproximadamente 2,9Å (formando el eje C₃) y el metal está desplazado hacia el plano trigonal opuesto N₂S. La estructura adoptada puede ser pensada como resultado de buscar cumplir con los requerimientos estereoquímicos y electrónicos de los estados Cu(I) y Cu(II) en simultáneo, así las geometrías de las formas oxidadas y reducidas son esencialmente idénticas y la energía de reorganización entre ambos estados es mínima[112]. El enlace Cu(II)-MET-S involucra los orbitales 3p del azufre, que poseen una función de distribución radial extendida, lo que produce una superposición con los orbitales desocupados 4p del Cu y resulta en un enlace covalente con aproximadamente un tercio de la fuerza de los enlaces Cu(II)-HIS-N[116]. La distancia del Cu al CYS-S es corta, de aproximadamente 2,1Å, indicando un enlace fuerte. La reducción del Cu(II) a Cu(I) a pH bajo produce que uno de los ligandos HIS sea protonado y removido de la esfera de coordinación[117]. Los pequeños cambios geométricos producidos bajo reducción y la permanencia de un enlace fuerte con el MET-S al sustituir el metal con Hg(II) son los indicios que mayormente se utilizan para argumentar que el sitio de cobre azul es muy rígido[117,118]. El

segundo tipo de cobre azul está en las azurinas (Az), que muestran un oxígeno carbonílico como enlace adicional en posición trans al ligando Met-S. Las pseudoazurinas y los centros del tipo T1 de algunas Nirs tienen la coordinación $[\text{Cu}(\text{CYS-S})(\text{HIS-N})_2(\text{MET-S})]$ como la plastocianina, pero con un enlace $\text{Cu}(\text{II})\text{-MET-S}$ significativamente más corto $\sim 2,6 \text{ \AA}$ y cambios angulares, dando origen a la tercera clase de cobre azul. Las diferencias geométricas se manifiestan en espectros con características perturbadas semejante a las de estelocianina: una señal de EPR más rómbica, estructura hiperfina en la señal del g_x (ver Fig. 28.b panel derecho) y un aumento de la intensidad de la banda de absorción próxima a los 450 nm[119] (ver Fig. 28.b panel izquierdo). Estos cambios reflejan una alteración en la estructura electrónica de los sitios de cobre azul que contribuye a la reactividad diferente relativa a los sitios azules clásicos[119]. El último tipo de sitio azul posee la coordinación Met-S sustituida por otros aminoácidos.

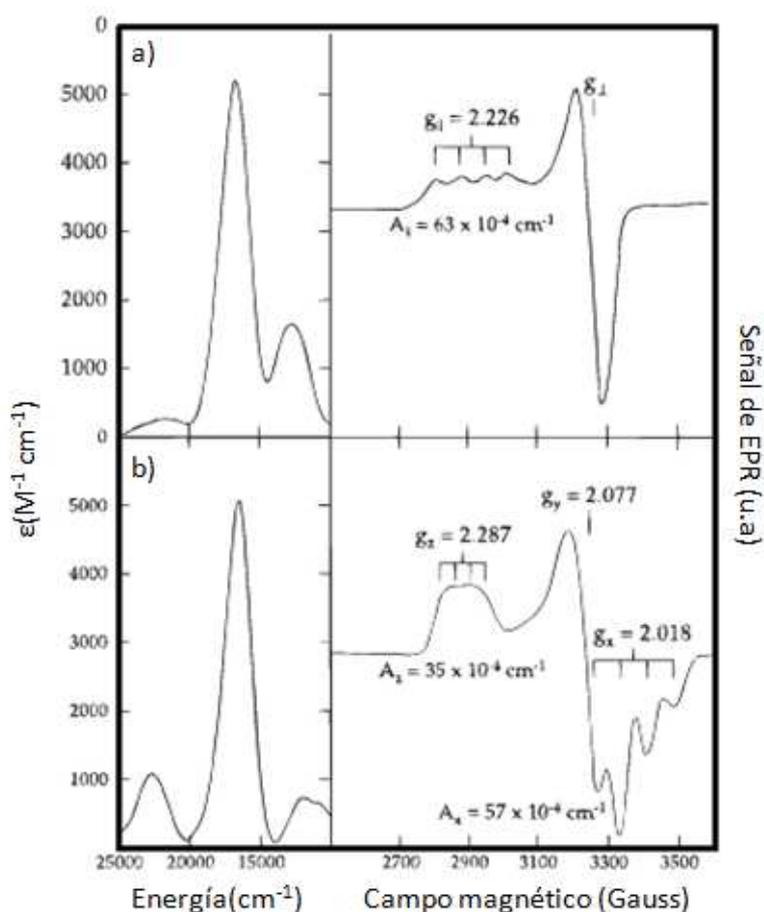


Fig. 28 - Espectros de absorción UV (panel izquierdo) y de EPR (panel derecho) a baja temperatura de los Cu T1 de plastocianina (a) y estelocianina (b) ($450 \text{ nm} = 22222.22 \text{ cm}^{-1}$; $600 \text{ nm} = 16666.67 \text{ cm}^{-1}$) (Figura modificada de Holm y col., 1996[112])

El Cu T2 es el sitio activo de distintas enzimas y, por lo tanto, el responsable de la unión a sustratos y conversión a productos. Es un centro mononuclear de Cu que carece de la unión a un

grupo tiolato. Varias estructuras entran dentro de esta clasificación[120], entre las que se encuentran $[\text{Cu}(\text{HIS})_3(\text{OH}_2)_x]^{+2+}$ ($X=1,2$), $[\text{Cu}(\text{HIS})_2(\text{TYR})_2(\text{OH}_2)]$ o $[\text{Cu}(\text{HIS})_2(\text{MET})(\text{OH}_2)]$, este último es conocido también como centro Cu_B . El centro T2 exhibe una señal de EPR similar a la especie $\text{Cu}(\text{II})$ tetragonal presente en la mayoría de los complejos inorgánicos con un $A_{\parallel} > 120 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, y solo bandas de absorción débiles visibles del tipo d-d ($\epsilon_{\text{max}} < 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)[120]

2.1.4. La familia multicobre oxidasa. Nitrito reductasa de Cu y su comparación con otras enzimas relacionadas

2.1.4.1. La Familia multicobre oxidasa

La familia multicobre oxidasas está compuesta por dominios estructurales que se basan en el plegado de la cupredoxina[121]. Dicho plegado está tipificado por las estructuras de las proteínas azules pequeñas, como plastocianina y azurina, y comprende dos hojas β en una configuración sandwich (ver Fig. 29).

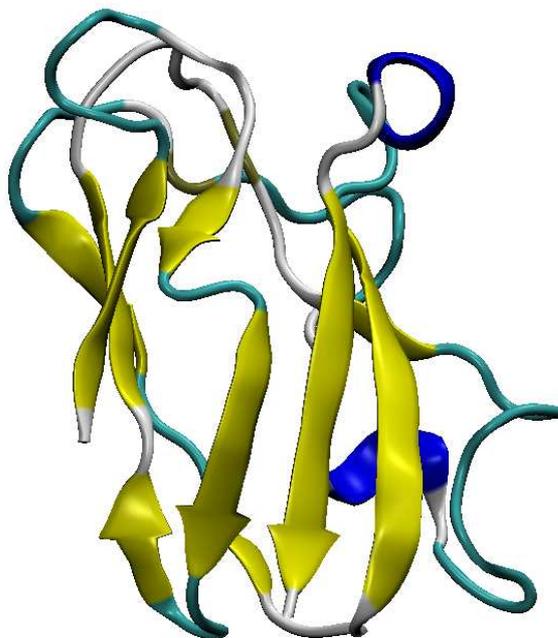


Fig. 29 - Estructura tridimensional de la plastocianina (PDB 1PLC) coloreada por estructura secundaria. Pueden verse las dos hojas β formando la configuración sandwich. Esta estructura es la base de la familia multicobre oxidasa

Los monómeros de la ascorbato oxidasa (AO) comprenden tres dominios cupredoxina con un centro mononuclear del tipo 1 en el tercer dominio y tres centros trinucleares (uno tipo 2 y

uno tipo 3) en la interfaz del primero y tercer dominio (ver Fig. 30.a). La ceruloplasmina humana (hCP) tiene seis dominios con cobres mononucleares en los monómeros 2, 4 y 6 y un centro trinuclear de cobre entre el primero y el último dominio. Los dominios 1, 2 y 6 en hCP son topológicamente equivalentes a los dominios 1, 2 y 3 en AO, aunque el dominio 2 de AO no tiene el centro de cobre T1 (ver Fig. 30.b). Las Nir son un trímero dónde cada monómero está compuesto por dos dominios cupredoxina, pero a diferencia de la ceruloplasmina, el cobre T1 se encuentra en los dominios impares en vez de en los pares. Además, posee un centro del tipo T2 en la interface de cada dímero (ver Fig. 30.c).

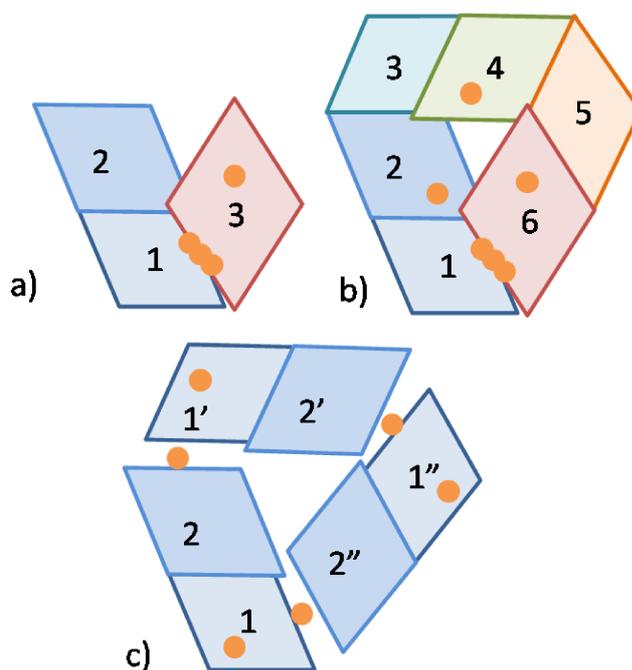


Fig. 30 - Esquema comparativo de los dominios (rombos) y sitios de Cu (esferas anaranjadas) de los miembros de la familia multicobre oxidasa ascorbato oxidasa (a), ceruloplasmina (b) y nitrito reductasa (c)

2.1.4.2. Nitrito reductasas. Descripción estructural y funcional

Las enzimas nitrito reductasas de Cu participan en el ciclo del nitrógeno, catalizando el segundo paso del proceso de desnitrificación. Dicho paso corresponde a la reducción en un electrón de NO_2^- a NO ($E^0=370$ mV)[4,5]. Como se dijo arriba, la mayoría de estas enzimas reportadas a la fecha son homotrímeros con dos átomos de Cu por monómero separados aproximadamente 12 Å (ver Fig. 31). Uno de los centros de Cu es del tipo 1 y participa en la TE, mientras que el segundo es del tipo 2 y corresponde al centro catalítico. Pueden encontrarse nitrito reductasas de Cu de color verde o azules cuyos dadores electrónicos fisiológicos suelen ser la pseudoazurina y la azurina, respectivamente. Los distintos colores de las proteínas se deben a ligeras diferencias estructurales en el sitio T1 que se traducen en espectros UV-VIS y

EPR con características particulares para cada una. Los espectros de las CuNir azules son de aspecto similar a los correspondientes a la plastocianina con una banda de transferencia de carga extremadamente intensa CYS-S→ Cu(II) a ~600 nm y una banda adicional muy débil a 450 nm en el espectro visible (ver Fig. 28.a panel izquierdo), mientras que en el espectro de EPR se observa una pequeña interacción hiperfina del cobre en la región de campo bajo[122](ver Fig. 28.a panel derecho). Las CuNir verdes exhiben espectros comparables a estelocianina. En el espectro de UV-vis se observa la banda típica a ~600 nm pero la banda a 450 nm es bastante más intensa que para las azules[123](ver Fig. 28.b panel izquierdo). El espectro de EPR de estas proteínas tiene carácter rómbico[123,124] (ver Fig. 28.b panel derecho).

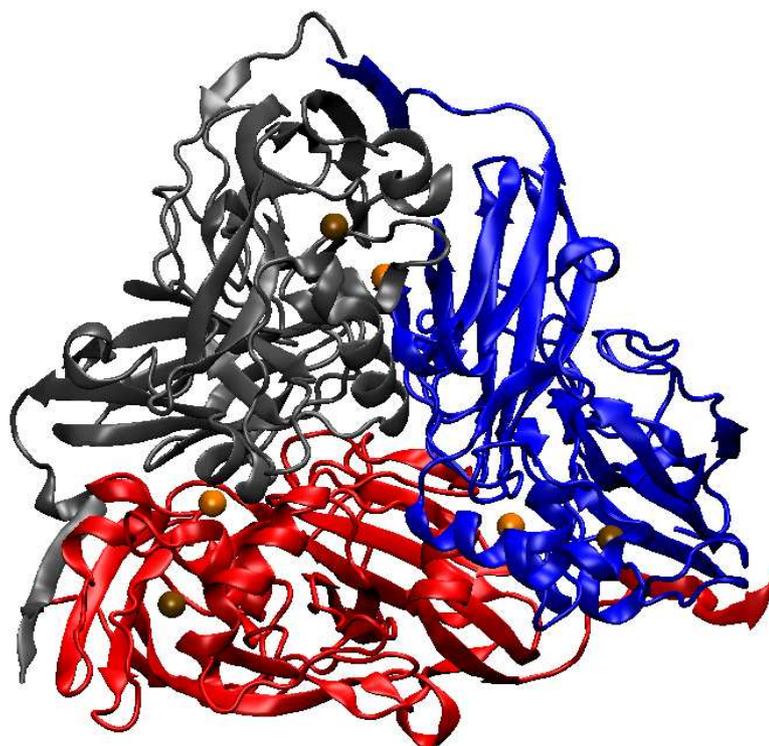


Fig. 31 - Estructura tridimensional de *SmNir* coloreada por cadenas (A azul, B rojo y C gris) mostrando los átomos de Cu (T1 marrón, T2 anaranjado)

El centro T1 está tetracoordinado con tres ligando fuertes, dos son átomos de N del grupo imidazol de residuos de histidina y el tercero un azufre de cisteína; el cuarto ligando es más débil y corresponde al grupo tioéter de una metionina (ver Fig. 32)[125–130]. El sitio T2 consiste en un cobre también tetracoordinado con una geometría tetraédrica distorsionada, siendo los ligandos una molécula de agua y tres átomos de N pertenecientes a las cadenas laterales de residuos de histidinas, dónde una de ellas corresponde al monómero adyacente (ver Fig. 32).

Los centros T1 y T2 están conectados por dos caminos químicos principales: el más corto corresponde al puente CYS-HIS, el cual se piensa es el responsable del transporte del electrón para la reducción del nitrito; el camino más largo, denominado *sensing loop*, incluye residuos de la primera y segunda esfera de coordinación y se cree que está involucrado en desencadenar la transferencia del electrón desde el T1 al T2 cuando el nitrito está unido al segundo (ver Fig. 32)[123,130–133]. Esta región contiene un residuo de ácido aspártico que participaría activamente en el proceso catalítico por medio de la formación de puentes de hidrógeno que serían esenciales para la catálisis: en el estado *resting* de la enzima lo haría con el agua apical del T2 y, luego, con el complejo nitrito-T2[134,135].

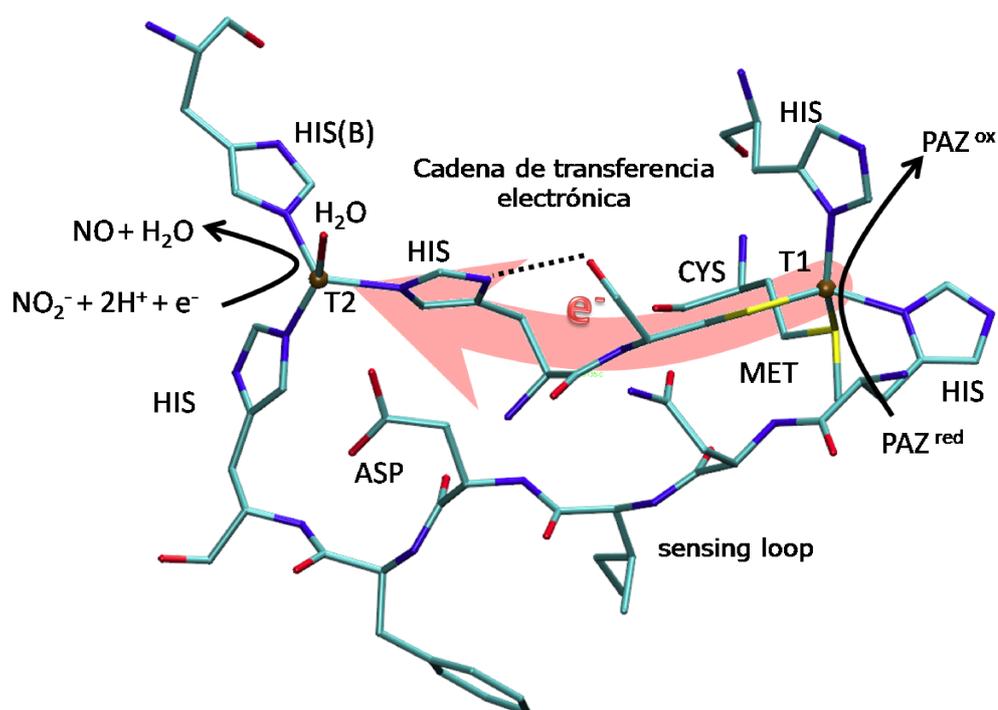


Fig. 32 - Coordinación de los centros de Cu. T1 centro aceptor de electrones (derecha) dónde se produce la oxidación del dador electrónico externo (pseudoazurina). Centro T2 (izquierda) que corresponde al sitio activo. También se visualiza el *sensing loop* el cual se cree es responsable de activar la TE al T2 cuando el NO^- está en el sitio activo

El mecanismo catalítico propuesto para las Nirs implica una reacción redox acoplada a la transferencia de dos protones en la cual el nitrito, luego de unirse al sitio T2 reemplazando el agua apical, es convertido a NO por un electrón cedido por un dador fisiológico externo (ver Fig. 32)[131,132,136–138]. Estudios computacionales indican que existen dos potenciales rutas de TE T1-T2 que pueden ser activadas selectivamente dependiendo de la estructura geométrica y electrónica del sitio T1[139]. Para las Nirs azules (T1 tipo π), la TE ocurre a través de un puente

que involucra enlaces covalentes entre los átomos del esqueleto y las cadenas laterales de los residuos CYS-HIS. En el caso de las verdes (T1 tipo σ) el electrón es transferido entre los residuos CYS-HIS por un camino más eficiente que acorta las distancias al establecer un enlace de puente hidrógeno entre el átomo HIS-N^{δ1} y el O carbonílico de la CYS.

En la bacteria desnitrificante *Sinorhizobium meliloti* 2011 (*Sm*) esta reacción es catalizada por una CuNir verde (*SmNir*) codificada por el gen estructural *nirK*[140] y su dador electrónico es una pseudoazurina (*SmPaz*) que contiene un sólo centro de Cu y es del tipo T1[141]. La *SmNir* es una de las proteínas estudiadas en este trabajo y ha sido caracterizada por métodos espectroscópicos y cinéticos. El presente es un aporte al estudio del sistema brindando información estructural, por medio de cálculos computacionales, para favorecer a la interpretación de resultados experimentales.

2.1.5. CuNir como objeto de estudio del grupo de trabajo

Han sido realizados numerosos estudios de mutagénesis sitio dirigidas complementados con otras técnicas experimentales como rayos X, espectroscopías UV-Vis y EPR, ensayos cinéticos y voltametría cíclica, para analizar la relevancia de los residuos conservados coordinados y no coordinados a los centros metálicos, involucrados en el mecanismo catalítico de las Nir[119,135,142–151].

En algunos de dichos estudios se cambiaron los residuos del puente químico CYS-HIS. La variante de la CYS del T1 por ALA en la Nir azul *Alcaligenes xyloxidans* (*Ax*) produjo que a pesar de conservar el sitio T2 se perdió el T1 y la enzima se volvió inactiva, tanto con dador fisiológico como con artificial[143]. Las modificaciones de la HIS del T2 por lisina, en la Nir verde *Alcaligenes faecalis* s6 (*Af*), y por valina, en la azul *AxNir*, resultaron en formas con ambos cobres pero totalmente inactivas con diferentes dadores electrónicos[119,142]. El estudio por rayos X de la variante con valina mostró que el T2 queda coordinado solamente a dos residuos de HIS. Para el caso de la variante por lisina no se ha reportado estructura, pero el largo de la cadena lateral sumado a la carga positiva que tiene dicho aminoácido, sugieren que tampoco tendría capacidad de ligarse al Cu. Según la revisión bibliográfica que hemos realizado en el grupo de trabajo, actualmente no han sido estudiadas variantes en los residuos del puente CYS-HIS que tengan potencial capacidad de unirse a los centros de Cu, lo cual indica que dichos residuos serían esenciales para garantizar la catálisis enzimática de la Nir.

En nuestro grupo de trabajo se obtuvieron dos variantes nuevas de los residuos puente T1-T2 que fueron estudiadas por biotecnólogos del equipo utilizando métodos experimentales (cinéticos y espectroscópicos)[152] y serán analizadas en esta tesis por métodos computacionales. La primera de las variantes se denominó H171D ya que la mutación se produjo en el codón correspondiente a la histidina 171 por un codón que codifica al residuo aspártico. La segunda variante llamada C172D tiene mutada la región de ADN de la cisteína 172 unida al T1 también por un codón de aspártico. Dicho residuo fue seleccionado dada la potencial capacidad del grupo carboxilato del grupo R del aminoácido para ligarse a los Cu por medio de uno o ambos oxígenos. Las variantes fueron propuestas para evaluar si el aspártico efectivamente puede ligarse a uno o ambos sitios de Cu y si se originan cambios en la actividad catalítica de la enzima. Los ensayos experimentales utilizados nos proveen información sobre la actividad de la enzima, cambios estructurales e interacciones entre los centros que resultan relevantes para preparar el sistema y racionalizar e interpretar correctamente los resultados de los cálculos. Los cálculos computacionales fueron realizados con el objetivo de estudiar en más detalle aspectos de las estructuras *wild-type* y variantes de *SmNir*, como estabilidad, fuerza de la unión de ligandos, reorganización ante la unión del sustrato, los caminos químicos T2-HIS-CYS-T1 vs T2-ASP-CYS-T1 y T2-HIS-ASP-T1, deslocalización de espín del metal en sus ligandos y la interacción espín-espín entre ambos centros.

Otro aspecto del mecanismo catalítico que también se plantea estudiar es la interacción del NO_2^- con el T2 tanto para la estructura *wt* como para la variante H171D. La manera en que el sustrato interacciona con el sitio catalítico de la enzima *wt* ha sido estudiada tanto por métodos experimentales[153–156] como por cálculos teóricos [154,156,157] siendo un tema ampliamente discutido en la literatura. En el trabajo de Yokoyama *et al.* se obtuvieron cuatro complejos con amina aromática tridentada como modelos para estudiar el sitio T2 de las nitrito reductasas; en dos de los cuatro compuestos probados había una dependencia en la coordinación del NO_2^- con el estado de oxidación del Cu: para el Cu(II) el nitrito se coordina asimétricamente por los dos átomos de oxígeno (modo de coordinación O,O') , mientras que para el Cu en estado de oxidación I la coordinación se da por el átomo de N (modo de coordinación N). Los cálculos teóricos realizados en el mismo trabajo son consistentes con los experimentales para el Cu(II), siendo favorable la coordinación por medio de los oxígenos en 13,1 kcal/mol relativos a la coordinación por el átomo de N. Los cálculos para el estado de oxidación Cu(I) arrojaron una diferencia de 1 kcal/mol siendo más estable la coordinación O,O' sobre la coordinación por el N, de todos modos dado que la diferencia es mínima y los dos estados son probables, los autores concluyen que los cálculos siguen estando en línea con los experimentos. El trabajo de Lehnert *et*

al. también se realiza sobre compuestos modelos del sitio T2, pero en este caso obtienen que la coordinación del Cu oxidado es bidentada con un átomo de O y con el N, de manera simétrica o asimétrica, según la demanda estérica del coligando, siendo la coordinación asimétrica la de menor energía. Adicionalmente se obtuvo una coordinación del tipo O,O' para el Cu(II) con un complejo aniónico. Para el caso del Cu(I) se encontró que la energía es la misma para la coordinación monodentada con O y con N. El trabajo experimental de Ruggiero *et al.* muestra estructuras por rayos X de complejos modelos del sitio T2 con coordinación bidentada por los oxígenos pero con distancias simétricas al Cu (II). Los estudios de Hsu *et al.* realizados sobre compuestos modelo del T2 aniónicos y neutros reaccionados con nitrito muestran que la coordinación es monodentada con el átomo de N para el Cu en estado de oxidación I. Adicionalmente con uno de los compuestos obtienen una molécula de agua en el sitio del T2 que establece un puente hidrógeno con uno de los oxígenos del sustrato, obteniendo así una estructura con un intermediario análogo al ácido nitroso. Por último los cálculos realizados por Li *et al.* concluyen que el nitrito se liga al Cu(II) de manera bidentada por sus átomos de O, y que la posterior reducción del T2 induce un reacomodamiento en la coordinación del sustrato, volviéndose del tipo N-coordinado.

2.2. Objetivos

1. Obtener *in silico* la estructura 3D de la proteína *as-purified*. Para lograr este objetivo se propone refinar mediante el empleo de técnicas de mecánica clásica, mecánica cuántica y la técnica híbrida QM/MM, una estructura inicial obtenida con la técnica de modelado por homología utilizando como molde la estructura cristalográfica de otra Nir que posea un elevado porcentaje de identidad de secuencia con la *SmNir*.
2. Sobre de los resultados obtenidos en el objetivo específico 1, estudiar la estabilidad de variantes de la proteína obtenidas *in-silico*. Esto persigue evaluar cómo cambios puntuales en los ligandos del Cu afectan la estructura molecular y electrónica de los sitios metálicos, el camino de TE y la eficiencia catalítica de la enzima. Este trabajo se contrastará con resultados de estudios cinéticos y espectroscópicos de las mismas variantes obtenidas mediante técnicas de biología molecular.
3. Estudiar para ambos tipos de sistemas, *as-purified* y variantes, la estabilidad de las interacciones nitrito-sitio activo y T1-T2.

2.3. Materiales y métodos

El equipamiento computacional, así como los equipos de obtención de espectros de EPR y UV-VIS discutidos en este trabajo están descritos en el Anexo II.

2.3.1. Obtención de estructuras

Debido a que no se encuentra reportada la estructura cristalográfica de la *SmNir wild-type* (*wt*) se realizó una estructura empleando la metodología de modelado por homología con el servidor automático SWISS-MODEL[158–160] utilizando como molde la estructura de la proteína verde *AfNir* (PDB 1SNR). Los átomos de Cu correspondiente a los tres centros T2 fueron incluidos directamente por el servidor, mientras que los T1 se agregaron manualmente en las posiciones correspondientes a las que poseen en *AfNir*. Los átomos de hidrógenos y los estados de protonación de los residuos titulables (HIS, GLU, ASP) se añadieron usando el procedimiento empírico PROPKA por medio del servidor pdb2pqr [91] seleccionando un pH de 7. El sistema se solvató por medio del programa VMD[161] con una esfera de agua abarcando la proteína completa, luego las moléculas de agua que se encontraban a más de 30 Å de cualquier átomo de Cu se eliminaron para reducir el número de átomos del sistema. Para neutralizar el sistema se añadieron 24 iones de sodio (Na⁺), con el mismo programa utilizado en la solvatación, dejando un total de 31412 átomos que incluyen 5491 moléculas de agua (Fig. 33).

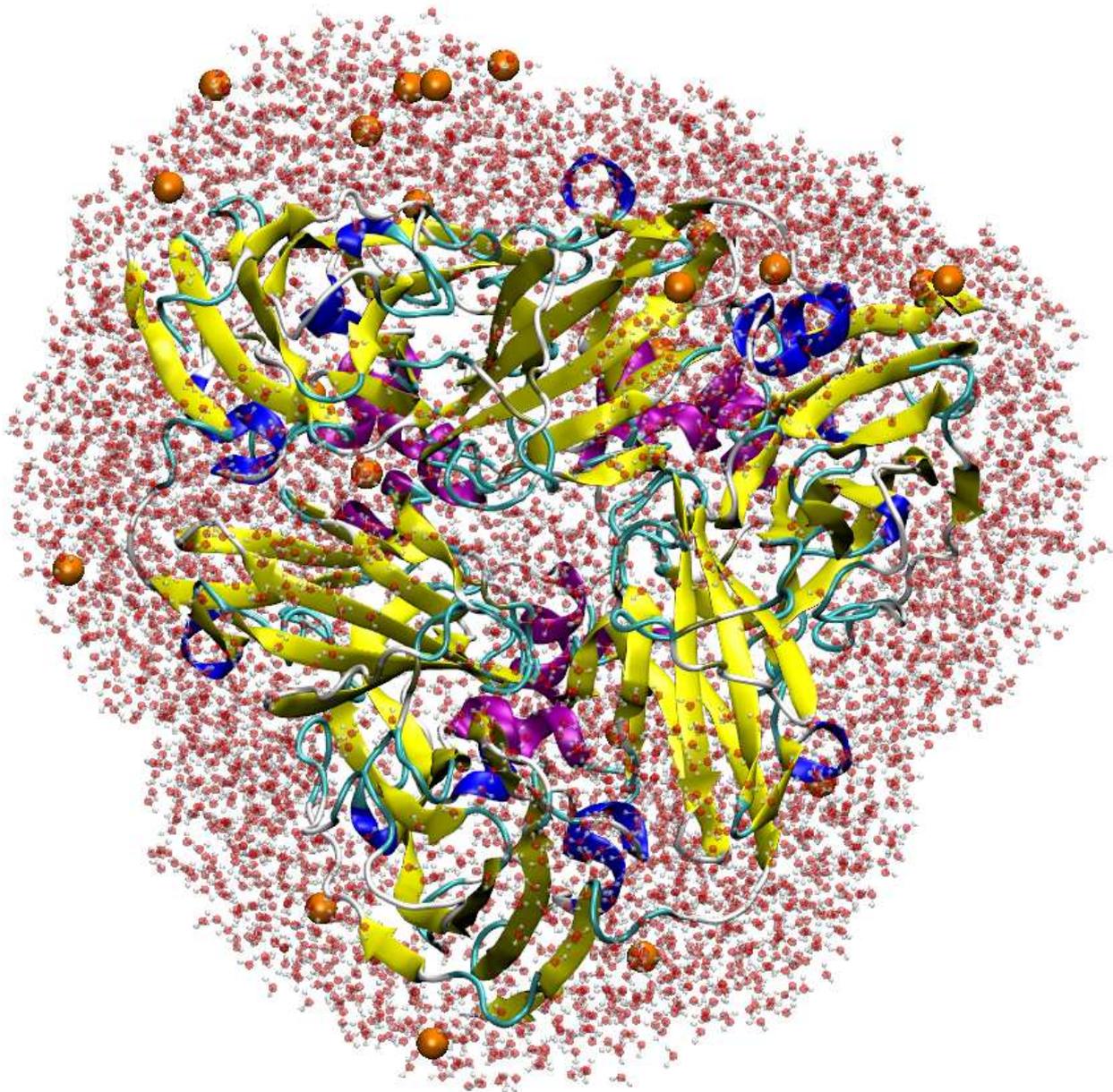


Fig. 33 - Modelo utilizado para los cálculos computacionales. La proteína se encuentra esquematizada en *new cartoon* coloreada por estructura secundaria mientras que las moléculas de agua (esferas blancas y rojas) están en *CPK* y los sodios (esferas naranjas) están en *VDW*

Se realizaron dos simulaciones de dinámica molecular 0,1 ns de minimización y 2 ns de equilibración a 310 K para relajar las posiciones de los átomos alejados del sitio activo. El campo de fuerzas utilizado fue CHARMM22 bajo el programa NAMD[82]. En la primera se dejaron relajar sólo las moléculas de aguas. La segunda dinámica partió de la configuración final de la primera dejando libre de movimiento también los residuos de proteína que se encontraban a más de 10 Å de cada átomo de Cu.

El sistema fue luego optimizado con la metodología híbrida mecánica cuántica/mecánica molecular (ver Anexo I) implementada en Gaussian 09[94]. El funcional WB97XD de espín-polarizado[84], que incluye correcciones de dispersión átomo-átomo se utilizó en la región QM para las optimizaciones geométricas. En la misma región pero para los cálculos de energía se utilizó el funcional B3LYP[162,163]. En ambos casos se seleccionó la base 6-31g(d). Los átomos del nivel MM se trataron con el campo de fuerzas Amber[164].

La región QM incluyó las cadenas laterales de los aminoácidos HIS342B y HIS136A los cuales se ligan al T2; HIS131A, HIS181A y MET186A, que corresponden a los ligandos del T1; a su vez en los aminoácidos del puente HIS171A y CYS172A fueron incluidos también los átomos del *backbone*, y algunos átomos adyacentes, para no realizar el corte de las regiones en un enlace fuerte; y los residuos de la segunda esfera de coordinación ASP134A, HIS291B e ILE293B. Las aguas que quedaron a 10 Å de los Cu tratados QM fueron eliminadas y se añadieron en su lugar cinco aguas próximas al sitio T2, más el agua apical del estado *resting*, basándonos en las posiciones de la estructura *A/Nir* (PDB 1AS7) nombradas respetando la nomenclatura de dicha estructura (1200A, 578B, 584B, 619B, y 1201B). Para el estado *resting* de las proteínas la molécula de agua incluida en la posición apical del T2 fue nombrada 503B. El residuo HIS291B se protonó en ambas posiciones N^{δ1} y N^{ε2}, mientras que el ASP134A se consideró desprotonado, como ha sido sugerido en la bibliografía[137,165]. El resto de los residuos fueron tratados por mecánica clásica. La estructura *wt* se optimizó dejando los átomos en la región QM libres de movimiento (a excepción del átomo frontera QM/MM), mientras que los tratados con mecánica clásica permanecieron fijos. Todos los átomos de Cu se consideraron oxidados para el cálculo.

La obtención de ambas variantes de Nir se realizó *in-silico* reemplazando, en la estructura de *SmNir wt* optimizada, solamente la cadena lateral del aminoácido H171-A o C172-A por la correspondiente cadena del residuo aspártico.

Para la variante H171D se orientó de dos formas diferentes la cadena lateral del residuo modificado previo a la optimización, para ver si se obtenían diferentes coordinaciones al centro. Este estudio se realizó debido a que los resultados experimentales que se comentan en 2.4.1.2. nos hicieron suponer que existían poblaciones con dos tipos de T2 diferentes y como se observa en información estructural de rayos X en Mo-proteínas la cadena lateral de ácido aspártico puede adoptar los modos de coordinación mono o bidentado[166]. La cuantificación de espines de la señal de EPR de la proteína H171D purificada arrojó ~2 espines/monómero, indicando que ambos sitios T1 y T2 se encuentran completamente oxidados, por lo que para los cálculos

consideramos nuevamente todos los átomos de Cu como Cu^{+2} . Las estructuras iniciales se optimizaron posteriormente siguiendo la metodología QM/MM empleada en la optimización de la estructura de *SmNir wt*, respetando las mismas configuraciones de bases, funcionales y átomos QM/MM, sólo que en este caso la carga total del sistema correspondía a -1, al reemplazar un residuo neutro (HIS) por uno de carga negativa (ASP). También se respetó la misma selección de átomos libres de movimiento.

Para la variante C172D, en virtud de que la cuantificación de átomos de Cu indicaría la presencia de un solo átomo de dicho metal por monómero, los cálculos computacionales fueron realizados asumiendo dos posibles casos: i) que la proteína incorpora dos Cu por monómero y ii) que cada monómero cuenta con un sólo átomo de Cu y que dicho átomo corresponde al T2. Siguiendo el protocolo de optimización empleado para H171D se optimizaron las dos variantes de C172D. La carga del sistema es la misma que la de la *wt* en el caso que ambos sitios tenían el átomo de Cu, debido a que tanto el residuo de CYS como el de ASP tienen carga neta igual a -1. Para el sistema sin cobre en el sitio T1 la carga total fue de -3 ya que se eliminó el átomo de Cu del monómero en la región QM.

2.3.2. Interacción Nir/variante- NO_2^-

Para los cálculos de interacción T2- NO_2^- se reemplazó la posición del agua apical de la estructura optimizada de *SmNir wt* por el ión NO_2^- utilizando para esa molécula las coordenadas de la estructura de *A/Nir* con nitrito unido, depositado en el PDB bajo el código 1SJM. Estas coordenadas corresponden a la forma bidentada asimétrica de coordinación del nitrito al Cu(II). Al igual que con la molécula de agua apical, el nitrito fue tratado a nivel QM con la misma configuración de base y funcional descrita anteriormente.

Los cálculos realizados para evaluar el costo energético de la remoción del agua apical al T2 corresponden a *single point* variando la distancia de unión T2-O del ligando agua apical en pasos equiespaciados de 0,05 Å llegando a 0,2 Å más cerca y más lejos de la posición de equilibrio de cada uno de los sistemas

2.3.3. Interacción de intercambio T1-T2

Se realizaron cálculos energéticos sobre las estructuras optimizadas de *SmNir wt* y la variante H171D asumiendo configuración ferromagnética (multiplicidad de espín 3) y

antiferromagnética (multiplicidad de espín 1). Para el caso de la enzima *wt* se realizó también la optimización de las estructuras en la región QM para ambas configuraciones. En los cálculos con multiplicidad de espín 1 se utilizó la opción **mix** de Gaussian que permite mezclar los orbitales HOMO y LUMO destruyendo la simetría espacial de los estados α - β , ya que sin esa opción el programa calculaba con la forma no magnética de los cobres.

2.4. Resultados y conclusiones

2.4.1. La estructura de la *SmNir* y sus variantes resuelta por Métodos computacionales

2.4.1.1. *SmNir* wild-type

Los resultados experimentales determinaron que la masa molecular, obtenida por filtración por gel, es de ~ 127 kDa, mientras que la técnica SDS-PAGE mostró una única banda de masa ~ 42.5 kDa indicando que la proteína era un trímero[129]. En cuanto al contenido de metal se identificaron $5,9 \pm 0,1$ Cu/trímero, lo que corresponde a una ocupación total de los dos sitios de cobre T1 y T2 para cada monómero. Los estudios espectroscópicos que nos fueron facilitados (ver Fig. 34) muestran que el sistema corresponde a una Nir verde con señales típicas de T1 en UV-Vis y T1 y T2 en EPR.

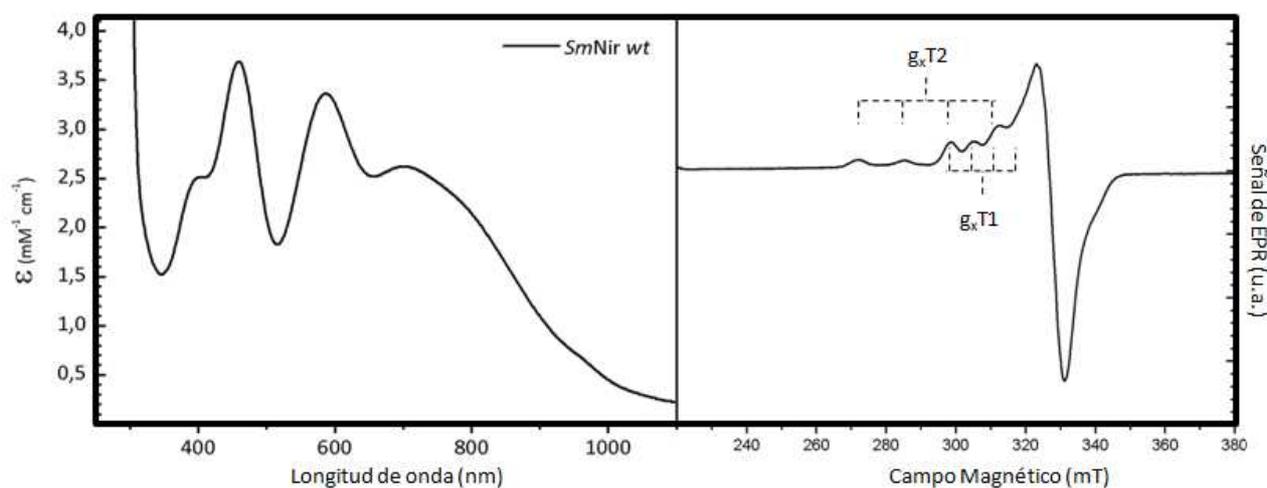


Fig. 34 - Espectro UV-VIS (izquierda) y EPR (derecha) de la *SmNir wt*. Pueden verse las bandas características de una nitrito reductasa verde a ~ 490 nm y ~ 600 nm, así como las señales típicas de centros T1 y T2 mostrando las líneas de interacción hiperfina en g_x

Los resultados experimentales de *SmNir wt* están en línea con la estructura seleccionada como molde para el modelado por homología mencionada en Materiales y Métodos (sección 2.3.1.) que tiene alrededor de un 84% de identidad de secuencia con *SmNir wt*. y cuya estructura también corresponde a un trímero con sitios T1 y T2 en cada monómero[167], además de propiedades espectroscópicas similares a la nuestra.

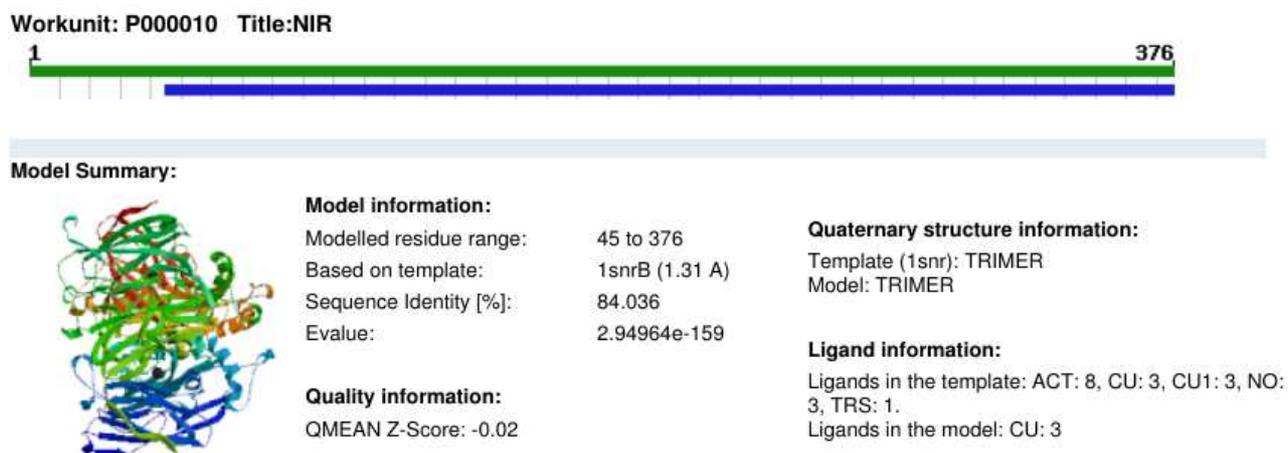


Fig. 35 - Resumen del modelo creado por homología. Se verifica el porcentaje de identidad de secuencia es de ~84 % entre el molde y el modelo, que ambos sistemas tienen una estructura cuaternaria de trímero y que sólo se incluyeron los átomos bajo el nombre CU en el modelo.

El elevado porcentaje de identidad de secuencia, el poseer los residuos coordinados a los centros metálicos conservados y los resultados de los test realizados en el servidor sobre el modelo obtenido indican que la estructura tiene calidad suficiente para ser utilizada en el presente trabajo de tesis como punto de partida (ver Fig. 35).

Las simulaciones de minimizaciones energéticas realizadas sobre la estructura obtenida con el servidor evidencian una equilibración de las energías durante el tiempo de simulación empleado (ver Fig. 36).

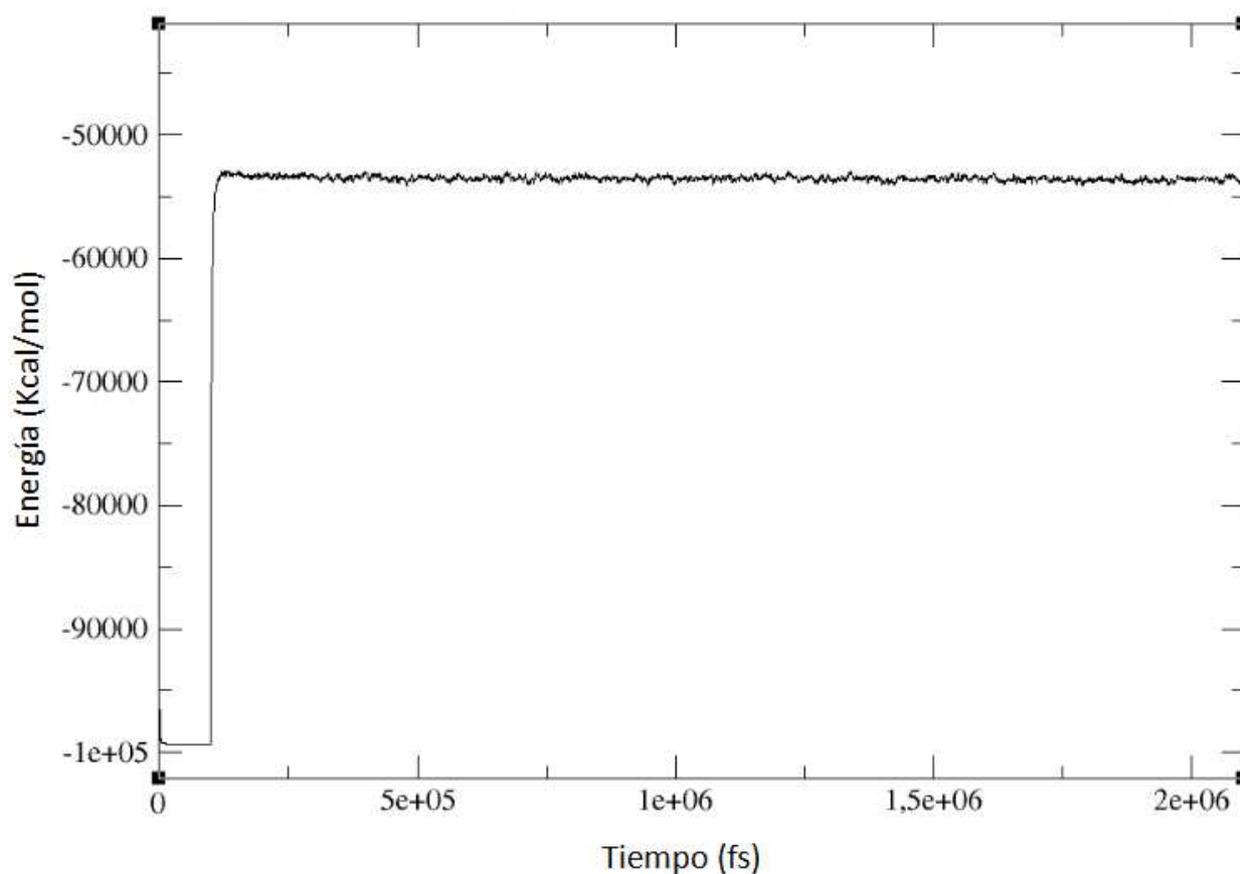


Fig. 36 - Gráfico de energía vs tiempo en la dinámica de minimización y equilibración dejando libre de movimiento las aguas más los residuos que estuvieran a más de 10 Å de los átomos de Cu.

Posteriormente se realizó la optimización de la estructura de *SmNir wt* como fue descrito en 2.3.1. cuyo resultado se ilustra en la Fig. 37 comparando la estructura obtenida con una estructura cristalográfica de la especie *AfNir* pero obtenida más recientemente y con mayor resolución que la usada para generar el modelo (PDB 5F7B). Esta estructura presenta el O apical al sitio T2, asignado como una molécula de agua, en dos posibles posiciones con un 30% y 70% de ocupación[137]. Como se ve en la imagen, ambos modelos estructurales son prácticamente iguales con un RMSD de 0,2 Å calculado sobre los átomos de la región QM. La molécula de agua 503B coordinada al T2 ($d_{Cu-O}=1,90$ Å) se ubicó en la posición de la molécula de agua cristalográfica con menor porcentaje de ocupación. Este agua ligada al T2 permanece unida por puente hidrógeno al residuo de la segunda esfera ASP134, que forma parte del *sensing loop* (Fig. 32). Además, el enlace de puente hidrógeno entre HIS171 y CYS172 $N^{\delta 1}H...O=C$ presente en la estructura de *AfNir* se encuentra también presente en nuestro modelo. Todas las moléculas de agua incluidas en nuestro modelo, cuyas posiciones fueron optimizadas por los métodos computacionales, no muestran diferencias significativas a las determinadas por rayos-X. Por lo

antes mencionado consideramos que la estructura final obtenida por QM/MM de *SmNir wt* es suficientemente confiable y que el protocolo empleado es correcto.

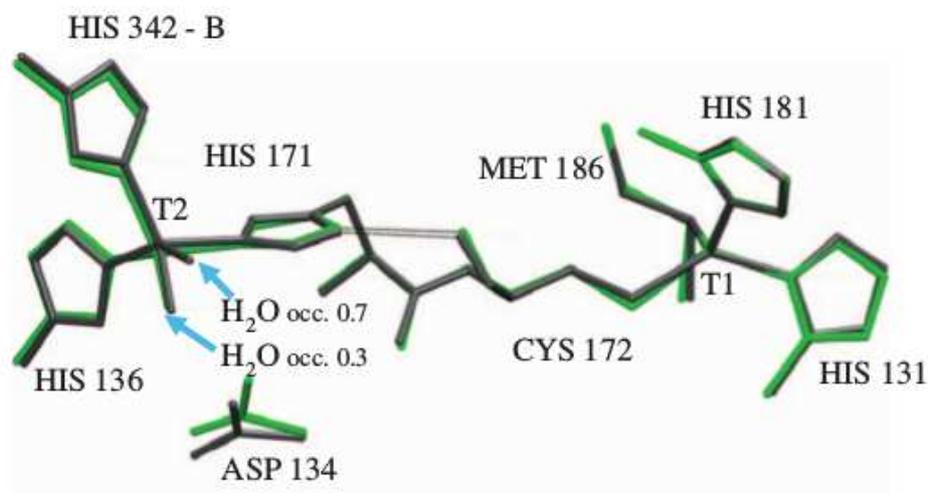


Fig. 37 - Comparación de la estructura optimizada de *SmNir wt* (verde) y la estructura cristalográfica *AfNir* (gris PDB 57FB). Se visualiza el sitio activo indicando el puente hidrógeno HIS171.N_{δ1}-CYS172.O presente en ambos casos

2.4.1.2. H171D

Al no contar con una estructura cristalográfica de esta variante se decidió hacer una estructura *in-silico* a partir de la obtenida para *SmNir wt*. El trabajo experimental[152] determinó que el peso molecular de cada monómero es consistente con *SmNir wt* (~42,5kDa) y que se forma un trímero, lo que confirmó que la mutación puntual realizada no afecta la estructura cuaternaria de *SmNir*. Los análisis de metales identificaron 1,9 Cu/monómero para H171D, como es esperable para Nir con cobre incorporado en ambos sitios T1 y T2, por lo cual haber respetado los átomos de Cu de *SmNir* fue correcto. Los estudios espectroscópicos de UV-VIS (ver Fig. 38 panel izquierdo) son similares a los obtenidos para *SmNir wt* (ver Fig. 34 panel izquierdo) indicando que el centro T1 de H171D es también verde[152] y que el reemplazo de HIS por ASP no modifica significativamente la estructura del sitio T1 ni el potencial de reducción del mismo. Los análisis de la señal de EPR en la variante H171D (ver Fig. 38 derecha) indicaron la superposición de tres señales aproximadamente axiales de EPR, correspondientes al T1 ($g_{x,y,z}=2,183, 2,052, 2,023$; $A||=7,5$ mT), y otras dos atribuibles a T2 diferentes ($T2_{\perp}^{H171D}$: $g_{x,y,z}=2,330, 2,075, 2,035$, $A||=15$ mT; $T2_{\parallel}^{H171D}$: $g_{x,y,z}=2,280, 2,075, 2,030$; $A||=17$ mT; contenido relativo T1:T2_⊥:T2_∥ 1:0,35:0,65). Los centros T1^{H171D} y T2_∥^{H171D} mostraron comportamientos de reducción similares a los de los centros de la *SmNir wt* y de otras Nirs de diferentes orígenes[138,141,146,168,169], en concordancia con

los potenciales de reducción esperados. En contraste, el potencial de reducción del $T2_{H171D}$ cae en el rango de 0 mV a -400 mV, el cual es un valor inusual para un centro del tipo T2 de Nirs.

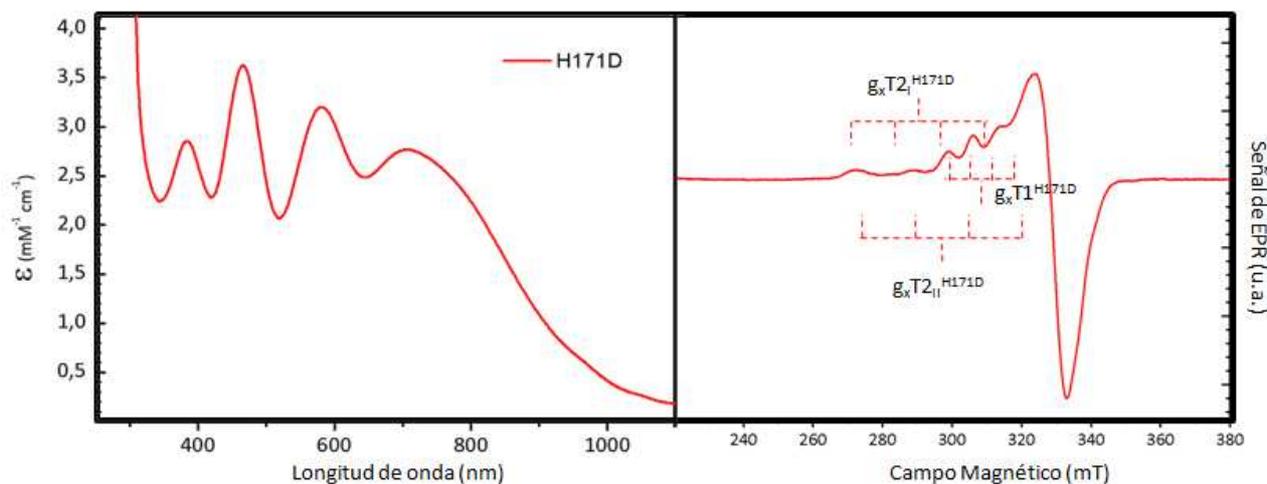


Fig. 38 - Espectro UV-VIS (izquierda) y EPR (derecha) de la variante de *SmNir* H171D. Pueden verse las bandas de absorción máxima a 466 nm ($2,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 579 nm ($2,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en el espectro de UV-VIS y los aportes de las diferentes señales de EPR presentes en la región del g_x

La Fig. 39 muestra una comparación de las estructuras QM/MM obtenidas para *SmNir wt* y la variante H171D. La distancia entre los centros T1-T2 se reduce de 12,6 Å a 12,2 Å debido a que la cadena lateral del residuo ASP es más corta que la original de HIS. El sitio T1 no se ve afectado en esta variante, lo cual se corresponde con los ensayos experimentales de UV-VIS y EPR del T1 (Ver Fig. 38), mientras que el sitio T2 exhibe el residuo ASP171 coordinado al T2 de forma monodentada con su grupo carboxilato de la cadena lateral. ($d_{\text{Cu-O}}$ 1,90 Å y 3,03 Å). A pesar de los ensayos alterando la orientación del grupo carboxilato con el propósito de evaluar otras posibles coordinaciones del residuo al metal, que sean compatibles con los resultados de EPR mencionados, siempre se obtuvo la configuración mostrada en la Fig. 39, es decir, la forma monodentada muestra ser la estructura más estable como ha sido observado también en complejos de cobre en estado sólido con ácido aspártico[170,171]. Estos resultados sugieren que el modo de unión del carboxilato queda determinado por competencia de los residuos HIS342-B y HIS136-A, coordinados al Cu T2, con los residuos coordinados al sitio T1. Debido a que no se pudieron obtener diferentes coordinaciones del carboxilato con el metal, la inhomogeneidad en T2 descrita por EPR puede ser atribuible a una posición diferente del agua apical, como ha sido observado en la especie similar *A/Nir*[137]. Nuevamente se encontró una molécula de agua en la posición apical del átomo de cobre T2 a 1,90 Å, la cual está estabilizada por un fuerte puente de hidrógeno con ASP134-A y un enlace débil con el agua 1200A, que también se encuentra coordinada al residuo de la segunda esfera de coordinación HIS291-B. Este hecho, junto con que

las moléculas de agua tratadas a nivel QM y los residuos que no fueron modificados se mantienen en las posiciones que tenían en la estructura *wt* optimizada, evidencian que la variante no afecta el resto del sistema que es considerado esencial para la catálisis enzimática, a saber, el *sensing loop* unido por puente hidrógeno y la red de moléculas de agua ubicadas en el sitio activo. Otra característica estructural importante es la ausencia del puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$ entre los aminoácidos que hacen de puente T1–T2 el cual se propone como esencial para la TE en Nirs verdes[139]. El camino químico entre T1 y T2 en esta variante es diferente comparado con el de la *SmNir wt*, lo cual puede ser una posible causa de la pérdida de actividad catalítica en H171D.

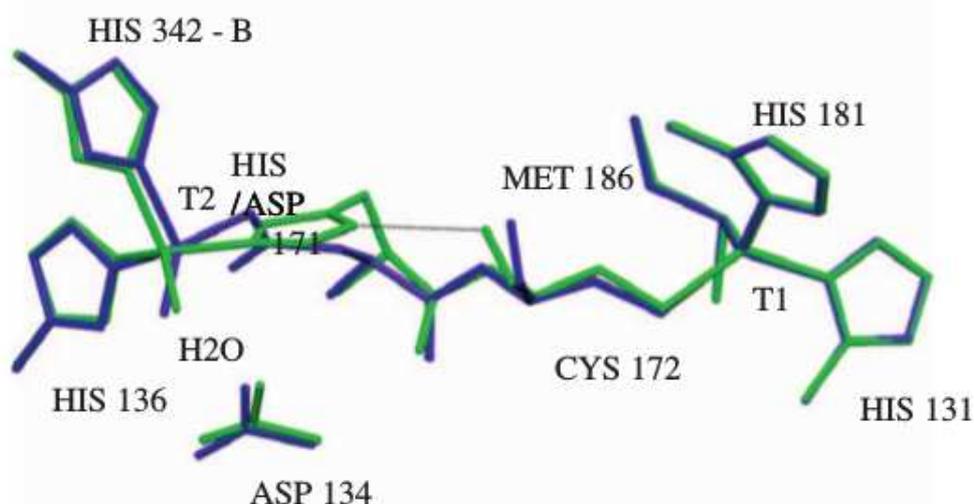


Fig. 39 - Comparación de las estructuras optimizadas de *SmNir wt* (verde) y de H171D (azul). Se identifica la pérdida del puente hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$, la coordinación monodentada del ASP171 al CuT2 y un acercamiento del último en sentido al T1 debido al acortamiento de la cadena lateral de ASP en relación con HIS

2.4.1.3. C172D

La información experimental indicó que la modificación no afecta la estructura cuaternaria ni el tamaño de cada monómero, al igual que lo que ocurre con H171D. Si hubo una diferencia en el contenido de Cu que arrojó 0,7 a 1,3 Cu/monómero para C172D, resultado que sugiere una incapacidad de esta variante en incorporar Cu en el sitio T1 (debido a que el T1 corresponde al sitio donde fue reemplazado el aminoácido). Como era esperable para la variante C172D el espectro de UV-VIS (ver Fig. 40 panel izquierdo) no mostró las bandas de absorción de los T1 de Nirs, ya que el ligando CYS es esencial para obtener características espectroscópicas típicas (Fig. 34 panel izquierdo). Los espectros de EPR de C172D (Fig. 40 panel derecho) no

muestran señal de T1 pero si dos señales de EPR de T2 con componentes en la misma proporción ($T2_{I}^{C172D}: g_{x,y,z} = 2,315, 2,075, 2,070, A_x = 15 \text{ mT}$; $T2_{II}^{C172D}: g_{x,y} = g_z = 2,270, 2,045, A_x = 18 \text{ mT}$), de las cuales una es muy similar a la señal de EPR obtenida para el centro T2 de la *SmNir wt* purificada (ver Fig. 34 panel derecho), lo que sugiere que el T2 no se vió significativamente alterado y que la otra señal de T2 identificada podría corresponder a un T1 modificado. La cuantificación de espines de la señal de EPR del T2 en C172D da una concentración de espín en el orden del contenido de cobre presente, lo que indica que ambas especies de T2 se encuentran completamente oxidadas en las muestras purificadas de C172D consistente con la configuración empleada para el cálculo computacional.

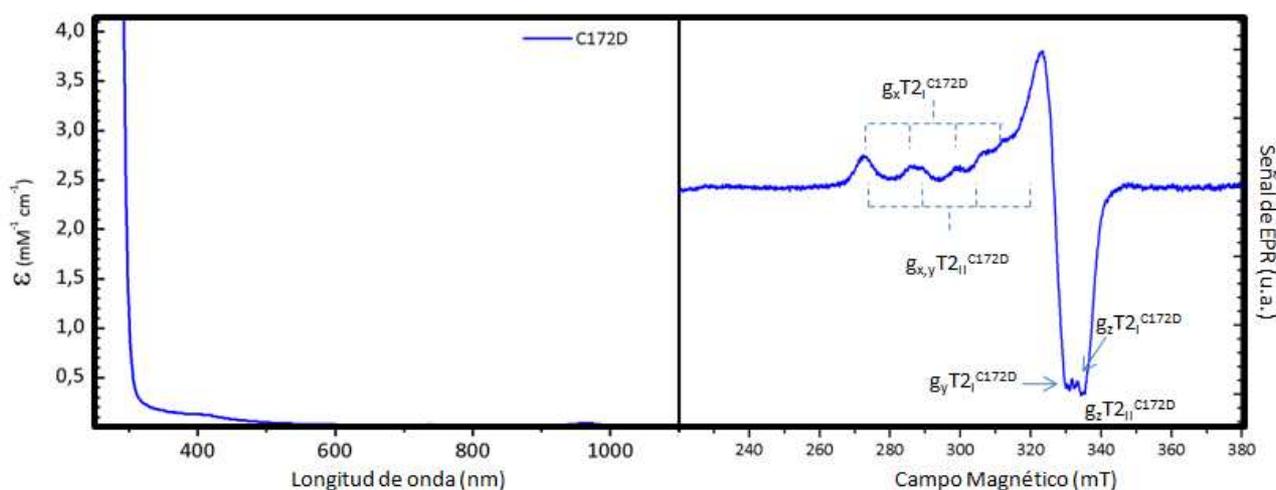


Fig. 40 - Espectro UV-VIS (izquierda) y EPR (derecha) de la variante de *SmNir* C172D. Se ve claramente la ausencia de señal del T1 tanto en el espectro UV-VIS como en EPR y la presencia de dos señales de T2 en EPR cuyos componentes se encuentran discriminados en la imagen.

Pudo obtenerse satisfactoriamente la estructura de C172D sin el Cu en T1, como se describió en 2.3.1.. En la Fig. 41 se comparan las estructuras QM/MM de C172D asumiendo 2 Cu/monómero con la de *SmNir wt* mientras que la superposición de las estructuras de C172D asumiendo 1 y 2 átomos de Cu por monómero puede verse en la Fig. 42.

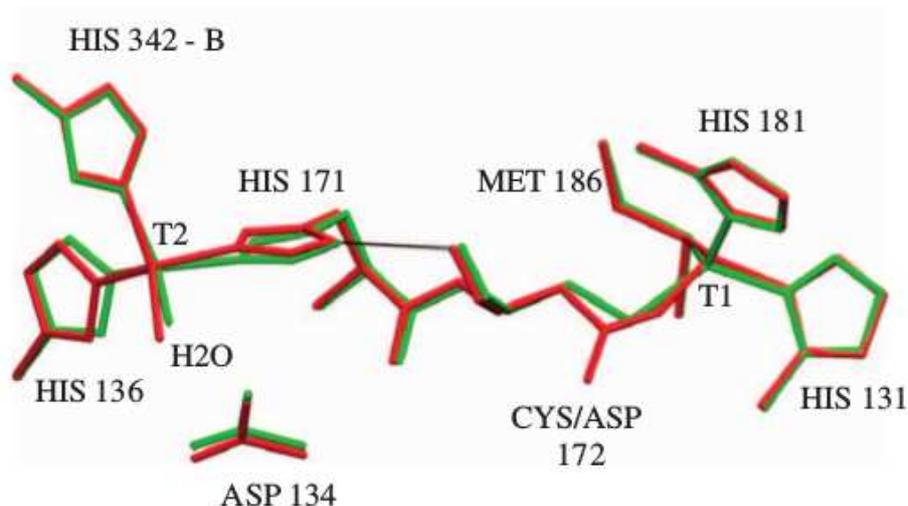


Fig. 41 - Comparación de las estructuras optimizadas de *SmNir wt* (verde) y de C172D con ambos Cu (rojo).

Puede verse que el puente hidrógeno $N^{61}H...O=C$ se encuentra presente en ambas estructuras. La coordinación del ASP 172 al T1 es monodentada. No se observan cambios significativos en las posiciones de los Cu

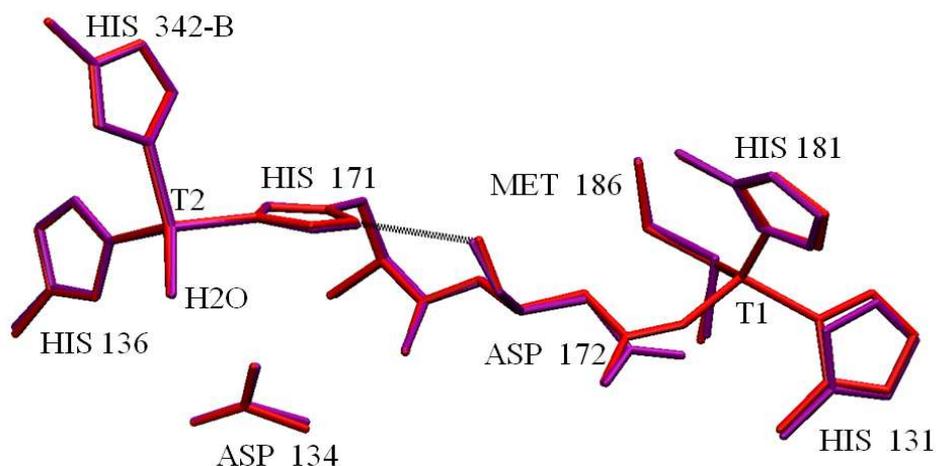


Fig. 42 - Comparación de las estructuras optimizadas de C172D con ambos Cu (rojo) y asumiendo uno solo por monómero (púrpura).

El sitio T2 en ambos modelos estructurales es similar al de *SmNir wt*, mostrando solo sutiles diferencias en las distancias de unión de los imidazoles. El enlace de hidrógeno propuesto para la TE entre los sitios se mantiene en ambos casos. Para el modelo estructural que posee los dos Cu, el Cu del sitio T1 muestra una coordinación tetraédrica, al igual que la forma *SmNir wt*, en la cual el grupo carboxilato de la cadena lateral del ASP172 se une de manera monodentada al metal con una distancia Cu-O de 1,97 Å y 4,05 Å. La presencia de los dos centros de cobre en esta variante está en línea con la existencia de dos señales de Cu T2 distintas de EPR (ver Fig 49) lo cual implica que el centro catalíticamente activo T2,C172D debería corresponder al sitio activo,

mientras que el T2_{||}C172D se asociaría a un centro de Cu T1 modificado. Hay que tener en cuenta que esta posibilidad implica la coexistencia de cuatro subpoblaciones de proteína: una donde ambos sitios contienen cobre, otra sin cobres y dos más donde el Cu se encuentra en un sitio solamente. Sin embargo, debido a que el recuento de metal indica que la proteína contiene un solo cobre por monómero, sumado a que no se observan transiciones d-d asociadas al ion Cu(II) en el centro T1 modificado, no se puede descartar que sólo el sitio activo esté completamente ocupado y, en tal caso, las dos señales de EPR del T2 deberían corresponder a una inhomogeneidad del sitio.

2.4.2. Interacciones NO₂⁻-T2 e interacciones T1-T2

Debido a que los estudios de actividad de la variante H171D indicaron que dicha enzima es inactiva tanto con metil viológeno como dador electrónico como con el dador fisiológico *SmPaz*, decidimos evaluar tres hipótesis sobre la razón de dicha inactividad: a) la imposibilidad de ligar nitrito del nuevo T2; b) que debido a los cambios producidos sobre el T2 la energía necesaria para remover el agua apical se vea incrementada de manera que no se pueda liberar el sitio para que interactúe el sustrato con el metal y c) una deficiencia en la TE entre los sitios metálicos a raíz de la pérdida del puente hidrógeno N^{δ1}H...O=C producto de la modificación del aminoácido HIS del puente. Las dos primeras hipótesis se relacionan con la interacción sustrato-sitio activo y se basan en que el espectro de EPR de la variante no sugiere interacción del NO₂⁻ con el sitio catalítico. En relación a la última hipótesis se considerará correcta si las dos anteriores no lo fueran. Adicionalmente, a fin de encontrar la razón por la cual la ausencia de dicho puente afecta la actividad de la enzima, se propone evaluar si la interacción entre ambos sitios de Cu se ve alterada en la variante H171D. Lo anterior se fundamenta en que como la tasa de TE es proporcional al J de intercambio, si los centros T1-T2 estuvieran acoplados por intercambio en *SmNir wt* una modificación en dicha interacción, debido a la alteración en la estructura, sugeriría una modificación en la tasa de TE T1-T2.

2.4.2.1. Interacción Nir/variante-NO₂⁻

Para el caso de la *SmNir wt* hay evidencia experimental de EPR que nos permite confirmar la presencia de la interacción de nitrito con el T2 al observarse un ligero corrimiento de los picos correspondientes a la señal del T2 en presencia de NO₂⁻ (ver Fig. 43).

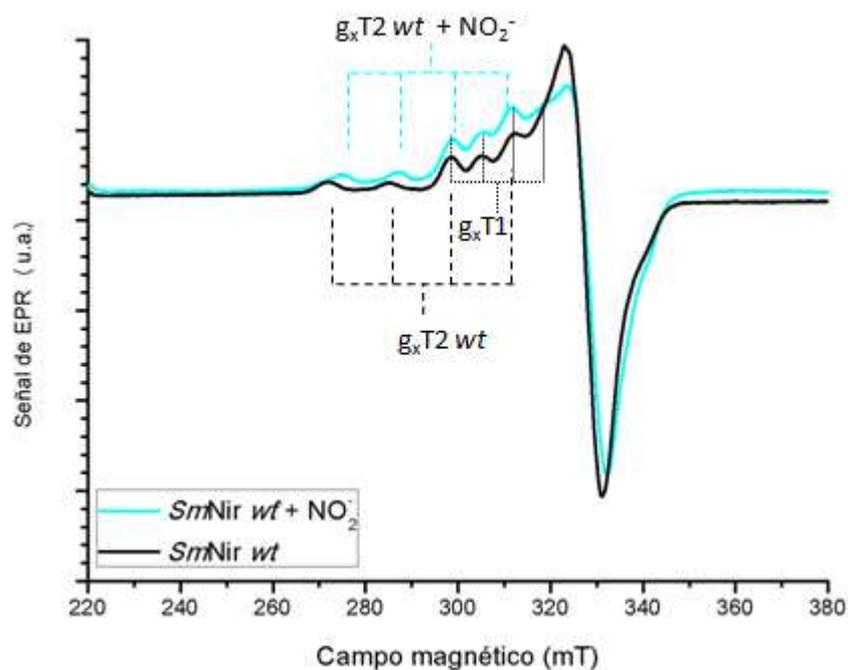


Fig. 43 - Espectros de EPR *SmNir wt* (negro) y de *SmNir wt* reaccionado con NO_2^- (celeste). Se observa un leve corrimiento de los picos correspondientes al T2 al igual que un menor valor de A_x

De las variantes de *SmNir* reaccionadas con nitrito se vió que sólo la señal de EPR $\text{T2}_I^{\text{C172D}}$ muestra unas ligeras modificaciones en los valores de $g_{||}$ y $A_{||}$ que están en línea con el comportamiento observado en la especie *wt* en esas condiciones. Las señales de EPR, de T2 de H171D y la $\text{T2}_{II}^{\text{C172D}}$ no mostraron cambios en presencia de nitrito indicando que estos sitios T2 no se comportan de la misma manera que el T2 activo de la enzima *wt*. Adicionalmente, como se dijo más arriba, estudios cinéticos de H171D mostraron que dicha variante era inactiva con metil viológeno como dador artificial de electrones y con el dador fisiológico *SmPaz*, lo que sugiere una posible ausencia de interacción del sustrato con el sitio catalítico en la variante mencionada.

A fin de analizar si la inactividad de H171D es un problema en la unión del sustrato al sitio T2 realizamos cálculos computacionales QM/MM con el nitrito unido tanto en *SmNir wt* como en H171D.

Los cálculos mostraron que tanto para *SmNir wt* como para H171D el nitrito se coordina al T2 de manera bidentada por medio de los dos átomos de O, siendo las distancias para la *SmNir wt* de 2,26 Å para el enlace Cu-O1 y de 2,09 Å para el Cu-O2, mientras que para la variante H171D las distancias resultaron ser más simétricas con valores de 2,09 Å y 2,05 Å para los respectivos enlaces (ver Fig. 44). Esta forma de coordinación bidentada ha sido observada también en

estructuras cristalográficas reaccionadas con nitrito de otras Nirs [167,172], y en varios complejos de Cu [153–155] algunos discutidos en 2.1.5. En la estructura que obtuvimos la coordinación se da formando un ángulo de 10° y 5° entre los planos ONO y OCuO para *SmNir wt* y la variante H171D, respectivamente, en línea con cálculos previos[154], pero ligeramente menor que los obtenidos en estructuras cristalográficas de Nir[137,167]. La posición del anión nitrito sería estabilizada inicialmente por los residuos ASP134-A e ILE293-B.

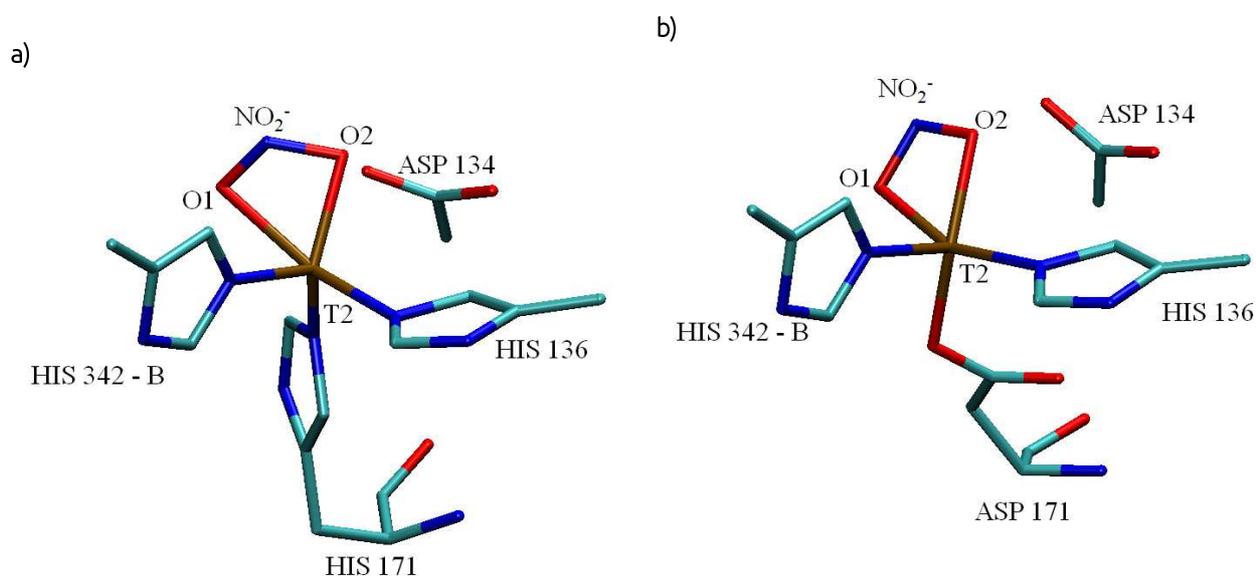


Fig. 44 - Comparación del sitio activo de las estructuras optimizadas de a) *wt SmNir* y b) H171D con nitrito en la posición apical de T2

Debido a que la capacidad de ligar nitrito no se vio afectada en la variante H171D evaluamos el costo de remover el ligando agua apical en ambas estructuras, como posible causa de inactividad de la variante.

Estos estudios no mostraron diferencia en las energías relativas para remover el ligando apical entre los dos sistemas (ver Fig. 45), lo que implica que la pérdida de actividad en la variante no puede ser atribuible a la falta de unión del sustrato al sitio activo.

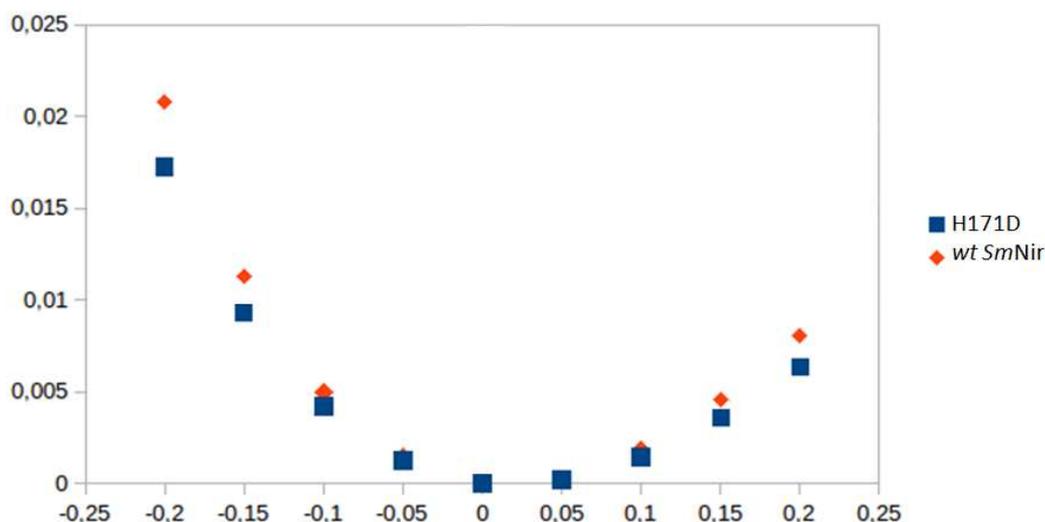


Fig. 45 - Comparación de las diferencias de energía al alejar el agua apical del T2 relativas a las correspondientes a la posiciones de equilibrio de los sistemas *wt SmNir* (rombos rojos) y variante H171D (cuadrados azules).

A raíz que pudo obtenerse una estructura estable para los dos sistemas estudiados reaccionados con nitrito, y que la diferencia energética de remover el agua del estado *resting* fue comparable en ambos casos, se concluye que el origen de la pérdida de actividad en H171D tiene que deberse a una ineficiencia en el mecanismo de TE entre los sitios, más específicamente la ausencia del puente de hidrógeno $N_{\delta 1}H...O=C$ propuesto como camino de TE para las Nirs verdes.

2.4.2.2. Interacción de intercambio T1-T2

Los resultados de EPR de *SmNir wt* muestran que no se detectó acoplamiento magnético T1-T2 al no modificarse la posición ni el ancho de los picos de la señal del T2 en las muestras semireducidas de *SmNir* (ver Fig. 46). Para la variante H171D los resultados fueron los mismos, lo que implica que el valor de J , asumiendo que no sea 0, tiene que ser menor que $0,01 \text{ cm}^{-1}$, límite aproximado de detección de la técnica, lo que de alguna manera excluyó una técnica experimental para evaluar la interacción entre los centros.

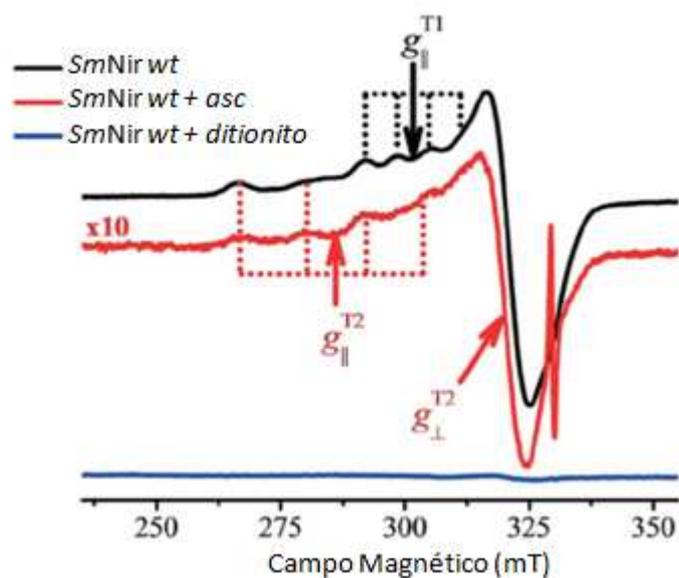


Fig. 46 - Espectros de EPR *SmNir wt* (negro) reducida con ascorbato (rojo) y reducida con ditionito (azul). En la señal negra pueden observarse las líneas de resonancia para ambos sitio de Cu. La señal roja se encuentra semireducida, al no estar presente la señal de T1 adicionalmente se observa que la señal del T2 no se modifica, lo que indica que no hay interacción entre los centros.

Dado que la metodología computacional permite estudiar el acoplamiento T1-T2 desarrollamos cálculos para confirmar la hipótesis anterior.

Los resultados energéticos así como las geometrías para las dos configuraciones posibles de la enzima *SmNir wt* (configuración ferromagnética y antiferromagnética) no mostraron diferencias con el nivel de cálculo utilizado. Esto evidencia que con los métodos computacionales tampoco se pudo determinar que haya interacción entre los centros. Dichos resultados están en línea con los experimentales realizados en muestras parcialmente reducidas donde no pudo observarse cambios en las líneas del espectro del T2 en ausencia de T1.

2.4.3. Conclusiones

Los cálculos computacionales mostraron que la *SmNir* conserva la estructura 3D observada en Nirs obtenidas de otras fuentes. Esta metodología, utilizada también para obtener la estructura de las variantes H171D y C172D mediante mutaciones *in silico* de la *SmNir*, permitió concluir que las estructuras de las variantes conservan la estructura de la *SmNir* excepto a nivel de la mutación específica realizada.

En las tres formas de *SmNir* mencionadas se obtuvo una estructura estable asumiendo dos cobres por monómero y una estructura adicional para la variante C172D con un sólo átomo de Cu por monómero ubicado en el sitio T2. La variante C172D con un solo cobre se realizó debido a que la cuantificación de cobres arrojó valores inferiores a dos átomos por monómero, en contraste con lo obtenido para la *SmNir* y H171D. En las variantes H171D Y C172D los residuos cambiados lograron coordinarse al Cu (excepción el caso en que se eliminó el Cu del T1 para C172D). El puente de hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$ entre HIS171 y CYS172 propuesto como camino de TE en las Nirs verde se conservó en la estructura *SmNir* y en la variante C172D, mientras que no se pudo formar en la variante H171D. Cabe mencionar que esta última demostró ser inactiva por métodos experimentales. Tanto en *SmNir* como en H171D se obtuvo una estructura con la molécula de NO_2^- ligada al T2, indicando que esta variante no perdió la capacidad de unir el sustrato. Adicionalmente se evaluó la energía necesaria para remover el ligando apical al T2 en el estado *resting* para las dos estructuras mencionadas, no encontrando diferencia entre ambas. Dado que el centro T2 de la variante H171D no pierde capacidad de unión del sustrato y que tampoco la energética de la remoción del ligando apical es diferente a la obtenida para *SmNir*, se postuló que el problema de la inactividad en la variante debe estar en la TE T1-T2, más específicamente asociada a la pérdida del puente hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$ en H171D, hipótesis que está en línea con resultados experimentales en el grupo de trabajo. Este último aspecto intentó ser evaluado mediante cálculos teóricos de la interacción de intercambio J T1-T2, pero, al igual que en el experimento de EPR, los valores el J asociado a este camino químico caen desafortunadamente dentro de la incerteza de los métodos. Se están evaluando metodologías alternativas de cálculo para superar esta dificultad.

Conclusiones

La catálisis enzimática de la *DgAOR* consiste en un mecanismo que precisa la participación del residuo catalítico GLU869 y que es energéticamente posible aún conservando el ligando O ecuatorial al Mo, es decir, la reacción enzimática puede realizarse en la forma “desulfo” de *DgAOR*. GLU869 actúa como base de Lewis tras su protonación con el átomo H_x , unido inicialmente al O_{cat} ligado al Mo y cuya transferencia se produce solo por el acercamiento del sustrato, que corresponde a un aldehído, al sitio activo. El sustrato se une al Mo(VI) por medio de su átomo C_{ald} . Luego tiene lugar su oxidación a la forma ácida correspondiente produciendo la reducción del Mo(VI) a Mo(IV). Posteriormente el metal se reoxida en dos electrones, volviendo a la forma Mo(VI), se liberan el producto y un protón y se incorpora un grupo OH quedando la enzima en condiciones de iniciar un nuevo ciclo catalítico. En virtud que el último paso debe ser mediado por el ligando pterina, hace que las propiedades como conductor de electrones del cofactor sufran modificaciones durante la catálisis siendo suprimidas durante la unión del sustrato al sitio de Mo(VI), y activadas durante la salida del producto y oxidación del sitio de Mo(IV).

La estructura de la *DgAOR* no inhibida corresponde a la enzima lista para reaccionar, mientras que las formas inhibidas con alcoholes son análogas al momento en que el producto ya formado permanece a una distancia de unión con el Mo. El hecho que J aumenta ~ 2 veces en las formas inhibidas sugiere que la reacción de TE mediada por el camino químico Mo-FeS1 se ve incrementada en esa situación, lo que está en línea con lo esperado para el comportamiento de las propiedades como conductor electrónico del cofactor pterina. A nivel del sitio activo podemos ver el rol del ligando catalítico lábil OH_x regulando el proceso de TE Mo \rightarrow FeS1, ya que su sola presencia/ausencia modifica la distribución de la densidad de espín sobre el Mo; es decir, su presencia significa que una parte considerable de la densidad de espín se sitúa sobre el OH_x , mientras que su ausencia implica que la densidad de espín se deslocaliza en parte sobre el ligando pterina.

Mediante los cálculos computacionales de *SmNir* se lograron obtener las estructuras tridimensionales de *SmNir wt* y las formas variantes H171D y C171D. Los tres sistemas poseen estructuras cuaternarias de trímeros lo cual es consistente con estudios espectroscópicos y con las estructuras de otras CuNir. Debido a que el recuento de cobres de la variante C172 arrojó valores inferiores a dos átomos por monómero mientras que para la *SmNir wt* y la variante H171D el recuento informó dos átomos por monómero, las estructuras fueron obtenidas

asumiendo dos cobres por monómero y se evaluó una estructura adicional para la variante C172D con un sólo átomo de Cu por monómero, ubicado en el sitio T2, que también produjo una estructura estable. Comparando las estructuras de la forma *wt* con las variantes vemos que los cambios estructurales significativos tuvieron lugar principalmente en el sitio de Cu que presentaba la modificación, mientras que el resto del sistema permaneció casi sin cambios y ambos residuos lograron coordinarse al Cu (excepción el caso en que se eliminó el Cu del T1 para C172D). El puente de hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$ entre HIS171 y CYS172 propuesto como camino de TE en las Nirs verdes no se conservó en la variante H171D pero si se mantuvo en los otros dos sistemas. La variante que perdió el enlace de puente hidrógeno demostró ser inactiva por métodos experimentales. Tanto en *SmNir wt* como en H171D se obtuvo una estructura con la molécula de sustrato ligada al sitio activo, indicando que esta variante no perdió la capacidad de unir el NO_2^- . La evaluación del costo energético de remover el ligando apical al T2 en el estado *resting* para las dos estructuras mencionadas, no arrojó diferencia entre ambas estructuras. Debido a los dos resultados anteriores se sugiere que la causa de inactividad en la variante H171D debe estar en la TE T1-T2. Esta conclusión fue evaluada y confirmada experimentalmente en el grupo de trabajo, encontrando que el problema de la TE se debe a la pérdida del puente hidrógeno $N^{\delta 1}H...O=C$.

ANEXO I:

Fundamentos teóricos de los métodos computacionales empleados y de EPR

1. Métodos computacionales

En este anexo se describen los métodos computacionales empleados en el presente trabajo de tesis sin ahondar demasiado en la descripción a nivel teórico de la metodología computacional, sino más bien intentando dirigirla a un público general. Este enfoque se debe a que la tesis corresponde a un trabajo de doctorado en Cs. Biológicas y por lo tanto nos dirigimos a ese público. No obstante es importante notar que los formalismos seguidos fueron cuidadosamente aplicados.

1.1. Introducción

Los métodos computacionales son una herramienta teórica que se utiliza para estudiar sistemas por medio de un modelo del sistema bajo estudio. Lo deseable es que el modelo represente lo más fielmente posible las características del problema real que nos interesan, según el objetivo que se persigue para el estudio. Lógicamente cuanto más parecido a la realidad sea el modelo, más exacto sea el método o mayor sea el tamaño del sistema, más costoso será computacionalmente nuestro estudio. Normalmente uno termina optando por un modelo que sea lo suficientemente confiable para el problema a estudiar en función de las capacidades computacionales que dispone. Afortunadamente el desarrollo tecnológico sigue en pleno crecimiento y con la utilización de grandes *clusters* de computadoras y tarjetas gráficas utilizadas para cómputo (GPU) podría decirse que el factor limitante termina siendo el tiempo real que se dispone para obtener un resultado, ante que los recursos computacionales.

No hay que perder de vista que el modelo debe cumplir algunos requisitos mínimos según lo que estemos buscando estudiar, por ejemplo, si vamos a estudiar rupturas y formaciones de enlaces entre átomos es preciso si o si utilizar un nivel de cálculo que modele tal efecto. Si nuestro sistema en estudio es una proteína en la cual queremos analizar una reacción que tiene lugar en el sitio activo, pero los recursos con los que disponemos no nos permiten utilizar mecánica cuántica en todo el sistema, lo conveniente es elegir un modelo reducido de la proteína que contenga al sitio activo y modelarlo con ese nivel de teoría, y el resto tratarlo con un nivel de teoría más simplificada, como por ejemplo mecánica clásica.

1.2. Mecánica clásica

La mecánica molecular, también llamada métodos de campos de fuerzas, permite describir la estructura, movimiento e interacciones del conjunto de átomos que forman una molécula, considerando a éstos como si fueran una colección de esferas de masa m unidas por resortes que representan los enlaces (ver Fig. A1.1), en donde la interacción entre masas se puede modelar con un potencial armónico. Conociendo las longitudes normales de los resortes (distancias interatómicas de equilibrio), los ángulos entre ellos (ángulos de enlace) y la energía necesaria para comprimir o estirar el resorte se puede calcular la energía del sistema. Los electrones y protones son tratados implícitamente en la carga total del átomo, por lo que no se puede obtener con este método ninguna propiedad electrónica como ser, la distribución de cargas o los caracteres nucleofílico y electrofílico de un átomo particular.



Fig. A1.1 -En mecánica molecular los átomos se representan por esferas y los enlaces entre ellos como resortes. Se ejemplifica el caso de la molécula de agua cuyo átomo de oxígeno está representado con una esfera roja y los hidrógenos con esferas blancas.

El movimiento de las partículas se rige de acuerdo a la ecuación de movimiento Newtoniana $\mathbf{F}=\mathbf{m}\cdot\mathbf{a}$ donde \mathbf{m} es la masa de cada átomo, \mathbf{a} la aceleración que sufre \mathbf{m} y la fuerza \mathbf{F} surge de una serie de potenciales que siguen las leyes de la física clásica e incluyen las siguientes componentes:

$$E = \sum_{\text{enlaces}} \text{estiramientos} + \sum_{\text{ángulos}} \text{apertura angular} + \sum_{\text{diedros}} \text{torsión} + \sum_{\text{pares no unión}} \quad (\text{Ec. A1.1})$$

donde el primer término corresponde a la interacción entre pares de átomos relacionados por un enlace covalente, el segundo describe la interacción entre tres átomos consecutivos, y el tercero la interacción entre cuatro átomos también consecutivos. El último término describe las interacciones no enlazantes entre pares de átomos, debidas a las fuerzas de van der Waals (que se aproxima por un potencial tipo Lennard-Jones) y las interacciones electrostáticas (debido a las cargas de los átomos que se consideran como cargas puntuales). La Fig. A1.2 muestra ejemplos de las interacciones antes mencionadas para un conjunto de átomos y las funciones que corresponde a cada una.

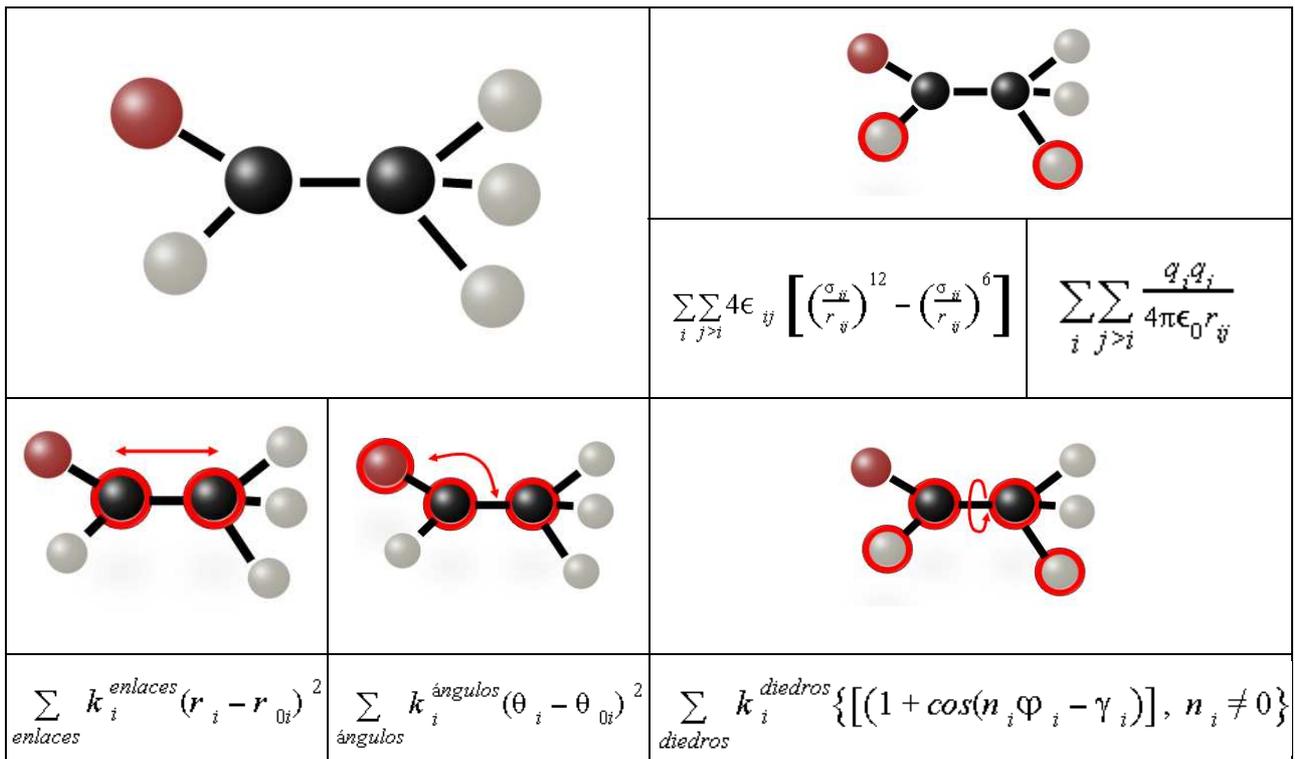


Fig. A1.2 - Representación de una molécula sencilla dónde se indican las diferentes interacciones que contribuyen a la energía potencial

La Ec. A1.1 junto con una serie de parámetros que determinan los tipos de átomos y las constantes de cada uno de los potenciales, se conocen como campo de fuerza, y se usa para calcular la energía total de un sistema de átomos en función de las posiciones en el espacio de éstos. La determinación de todos estos parámetros se denomina parametrización. Esta suele requerir la combinación de cálculos de mecánica cuántica e información experimental que permita reproducir propiedades estructurales, mecánicas y termodinámicas de los sistemas estudiados.

Lo destacable de los métodos de campo de fuerzas es que una vez obtenidos los parámetros de por ejemplo un dado aminoácido, se puede usar esa parametrización cuando ese aminoácido se encuentre en un entorno diferente dentro de una proteína, sin necesidad de realizar una nueva parametrización.

1.2.1 Dinámica molecular

Cuando seguimos la evolución temporal, derivada de las leyes de Newton, para un sistema de partículas determinado estamos realizando una simulación de dinámica molecular del sistema. Por lo general previo a la simulación por dinámica molecular se realizan tres pasos: minimización energética de la estructura, calentamiento hasta la temperatura a la cual se realizará la dinámica molecular y equilibración a esa temperatura. Posteriormente a esos pasos se realiza la etapa de producción. En la primera de ellas lo que se realiza es una evolución del

sistema disminuyendo gradualmente la temperatura por lo general hasta “congelar” el sistema. El segundo paso parte de la estructura final de la minimización y va elevando la temperatura hasta llegar a la deseada para la simulación que vamos a realizar. El tercer paso de equilibración es una corrida relativamente corta, en relación a las anteriores, en la cual la temperatura se deja constante buscando principalmente que la energía se estabilice. Por último la producción parte del resultado de equilibración y tiene las mismas condiciones de temperatura que el paso anterior, pero a diferencia de éste el tiempo de simulación debe ser el suficiente para que ocurra el proceso que estamos estudiando. Por ejemplo, si queremos estudiar si un aminoácido determinado puede presentar dos orientaciones diferentes y por bibliografía sabemos que dicho cambio ocurre cada 2 ns la producción de nuestra dinámica debe ser mayor a 2 ns para poder inferir si dicho evento sucede o no.

Las simulaciones de dinámica molecular pueden ser realizadas en diferentes condiciones “experimentales” que reciben el nombre de ensambles. El ensamble más utilizado se denomina ensamble canónico (NVT) y consiste en mantener fijo tanto el número de partículas, el volumen y la temperatura promedio durante la fase de producción [173,174]. Otros ensambles posibles son el microcanónico (NVE), donde en lugar de la temperatura se pretende mantener constante la energía, o el isobárico (NPT) donde se mantiene constante la presión en vez de el volumen, entre otros [173]. Adicionalmente, se pueden implementar diferentes situaciones para el solvente cuyas variantes son no considerar el solvente o en vacío, con solvente considerado en forma implícita o con solvente considerado en forma explícita. En la simulación en el vacío el sistema sólo ve y siente el efecto de los átomos del propio sistema. Al utilizar el solvente en forma implícita se reemplaza el efecto del solvente por un medio continuo con una dada respuesta dieléctrica que puede ser uniforme o depender de polarizaciones locales. La última aproximación es la más costosa computacionalmente hablando, pero la más real, y consiste en incluir en el sistema los átomos de solvente de forma explícita, los mismos pueden dejarse fijos o móviles durante la simulación, siendo lo segundo lo más correcto, y brinda la ventaja de poder obtener interacciones de puente hidrógeno que estabilicen el sistema, así como un mejor apantallamiento de las cargas de los átomos. Otro aspecto es la inclusión de contra-iones a fin de neutralizar el sistema completo y asegurar un correcto apantallamiento de los residuos superficiales cargados.

1.3. Mecánica Cuántica

La mecánica cuántica trata el movimiento de los electrones bajo la influencia de fuerzas electromagnéticas producidas por las cargas nucleares [175]. La ecuación de Schrödinger (independiente del tiempo) cumple un rol fundamental ya que permite conocer la estructura

electrónica y las propiedades de cualquier conjunto de átomos e introduce el concepto de función de onda Ψ que describe el estado electrónico de esos átomos y permite determinar su energía. Otra particularidad de esta metodología es que la energía está cuantizada, produciéndose emisiones o absorciones en paquetes con energía discretizada e iguales a $h\nu$, donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia asociada a la energía. Existen diferentes aproximaciones para resolver la ecuación de Schrödinger y obtener la energía del sistema. Los métodos más estrictos a las leyes de la cuántica son los métodos *ab initio* o de primeros principios en los cuales no se precisa de ningún valor experimental para parametrizar las ecuaciones, sino que se obtienen las energías siguiendo la ecuación de Schrödinger y el nivel de cálculo queda determinado por las aproximaciones utilizadas en el mismo. El método convencional se llama Hartree Fock y la función de onda total molecular es calculada por un determinante de Slater compuesto de los orbitales de espín ocupados. Los métodos semiempíricos combinan la teoría física con los métodos experimentales. Parten de la ecuación de Schrödinger y derivan de esta una serie de ecuaciones secundarias que son resueltas por niveles de energía y coeficientes de orbitales moleculares. Los métodos semiempíricos son entre 100 y 1000 veces más rápidos que los *ab initio* y los métodos del funcional de densidad ya que algunas integrales son eliminadas, otras son aproximadas utilizando valores experimentales y otras integrales son directamente aproximadas no exactas. Tanto los métodos *ab initio* como los semiempíricos calculan la función de onda molecular y por ende son métodos de función de onda. Un enfoque diferente es el realizado por los métodos del funcional de densidad, donde la base no es la función de onda, sino la función de densidad electrónica, también llamada densidad electrónica o densidad de carga y representa la probabilidad de encontrar un electrón en un determinado volumen.

1.3.1. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

Surge en 1964 de la mano de Walter Kohn y Pierre Hohenberg [176] quienes formularon un teorema que estableció las bases matemáticas de la teoría del funcional de la densidad. Este enfoque permite, a partir de conocer la densidad electrónica del sistema, obtener tanto la energía total como todas las demás propiedades electrónicas del sistema en el estado fundamental de forma unívoca. Al considerar la densidad electrónica como variable principal se reduce la complejidad de los cálculos, ya que esta variable depende sólo de 3 coordenadas espaciales, en lugar de las $3n$ coordenadas espaciales y n coordenadas de espín que se precisan para trabajar con la función de onda. El teorema también establece que la energía obtenida para el estado fundamental es siempre menor o igual que la energía obtenida con cualquier densidad electrónica de prueba [175], es decir, garantiza que la energía exacta del estado fundamental es siempre la menor y esto se obtiene minimizando el funcional $E[n(r)]$ que incluye la energía cinética, la interacción electrón electrón y un potencial externo. Así se sustituye el difícil

problema de encontrar el mínimo de energía respecto de la función de onda por encontrar el mínimo del funcional $E[n(r)]$ respecto a la densidad electrónica $n(r)$ que, como se dijo, es una función tridimensional. Adicionalmente la densidad electrónica puede ser obtenida experimentalmente por difracción de rayos X o difracción electrónica [177], mientras que la función de onda no es medible.

Para tratar el funcional de la energía Kohn y Sham proponen un método por el cual, al no poder conocer exactamente la energía cinética a través de un funcional explícito de la densidad electrónica, se trata de encontrar al menos la mayor parte de ella de manera exacta y el resto manejarlo de forma aproximada [178]. La energía entonces se deriva de la obtenida para un sistema ideal de electrones no interactuantes donde sí se puede calcular el valor exacto ya que su función de onda puede ser representada con un determinante de Slater. Estos orbitales son calculados como orbitales de una sola partícula, reciben el nombre de orbitales de Kohn Sham y resultan ser cualitativamente comparables a los orbitales de la teoría de la función de onda. En resumen el problema de minimizar la densidad electrónica se enfrenta resolviendo la ecuación de Schrödinger para una partícula. La diferencia de energía entre la del sistema real y la del ideal está contenida en el funcional de intercambio y correlación que es lo que se debe intentar aproximar [175].

Por último hay que mencionar que si la forma exacta del funcional de intercambio y correlación se conociera, la teoría de Kohn-Sham obtendría también la energía del estado fundamental de forma exacta, pero al tener que realizar aproximaciones para dicho funcional el desarrollo práctico de DFT depende por completo de las aproximaciones realizadas sobre dicho funcional.

1.4. Métodos híbridos QM/MM

En 1976 A. Warshel y M. Levitt introducen los métodos híbridos QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) [179] a partir de la combinación de los enfoques clásicos y cuánticos antes descritos. El objetivo es aprovechar la alta precisión de los cálculos de mecánica cuántica, que como ya se comentó son bastante costosos computacionalmente y generalmente escalan como $O(N^3)$, y la rapidez de los cálculos de mecánica molecular, que escalan como $O(N)$, donde N es el número de átomos en el sistema.

Con esta nueva metodología se hizo posible realizar el estudio de procesos o propiedades químicas y físicas en sistemas de miles de átomos como es el caso de las proteínas. Su implementación consiste en dividir el sistema completo en dos regiones: la región cuántica incluye pocos átomos (siendo el máximo alrededor de unas pocas decenas de átomos) y debe

contemplar la zona de mayor interés del estudio, en proteínas por lo general corresponde al sitio activo; la región clásica contiene el resto del sistema pudiendo incluir también moléculas de solvente en forma explícita (ver Fig. A1.3). Es importante resaltar que cuando ambas regiones comprenden átomos unidos por enlaces covalentes el corte no es arbitrario, sino que preferentemente debe ser realizado en enlaces de C-C y que involucren carbonos de hibridación sp^3 . Este requisito lo que busca es que los enlaces no sean muy polarizados en la zona de frontera entre los diferentes niveles de cálculo.

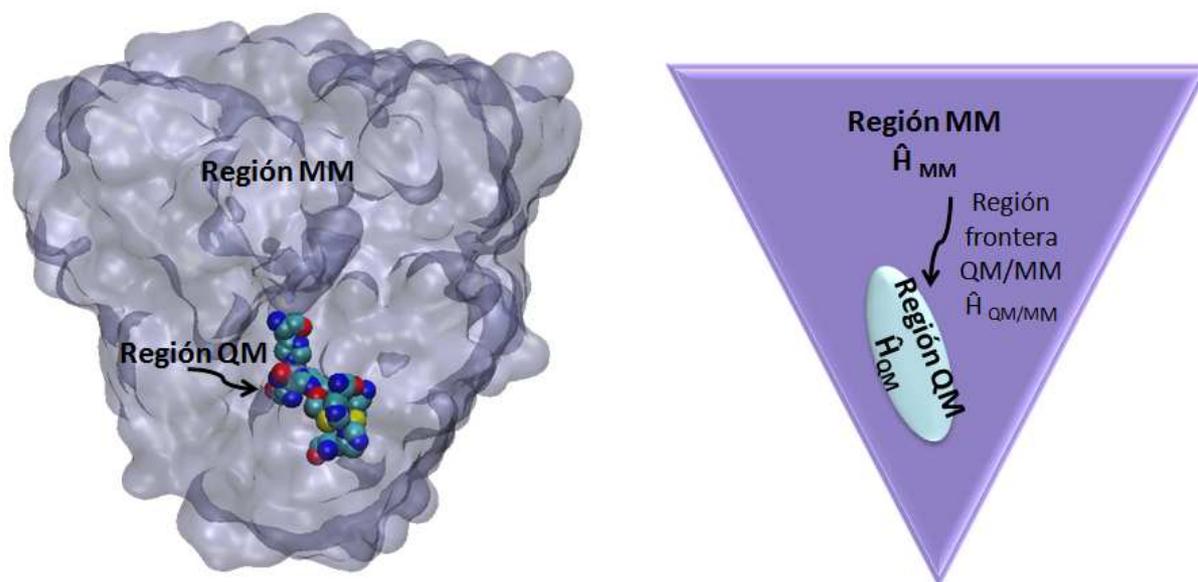


Fig. A1.3 - Representación tridimensional de las regiones QM (en representación VDW) y MM (representación QuickSurf transparente) para un sistema genérico (izquierda) junto con un esquema simplificado del mismo, indicando las diferentes regiones con sus Hamiltonianos asociados.

La energía del sistema se obtiene a través del Hamiltoniano efectivo que resulta de la combinación de los Hamiltonianos de cada región más el de la zona frontera: $\hat{H}_{ef} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM}$, donde el primer término se refiere a la parte tratada de forma cuántica, el segundo término se refiere a la región tratada de forma clásica y el tercer término es el que garantiza la continuidad de las condiciones de frontera entre las partes QM y las MM, representando adecuadamente la interacción entre las dos regiones. Este último está dado por

$$\hat{H}_{QM/MM} = \sum_i \sum_j \frac{Q_j}{r_{ij}} + \sum_m \sum_j \frac{Z_m Q_i}{r_{j,m}} + \sum_m \sum_j \left[\left(\frac{A_{mj}}{R_{mj}^{12}} \right) - \left(\frac{B_{mj}}{R_{mj}^6} \right) \right] \quad (\text{Ec. A1.2})$$

donde i y m indican, respectivamente, los electrones y núcleos de la región QM, mientras que j hace referencia a los átomos de la región MM con cargas parciales Q_j . El primer término de la Ec. A1.2 representa la interacción entre la densidad electrónica y las cargas parciales MM. El segundo

término, es la forma estándar de la interacción Coulombiana entre los núcleos QM y las cargas MM, y el tercer término es la expresión de Van der Waals, con la cual se modelan las interacciones de repulsión y dispersión electrónicas, que no existen entre los átomos QM y MM porque los átomos MM no poseen electrones explícitos [180].

Si no hay enlaces covalentes entre las regiones QM y MM, hay que incluir solo las interacciones no enlazantes, en el caso contrario es necesario describir las interacciones mencionadas para la región MM para los átomos que intervienen en la unión de las regiones.

En el programa Gaussian[94], uno de los más utilizados para esta metodología computacional, la implementación del cálculo de la energía del sistema se realiza sumando el cálculo de la energía del sistema total a nivel MM, más el cálculo a nivel QM de la región cuántica menos la energía MM de la región QM [180]. Además, en los casos que existen enlaces covalentes entre los átomos fronteras se utiliza una metodología denominada H-ter que satura los enlaces de los átomos cuánticos, reemplazando el átomo clásico al que está unido cada uno por un hidrógeno.

2. Introducción a la técnica de EPR

Este subcapítulo pretende ser una breve introducción al lector en los fundamentos básicos de la técnica de EPR. Si bien esta tesis representa un enfoque teórico computacional sobre los sistemas en estudio, las aproximaciones y cálculos realizados se basan en parte en resultados de estudios de EPR, por lo cual, es oportuno conocer el marco en el cual fueron realizados los mismos y la complementariedad entre los cálculos computacionales y EPR.

EPR es una técnica experimental que requiere la presencia de por lo menos un espín electrónico (S) desapareado en el sistema de estudio, ya que provee información sobre la interacción de éste con un campo magnético externo (interacción Zeeman) [181] y con el espín nuclear (I) del átomo en estudio, o el de sus ligandos, (interacción hiperfina) a partir del estudio de los autovalores del Hamiltoniano:

$$\hat{H} = \mu_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{\mathbf{S}} + \hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (\text{Ec. A1.3})$$

dónde el primer y segundo término corresponden a las interacciones Zeeman e hiperfina, respectivamente, μ_B es el magnetón de Bohr, \mathbf{B} es el campo magnético externo, $\hat{\mathbf{S}}$ e $\hat{\mathbf{I}}$ son los operadores del espín electrónico y nuclear, respectivamente, \mathbf{g} y \mathbf{A} son matrices de dimensión 3×3 . Existen otras interacciones que pueden eventualmente intervenir en la ecuación, pero serán descriptas en los casos que se considere necesario[182].

Usualmente todas estas interacciones son anisotrópicas, es decir, las señales obtenidas varían según la orientación del campo magnético en el sistema de referencia molecular del espín desapareado. La técnica permite obtener una caracterización de la estructura electrónica del átomo y, en algunos casos, de los ligandos unidos al centro con espín electrónico desapareado [183]. Toda esta información, analizada mediante modelos físico-químicos apropiados, puede ser utilizada para entender propiedades estructurales del centro que contiene al espín S, que en algunos casos no pueden ser resueltas mediante métodos estructurales convencionales, y procesos de TE en proteínas, entre otras aplicaciones [11,12]. Los radicales libres y las metaloenzimas con metales de transición cuya capa d se encuentra incompleta y/o que contienen cofactores orgánicos con espines desapareados en su estructura, son buenos candidatos para ser estudiados por EPR.

La radiación electromagnética empleada en EPR se encuentra en el rango de las microondas, siendo la frecuencia entre 9-10 GHz (banda X) la más usada. Los espectros de EPR se pueden adquirir en un amplio rango de temperaturas que va desde el orden de los 4 K, o aún menores, a temperaturas mayores a la ambiente. Las muestras pueden estar en los estados de polvo (muestras policristalinas no orientadas), monocristales orientados y soluciones. Éstas últimas, cuando son congeladas, dan espectros del tipo de las muestras policristalinas no orientadas, por lo que su análisis es similar.

2.1. Interacción Zeeman

El espín electrónico es una propiedad de los electrones con valor $S=1/2$. Un $S=1/2$ presenta dos posibles estados $m_s=-1/2$ y $m_s=+1/2$, donde m_s es la orientación del momento angular del espín electrónico *down* o *up*, respectivamente. Dicha propiedad genera en el electrón un momento magnético (μ , cuyo componente $\mu_z=-g\beta m_s$, donde g es denominado factor g). En ausencia de \mathbf{B} ambos estados de m_s presentan la misma energía (ver Fig. A1.4 izquierda), pero al encontrarse los espines dentro de un campo magnético externo se produce la separación de estos dos estados m_s a través de la interacción Zeeman [181]. De esta manera, cada estado del momento magnético se alinea paralelo ($m_s=-1/2$) o antiparalelamente ($m_s=+1/2$) al campo externo disminuyendo y aumentando, respectivamente, la energía de cada uno (Fig. A1.4 derecha), siendo la separación entre estos dos estados $\Delta E=g\mu_B B$.

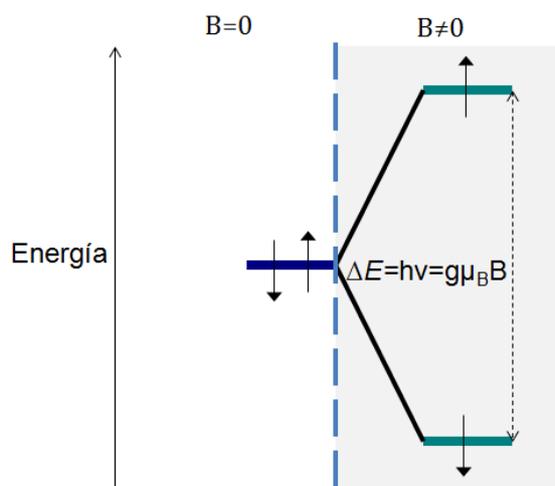


Fig. A1.4 - Desdoblamiento de energía producido por la interacción Zeeman

En un experimento típico de EPR se somete la muestra a una frecuencia fija (ν) de microondas mientras se varía el campo magnético externo aplicado a fin de producir transiciones entre los estados con m_s . Cuando se satisface la condición de resonancia $\Delta E = g\mu_B B = h\nu$, es decir, el desdoblamiento energético entre los estados de m_s es igual a la energía de la radiación utilizada, donde h es la constante de Planck, se produce la transición entre estados con distintos m_s dando origen a la transición de EPR. La señal de EPR representa la derivada de la línea de resonancia, a diferencia de la mayoría de las espectroscopias que registran espectros de absorción. En la Fig. A1.5 puede verse un espectro típico de EPR junto con los principales parámetros que se evalúan. Estos son el valor del campo magnético donde se da el pico de absorción (B_0), dato necesario para calcular el factor g ($g = 0,711447752 \times \nu$ [kHz] / B_0 [Gauss]); y el ancho de línea pico a pico (ΔB_{pp}), que está asociado al tiempo de relajación del espín y a interacciones espín-espín (ver subcapítulo 1.2.5 del Anexo I)

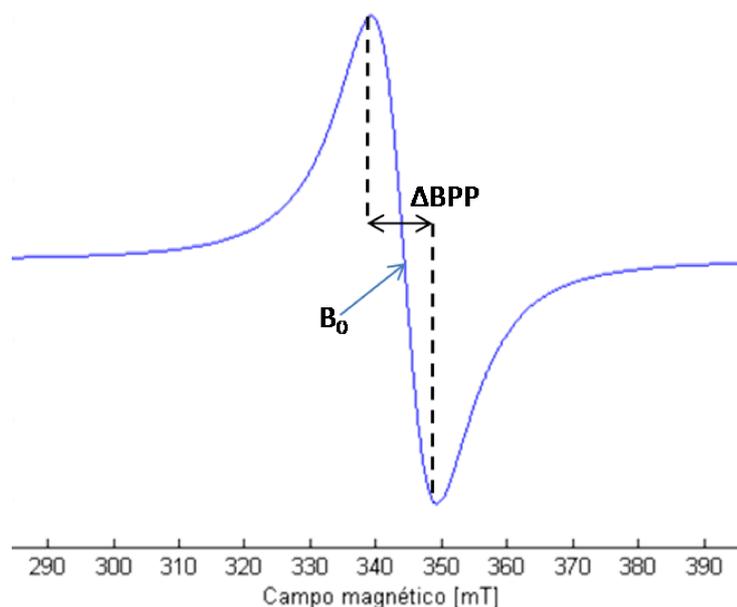


Fig. A1.5 - Espectro típico de un experimento de EPR en banda X (~9 GHz) indicando los parámetros que se miden

El factor g tiene un valor de 2,002319 en el caso del electrón libre, el cual cambia cuando el espín está inserto en un centro molecular y por ello es necesario definir una matriz g para caracterizar el centro paramagnético. De los cambios experimentados por el factor g , respecto del g del electrón libre, se pueden determinar características estructurales del entorno de un centro paramagnético en estudio.

2.2. Interacción hiperfina

Cuando en el entorno de un electrón desapareado encontramos algún átomo con espín nuclear distinto de cero ($I \neq 0$), el momento magnético electrónico puede interactuar con el momento magnético nuclear. Esta interacción produce un desdoblamiento de cada estado m_s en $2I+1$ niveles. La misma se nombra como acoplamiento hiperfino cuando se da con el núcleo del átomo que tiene el electrón desapareado, o superhiperfino, si se debe a un núcleo de un átomo vecino[182]. La separación entre los diferentes estado energéticos está relacionada al parámetro hiperfino $A = a g \mu_B$ (A tiene unidades de energía y a unidades de campo magnético) (Fig. A1.6).

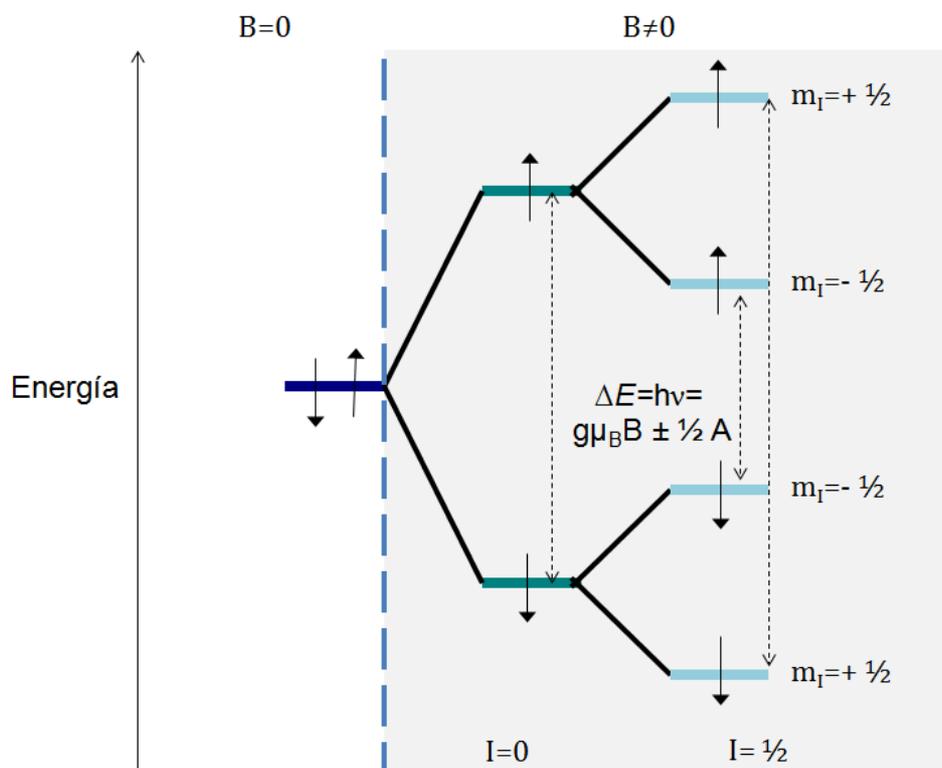


Fig. A1.6 - Desdoblamiento de energía producido por la interacción hiperfina entre un $s=1/2$ y un $I=1/2$ en presencia de un campo magnético externo \mathbf{B} indicando las transiciones de EPR permitidas ($\Delta m_I=0, \Delta m_S=1$)

2.3. Anisotropía de los parámetros g y A

Si imaginamos un electrón libre ubicado en el origen de un eje de coordenadas tridimensional es trivial ver que hacia cualquier dirección que miremos el entorno es el mismo. En esta situación el valor de g no varía aunque cambiemos la dirección del \mathbf{B} ; como resultado podemos decir que g es isotrópico.

La técnica de EPR se utiliza generalmente para sistemas en los cuales el electrón está rodeado de átomos, en un entorno que puede variar según la dirección en la que miremos. En esta situación los valores de g y A dependen de la dirección en la cual el campo externo atraviesa la muestra y pueden ser caracterizados por matrices de 3×3 . Cada una de estas matrices se definen con tres valores principales o autovalores (*eigenvalues*), g_x, g_y y g_z y A_x, A_y y A_z , respectivamente, que están relacionadas con tres autovectores x, y, z (*eigenvectors*). Los autovectores indican direcciones características de la molécula que contiene el electrón desapareado[181]. Cuando los valores de g_x, g_y y g_z son diferentes entre sí el espectro de EPR corresponde a una señal rómbica (Fig. A1.7.a). Existe otra forma de simetría, que es muy común en los metales de transición como Cu(II) y Mo(V), en la cual en dos de las direcciones encontramos el mismo valor de g , $g_x=g_y \neq g_z$. El espectro, en esta situación, es axial dónde g_z se

denomina g_{\parallel} , debido a que corresponde al valor de g observado cuando el campo aplicado es paralelo al eje de simetría, mientras que g_x y g_y se designan como g_{\perp} , haciendo referencia a que su valor se obtiene cuando el campo aplicado es perpendicular al eje de simetría (Fig. A1.7.b). En la Fig. A1.7 pueden verse los espectros para simetría rómbica (a) y axial (b) de g , mientras que un espectro de g isotrópico es similar al del ejemplo mostrado en la Fig. A1.5.

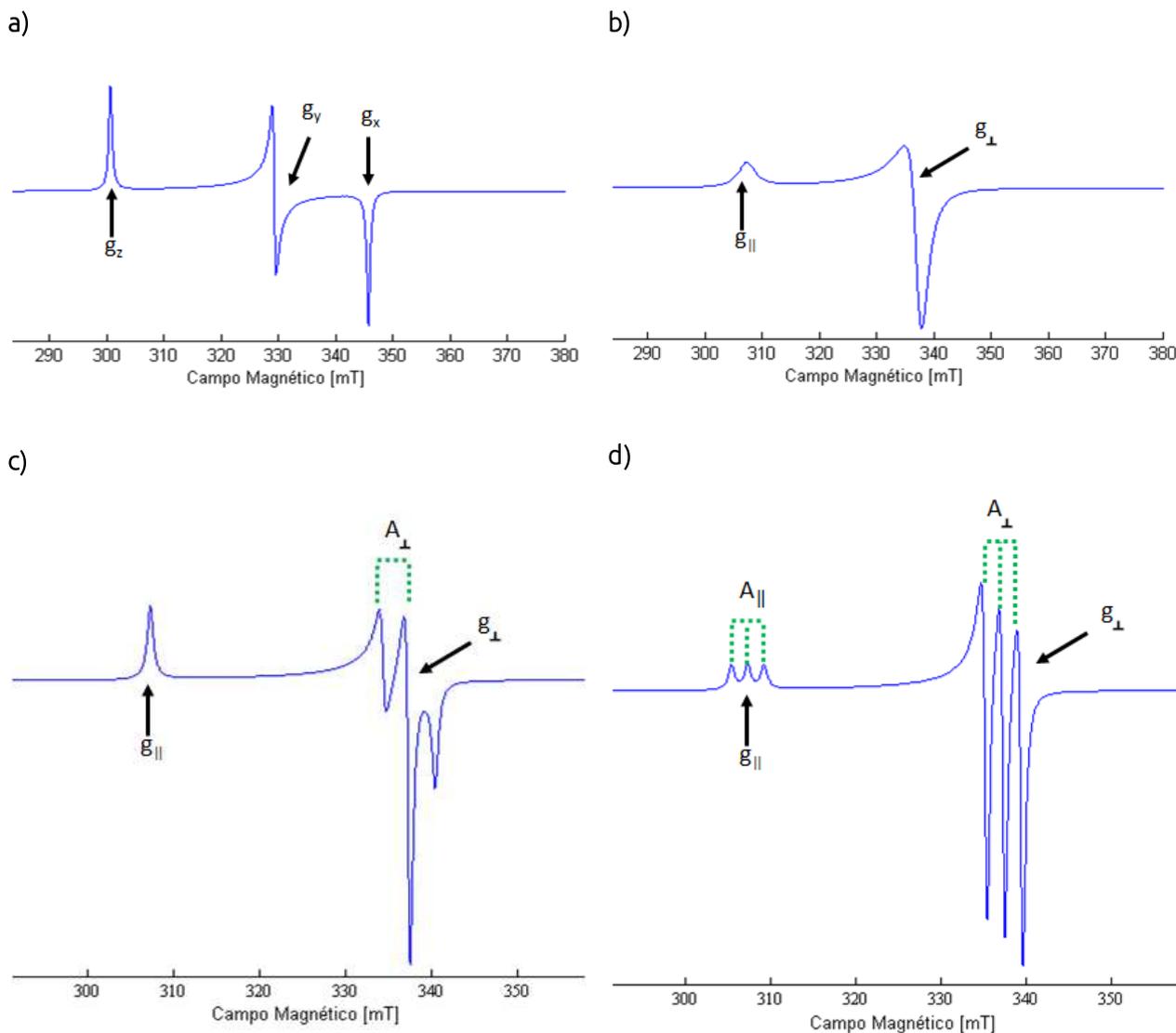


Fig. A1.7 - Espectros de EPR con simetría rómbica (a) y axial (b) y con interacción hiperfina (c) y (d)

En el caso que el espín S esté interactuando además con un espín nuclear, los espectros de EPR pueden mostrar un desdoblamiento adicional efecto de la interacción hiperfina (ver Fig. A1.7.c y d). Para el parámetro de interacción hiperfina podemos encontrar los mismos tipos de simetría explicados sobre el factor g , pero en este caso se deben a la interacción dipolar entre el espín electrónico y el espín nuclear[181]. En la Fig. A1.7.c puede observarse una señal con

interacción hiperfina en el g_{\perp} mientras que en la Fig. 7.d esta interacción está presente en ambos valores de g . La separación entre las líneas de este desdoblamiento adicional están dadas por el parámetro hiperfino A y la cantidad de picos por el valor del espín nuclear I , como está explicado en la sección 1.2.2 . Todos los espectros de la Fig.A1.7 corresponden a la señal de $S=1/2$.

2.4. Procesos de relajación

Imaginemos que tenemos un sistema, de espines $s=1/2$ que, como se explicó más arriba, tiene dos posibles estados energéticos y que al iniciar el experimento de EPR hay aproximadamente la mitad de la población en cada estado. A medida que el experimento avanza los estados de menor energía absorberían la energía de la microonda y pasarían al nivel superior hasta que toda la población se encuentre en este nivel, alcanzando así la saturación del sistema (ver Fig. A1.8). Con el sistema saturado ya no habría más absorciones posibles, por lo tanto, la señal debería caer a cero. Los procesos que evitan la saturación se conocen como relajación y su función es llevar los estados excitados al nivel fundamental, posibilitando que el proceso de absorción de energía continúe durante todo el tiempo que se realice el experimento.

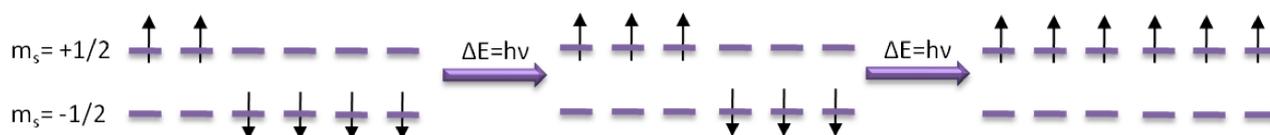


Fig. A1.8 - Transiciones entre estados conduciendo a la saturación

El fenómeno de relajación puede ser de dos tipos espín-red o espín-espín, donde se entiende por red al medio molecular en el cual el espín en estudio está inserto. En el primero, los dipolos magnéticos en el estado de mayor energía ceden ésta a la red descendiendo al estado fundamental; en el segundo, se la ceden a otros dipolos vecinos[182,184]. Estos procesos se describen mediante dos tiempos de relajación: t_1 para el espín – red (también se le llama tiempo de relajación longitudinal) y t_2 para el espín – espín (o transversal).

t_1 es el tiempo de relajación que determina que exista una diferencia entre los estados, inferior y superior, de energía del sistema de espines. Es altamente dependiente de temperatura, pero en relación inversa, a menor temperatura, mayor es el t_1 y por ende la velocidad de relajación es más lenta ($v \propto 1/t_1$). Hay situaciones en las que la velocidad de relajación de espín es tan alta que a temperatura ambiente las señales de resonancia en el espectro de EPR no pueden ser observadas, por lo cual se suele recurrir a trabajar a temperaturas de nitrógeno o helio líquido, y poder detectar así las transiciones. t_2 , en cambio, tiene dependencia casi nula con la

temperatura y contribuye de manera constante al ancho de línea. De esta manera el ancho de línea queda determinado por dos contribuciones de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta B \propto \frac{1}{2t_1} + \frac{1}{t_2} \quad (\text{Ec. A1.4})$$

Puede verse que cuando t_1 es mucho más grande que t_2 el ancho de línea depende prácticamente sólo de t_2 [184].

2.5. La interacción de intercambio J y su relación con la velocidad de TE entre dos centros paramagnéticos

La ecuación Ec. A1.3 se refería únicamente a espines aislados y su interacción con los espines nucleares del átomo paramagnético y/o de sus ligandos. En el caso que el sistema de estudio contenga dos centros paramagnéticos con espines S_1 y S_2 sin interacción hiperfina con factores g distintos (g_1 y g_2 respectivamente) hay que tener en cuenta también la interacción entre ambos, descrita en el último término de la ecuación:

j

$$\mathbf{H} = \mu_B (\mathbf{S}_1 \cdot \mathbf{g}_1 + \mathbf{S}_2 \cdot \mathbf{g}_2) \cdot \mathbf{B} + \mathbf{S}_1 \cdot (-\mathbf{J} \mathbf{I} + \mathbf{D}) \cdot \mathbf{S}_2 \quad (\text{Ec. A1.5})$$

Esta ecuación predice para $J < h\nu$, dos dobletes centrados cada uno en g_1 y g_2 , separados por $\Delta B = h\nu \Delta g / \mu_B g_1 g_2$, donde $\Delta g = |g_1 - g_2|$, con ΔB dependiendo de la orientación del campo magnético externo relativo a la molécula. La Fig. A1.9 muestra esta situación para una orientación particular de \mathbf{B} . La separación entre las resonancias de cada doblete depende de la magnitud de J y de todas las interacciones anisotrópicas espín-espín definidas en \mathbf{D} , las cuales son la interacción dipolar y el intercambio anisotrópico y antisimétrico[183]. Por convención cuando $J < 30 \text{ cm}^{-1}$, como ocurre en los dos sistemas estudiados en esta tesis, el intercambio anisotrópico y antisimétrico puede ser despreciado y asumirse que \mathbf{D} queda determinado por la interacción dipolo-dipolo[185]. En consecuencia, se puede asumir que el desdoblamiento dentro de cada doblete queda determinado por las interacciones isotrópica y dipolo-dipolo ($J + D_{\text{dip}}$), donde D_{dip} es el valor de \mathbf{D} para un determinado ángulo entre la dirección interespín y el campo magnético externo. Si $J + D_{\text{dip}}$ es mucho menor que ΔB , las líneas se desdoblan en dobletes con una distancia igual a $J + D_{\text{dip}}$ (Fig. A1.9 panel superior). Cuando $J + D_{\text{dip}}$ es comparable con ΔB , las líneas externas de cada doblete son menos intensas que las centrales. Por último cuando $J + D_{\text{dip}} > \Delta B$ se obtienen

dos líneas de la misma intensidad separadas por D_{dip} , siendo las líneas externas de cada doblete indetectables en el experimento de EPR.

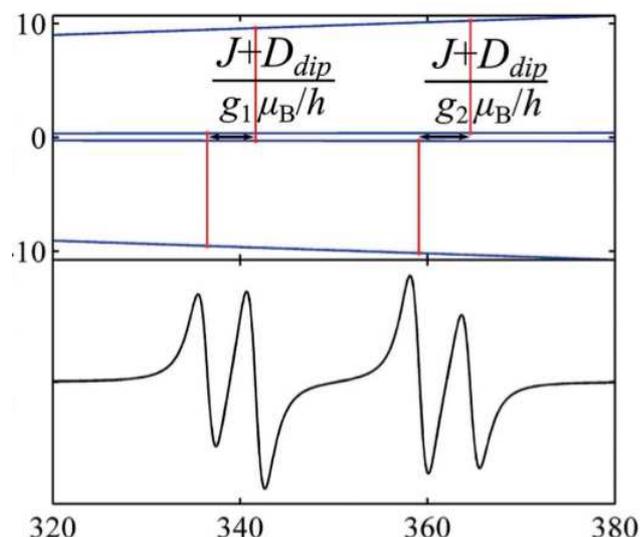


Fig. A1.9- Energías de sistemas de dos espines $S=1/2$ obtenidas por el uso de la Ec. A1.5 para la situación $J+D_{dip} \ll \Delta B$ (panel superior) y representación del desdoblamiento producido por la presencia de J e interacción dipolar (panel inferior) (Figura modificada de Rizzi y col., 2016)[183]

El parámetro J está relacionado con la naturaleza del camino químico que conecta los dos centros paramagnéticos interactuantes. El mismo es una medida de la deslocalización de espín desapareado sobre el camino químico, a mayor J mayor deslocalización[80]. La importancia de medir J en metaloproteínas radica en que dicho parámetro está relacionado con la velocidad de TE cuando los caminos químicos de intercambio y TE son los mismos[186].

Los procesos de TE desde un dador (o reductor) a un aceptor (u oxidante), a través de distancias largas, pueden estudiarse a través de la teoría semiclásica de Marcus, en la cual, la constante de velocidad de reacción k_{et} entre dos centros redox está dada por[187]:

$$k_{et} = (2\pi / \hbar)(4\pi\lambda kT)^{-1/2} T_{DA}^2 \exp -(\Delta G^\circ - \lambda)^2 / 4\lambda kT \quad (\text{Ec. A1.6})$$

donde $-\Delta G^\circ = zF\Delta E^\circ$ (fuerza impulsora) se relaciona con el gradiente de potencial eléctrico entre el dador y el aceptor, λ es el parámetro de energía de reorganización nuclear, T_{DA} es una medida del acoplamiento electrónico entre el dador y el aceptor, y los demás símbolos tienen el significado habitual. Como se observa en la Ec.A1. 6, uno los factores que determinan la factibilidad del proceso de TE es T_{DA} , el cual está relacionado con la naturaleza del camino químico que conecta al dador y al aceptor electrónico y se relaciona con la constante de acoplamiento por intercambio J a través de[186]:

$$J = -T_{DA}^2 / U \quad (\text{Ec. Al.7})$$

donde U es la diferencia de energía entre las configuraciones electrónicas asociadas con los estados del aceptor y del dador correspondientes a los espines interactuantes. En el caso que el dador y el aceptor sean paramagnéticos, la capacidad del camino para deslocalizar el espín electrónico puede ser estudiada mediante EPR evaluando la constante de intercambio isotrópica J que acopla los dos centros ($H_{ex} = -JS_D S_A$). Las Ec. Al.6 y Ec. Al.7 muestran claramente la relación entre J y la velocidad de TE cuando ésta se realiza a través del mismo camino químico. Una consecuencia inmediata de la Ec. Al.6 es que cuando mayor es el J asociado a un camino químico, mayor debería ser la velocidad de TE por él. Así entonces vemos cómo el parámetro J medido mediante EPR puede ser relacionado con la estructura (camino químico) y con la velocidad de TE en macromoléculas biológicas.

Anexo II:

Recursos computacionales y experimentales

Para la realización de los cálculos de esta tesis fueron utilizados tres *clusters* de computadoras alternativamente de acuerdo a la disponibilidad. Las características de los mismos se detalla más abajo. Adicionalmente fueron realizados algunos cálculos en mi computadora personal y en dos equipos de escritorio.

En relación a la parte experimental todos los espectros utilizados en esta tesis fueron obtenidos en banda X con un espectrómetro Bruker EMX-Plus. Para los espectros de *SmNir* el equipo se utilizó con una cavidad universal de alta sensibilidad (modelo HSW10819) y un criostato Bruker de flujo continuo de nitrógeno. Los espectros fueron adquiridos bajo condiciones de no saturación con frecuencia de microondas de 9,45 GHz; campo de modulación 100 kHz, amplitud de modulación 2 G, 2 mW de poder de microondas y temperatura de 100 K. Para los espectros de *DgAOR* se utilizó un criostato Oxford Instrument de flujo continuo de helio y una cavidad rectangular con un campo de modulación de 100 kHz. Los espectros de absorción de *SmNir* fueron obtenidos a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 UV-vis.

Descripción de los recursos computacionales a gran escala empleados

- **Pirayu:**

Front-End

Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2650 v3 @ 2.30GHz 25 MB cache (2 CPU x 10 cores = 20 cores)

Placa madre: Intel Server Board S2600CW2

Memoria: 128 GB - DDR4 - 2133 MHz ECC

Nodos de cálculo

- Tradicionales:

- + (24 nodos) Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2650 v3 @ 2.30GHz 25 MB cache (2 CPU x 10 cores = 20 cores)
- + (7 nodos) Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2650 v4 @ 2.20GHz 30 MB cache (2 CPU x 12 cores = 24 cores)
- + Placa madre: Intel Server Board S2600CW2
- + Memoria: 128 GB - DDR4 - 2133 MHz ECC

- Recursos especiales:

Nodos Xeon Phi (1 nodo)

- + Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2650 v3 @ 2.30GHz 25 MB cache(2 CPU x 10 cores = 20 cores)
- + Placa madre: Intel Server Board S2600CW2
- + Memoria: 128 GB - DDR4 - 2133 MHz ECC
- + Placa CoProcesadora: Xeon Phi 7120P - 61 cores - 16GB RAM

Nodos GPU (5 nodos)

- + Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2650 v3 @ 2.30GHz 25 MB cache(2 CPU x 10 cores = 20 cores)
- + Placa madre: Intel Server Board S2600CW2
- + Memoria: 128 GB - DDR4 - 2133 MHz ECC
- + Placa GPU: nVidia Tesla K40 - 2880 cores - 12 GB RAM DDR5

Nodos de almacenamiento (1 nodo)

- + Procesador: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2670 v3 @ 2.30GHz 30 MB caché (1 CPU x 12 cores)
- + Placa madre: Intel Server Board S2600CW2
- + Memoria: 128 GB - DDR4 - 2133 MHz ECC
- + Almacenamiento: 144 TB (36 discos de 4 TB SATA 3.5")

- **Avatar:**

Front-End

- + Procesador: Intel Xeon E5620(4 núcleos c/u, 8 threads, 2.40/2.66GHz)
- + Memoria: 8 GB
- + Almacenamiento: Disco de arranque 250GB, disco de usuarios RAID 5+0 de 8,5 TB

Equipos para cálculo: 7 Nodos de Procesamiento (128N)

- + (5 nodos) Procesador: Intel Xeon E5620 (4 núcleos c/u, 8 threads, 2,40/2,66GHz)
- + (2 nodos) Procesador: Intel Xeon X5650 (6 núcleos c/u, 12 threads, 2,66/3,06GHz)
- + memoria: 8 GB
- + Almacenamiento: Disco de arranque 250 GB

- **Fiqster:**

Front-End

- + Procesador: Intel Core i7-4770K (4 cores, 8 threads, 3,5/3,9 Ghz)
- + Memoria: 32 Gb
- + Almacenamiento: 4 HDD SATA3 2Tb RAID 0+1

Equipos para cálculo: 11 CPUs

- + Procesador: Intel Core i7-4770K (4 cores, 8 threads, 3,5/3,9 Ghz)
- + Memoria: 32 Gb
- + Almacenamiento temporal: HDD SATA3 500Gb

Bibliografía

- [1] SJ Lippard, JM Berg (1994) Chapter 5: Choice, uptake and assembly of metal containing units in biology. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Univ Science Books, p. 103–137.
- [2] JJRF da Silva, RJP Williams (2001) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University Press.
- [3] D Shriver, P Atkins (2009) *Inorganic Chemistry*. W. H. Freeman.
- [4] WG Zumft (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (4) :533–616.
- [5] BA Averill (1996) Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* 96 (7) :2951–2964.
- [6] R Hille (2005) Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433 (1) :107–116.
- [7] JJG Moura, CD Brondino, J Trincão, MJ Romão (2004) Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (7) :791–799.
- [8] G Fritz, A Roth, A Schiffer, T Büchert, G Bourenkov, HD Bartunik, H Huber, KO Stetter, PMH Kroneck, U Ermler (2002) Structure of adenylsulfate reductase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* at 1.6-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (4) :1836–1841.
- [9] AS Pereira, R Franco, MJ Feio, C Pinto, J Lampreia, MA Reis, J Calvete, I Moura, I Beech, AR Lino, JJ Moura (1996) Characterization of representative enzymes from a sulfate reducing bacterium implicated in the corrosion of steel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 (2) :414–421.
- [10] MG Bertero, RA Rothery, M Palak, C Hou, D Lim, F Blasco, JH Weiner, NCJ Strynadka (2003) Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat. Struct. Biol.* 10 (9) :681–687.
- [11] CD Brondino, MJ Romão, I Moura, JJG Moura (2006) Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2) :109–114.
- [12] CD Brondino, MG Rivas, MJ Romão, JJG Moura, I Moura (2006) Structural and electron paramagnetic resonance (EPR) studies of mononuclear molybdenum enzymes from sulfate-reducing bacteria. *Acc. Chem. Res.* 39 (10) :788–796.
- [13] MJ Romão, R Huber (1995) Structure at 2.25 Å resolution of the aldehyde oxido-reductase from *Desulfovibrio gigas*, a member of the xanthine oxidase protein family containing molybdopterin and iron-sulfur centers. *J. Inorg. Biochem.* 59 (2-3) :727.
- [14] MJ Romão, M Archer, I Moura, JJG Moura, J LeGall, R Engh, M Schneider, P Hof, R Huber (1995) Crystal Structure of the Xanthine Oxidase-Related Aldehyde Oxido-Reductase from *D. gigas*. *Science*. 270 (5239) :1170–1176.
- [15] R Huber, P Hof, RO Duarte, JJ Moura, I Moura, MY Liu, J LeGall, R Hille, M Archer, MJ Romão (1996) A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (17) :8846–8851.
- [16] DR Boer, A Thapper, CD Brondino, MJ Romão, JJG Moura (2004) X-ray crystal structure and EPR spectra of “arsenite-inhibited” *Desulfovibriogigas* aldehyde dehydrogenase: a member of the xanthine oxidase family. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (28) :8614–8615.
- [17] T Santos-Silva, F Ferroni, A Thapper, J Marangon, PJ González, AC Rizzi, I Moura, JJG Moura, MJ Romão, CD Brondino (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 (23) :7990–7998.
- [18] Cotton (2007) *ADVANCED INORGANIC CHEMISTRY*, 6TH ED. John Wiley & Sons.
- [19] M Dayah (2014) Ptable: The Interactive Periodic Table. <https://www.ptable.com/?lang=es>.

Último acceso 10/03/2018.

- [20] R Hille (1996) The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* 96 (7) :2757–2816.
- [21] PJ González, C Correia, I Moura, CD Brondino, JJG Moura (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* 100 (5-6) :1015–1023.
- [22] G Schwarz, RR Mendel, MW Ribbe (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature.* 460 (7257) :839–847.
- [23] S Seitzinger, JA Harrison, JK Böhlke, AF Bouwman, R Lowrance, B Peterson, C Tobias, G Van Drecht (2006) Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecol. Appl.* 16 (6) :2064–2090.
- [24] C Richey, P Chovanec, SE Hoelt, RS Oremland, P Basu, JF Stolz (2009) Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 (2) :298–302.
- [25] C Kisker, H Schindelin, and, DC Rees (1997) MOLYBDENUM-COFACTOR-CONTAINING ENZYMES: Structure and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1) :233–267.
- [26] P Basu, SJN Burgmayer (2011) Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coord. Chem. Rev.* 255 (9-10) :1016–1038.
- [27] R Hille, C Schulzke, ML Kirk (2016) Molybdenum and Tungsten Enzymes: Bioinorganic Chemistry. Royal Society of Chemistry.
- [28] RA Rothery, GJ Workun, JH Weiner (2008) The prokaryotic complex iron–sulfur molybdoenzyme family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1778 (9) :1897–1929.
- [29] BA Barata, J LeGall, JJ Moura (1993) Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio gigas*: in vitro reconstitution of an electron-transfer chain from aldehydes to the production of molecular hydrogen. *Biochemistry.* 32 (43) :11559–11568.
- [30] SLA Andrade, CD Brondino, EO Kamenskaya, AV Levashov, JJG Moura (2003) Kinetic behavior of *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase encapsulated in reverse micelles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (1) :73–78.
- [31] A Sigel, H Sigel (2002) Metals Ions in Biological System: Volume 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes: CRC Press.
- [32] CJ Doonan, A Stockert, R Hille, GN George (2005) Nature of the catalytically labile oxygen at the active site of xanthine oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (12) :4518–4522.
- [33] V Massey, D Edmondson (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* 245 (24) :6595–6598.
- [34] MJ Romão, N Rösch, R Huber (1997) The molybdenum site in the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* and a catalytic mechanism for this class of enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2 (6) :782–785.
- [35] RR Mendel, G Schwarz (1999) Molybdoenzymes and Molybdenum Cofactor in Plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 18 (1) :33–69.
- [36] CC Moser, CC Page, X Chen, PL Dutton (2000) Electron transfer in natural proteins theory and design. *Subcell. Biochem.* 35 :1–28.
- [37] L Krippahl, P Nuno Palma, I Moura, JJG Moura (2006) Modelling the Electron-Transfer Complex Between Aldehyde Oxidoreductase and Flavodoxin. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006 (19) :3835–3840.
- [38] MJ Romao, BAS Barata, M Archer, K Lobeck, I Moura, MA Carrondo, J LeGALL, F Lottspeich, R Huber, JJG Moura (1993) Subunit composition, crystallization and preliminary crystallographic studies of the *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase containing molybdenum and [2Fe-2S] centers. *Eur. J. Biochem.* 215 (3) :729–732.
- [39] JM Rebelo, JM Dias, R Huber, JJ Moura, MJ Romão (2001) Structure refinement of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (MOP) at 1.28 Å. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (8) :791–800.

- [40] A Thapper, DR Boer, CD Brondino, JJG Moura, MJ Romão (2007) Correlating EPR and X-ray structural analysis of arsenite-inhibited forms of aldehyde oxidoreductase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (3) :353–366.
- [41] AA Voityuk, K Albert, S Köstlmeier, VA Nasluzov, KM Neyman, P Hof, R Huber, MJ Romão, N Rösch (1997) Prediction of Alternative Structures of the Molybdenum Site in the Xanthine Oxidase-Related Aldehyde Oxido Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (13) :3159–3160.
- [42] JJ Moura, BA Barata (1994) Aldehyde oxidoreductases and other molybdenum-containing enzymes. *Methods Enzymol.* 243 :24–42.
- [43] R Hille, H Sprecher (1987) On the mechanism of action of xanthine oxidase. Evidence in support of an oxo transfer mechanism in the molybdenum-containing hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 262 (23) :10914–10917.
- [44] MJ Romão, CA Cunha, CD Brondino, JJG Moura (2002) Molybdenum enzymes in reactions involving aldehydes and acids. *Met. Ions Biol. Syst.* 39 :539–570.
- [45] E-Y Choi, AL Stockert, S Leimkühler, R Hille (2004) Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Inorg. Biochem.* 98 (5) :841–848.
- [46] AL Stockert, SS Shinde, RF Anderson, R Hille (2002) The Reaction Mechanism of Xanthine Oxidase: Evidence for Two-Electron Chemistry Rather Than Sequential One-Electron Steps. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (49) :14554–14555.
- [47] MJ Romão, M Archer, I Moura, JJ Moura, J LeGall, R Engh, M Schneider, P Hof, R Huber (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science.* 270 (5239) :1170–1176.
- [48] K Okamoto, K Matsumoto, R Hille, BT Eger, EF Pai, T Nishino (2004) The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (21) :7931–7936.
- [49] JH Kim, MG Ryan, H Knaut, R Hille (1996) The Reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 271 (12) :6771–6780.
- [50] AK Sau, MS Mondal, S Mitra (2000) Effects of pH and temperature on the reaction of milk xanthine oxidase with 1-methylxanthine. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (20) :3688–3692.
- [51] MS Mondal, S Mitra (1994) Kinetics and thermodynamics of the molecular mechanism of the reductive half-reaction of xanthine oxidase. *Biochemistry.* 33 (34) :10305–10312.
- [52] M Xia, R Dempski, R Hille (1999) The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. *J. Biol. Chem.* 274 (6) :3323–3330.
- [53] RJ Greenwood, GL Wilson, JR Pilbrow, AG Wedd (1993) Molybdenum(V) sites in xanthine oxidase and relevant analog complexes: comparison of oxygen-17 hyperfine coupling. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (13) :5385–5392.
- [54] BD Howes, RC Bray, RL Richards, NA Turner, B Bennett, DJ Lowe (1996) Evidence favoring molybdenum-carbon bond formation in xanthine oxidase action: 17Q- and 13C-ENDOR and kinetic studies. *Biochemistry.* 35 (5) :1432–1443.
- [55] P Manikandan, EY Choi, R Hille, BM Hoffman (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 (11) :2658–2663.
- [56] JM Pauff, H Cao, R Hille (2009) Substrate Orientation and Catalysis at the Molybdenum Site in Xanthine Oxidase: CRYSTAL STRUCTURES IN COMPLEX WITH XANTHINE AND LUMAZINE. *J. Biol. Chem.* 284 (13) :8760–8767.
- [57] JM Pauff, J Zhang, CE Bell, R Hille (2008) Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. *J. Biol. Chem.* 283 (8) :4818–4824.
- [58] MR Bray, RJ Deeth (1997) The catalytic activity of xanthine oxidase: mechanistic insights through computer modelling. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (8) :1267–1268.
- [59] P Ilich, R Hille (1997) Tautomerization of the substrate heterocycle in the course of the

- reaction of xanthine oxidase. *Inorganica Chim. Acta.* 263 (1-2) :87–93.
- [60] P Ilich, R Hille (2002) Oxo, sulfido, and tellurido Mo-enedithiolate models for xanthine oxidase: understanding the basis of enzyme reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (24) :6796–6797.
- [61] P Ilich, R Hille (1999) Mechanism of Formamide Hydroxylation Catalyzed by a Molybdenum–Dithiolene Complex: A Model for Xanthine Oxidase Reactivity. *J. Phys. Chem. B.* 103 (25) :5406–5412.
- [62] S Metz, W Thiel (2009) A combined QM/MM study on the reductive half-reaction of xanthine oxidase: substrate orientation and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (41) :14885–14902.
- [63] S Metz, W Thiel (2010) QM/MM studies of xanthine oxidase: variations of cofactor, substrate, and active-site Glu802. *J. Phys. Chem. B.* 114 (3) :1506–1517.
- [64] X-H Zhang, Y-D Wu (2005) A theoretical study on the mechanism of the reductive half-reaction of xanthine oxidase. *Inorg. Chem.* 44 (5) :1466–1471.
- [65] T Amano, N Ochi, H Sato, S Sakaki (2007) Oxidation reaction by xanthine oxidase: theoretical study of reaction mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (26) :8131–8138.
- [66] AA Voityuk, K Albert, MJ Romão, R Huber, N Rösch (1998) Substrate Oxidation in the Active Site of Xanthine Oxidase and Related Enzymes. A Model Density Functional Study. *Inorg. Chem.* 37 (2) :176–180.
- [67] BD Howes, RC Bray, RL Richards, NA Turner, B Bennett, DJ Lowe (1996) Evidence Favoring Molybdenum–Carbon Bond Formation in Xanthine Oxidase Action: 17O- and 13C-ENDOR and Kinetic Studies. *Biochemistry.* 35 (12) :3874–3874.
- [68] D Coucouvanis, A Toupadakis, JD Lane, SM Koo, CG Kim, A Hadjikyriacou (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)(S2)], [Ph4P][[(C5H5)Mo(O)(.mu.-S)2Mo(O)(S2)], [Ph4P]2[(S4)Mo(O)(.mu.-S)2Mo(O)(S)] and (Et4N)4[(S4)Mo(O)(.mu.-S)2Mo(O)(S)]2. *J. Am. Chem. Soc.* 113 (14) :5271–5282.
- [69] S Metz, D Wang, W Thiel (2009) Reductive half-reaction of aldehyde oxidoreductase toward acetaldehyde: a combined QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (13) :4628–4640.
- [70] DJ Lowe, MJ Barber, RT Pawlik, RC Bray (1976) A new non-functional form of milk xanthine oxidase containing stable quinquivalent molybdenum. *Biochem. J.* 155 (1) :81–85.
- [71] A Thapper, MG Rivas, CD Brondino, B Ollivier, G Fauque, I Moura, JJG Moura (2006) Biochemical and spectroscopic characterization of an aldehyde oxidoreductase isolated from *Desulfovibrio aminophilus*. *J. Inorg. Biochem.* 100 (1) :44–50.
- [72] P Bertrand, C More, B Guigliarelli, A Fournel, B Bennett, B Howes (1994) Biological polynuclear clusters coupled by magnetic interactions: From the point dipole approximation to a local spin model. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (7) :3078–3086.
- [73] MC Gómez, NI Neuman, SD Dalosto, PJ González, JJG Moura, AC Rizzi, CD Brondino (2015) Isotropic exchange interaction between Mo and the proximal FeS center in the xanthine oxidase family member aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* on native and polyalcohol inhibited samples: an EPR and QM/MM study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2) :233–242.
- [74] PJ González, GI Barrera, AC Rizzi, JJG Moura, MCG Passeggi, CD Brondino (2009) EPR studies of the Mo-enzyme aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*: An application of the Bloch–Wangsness–Redfield theory to a system containing weakly-coupled paramagnetic redox centers with different relaxation rates. *J. Inorg. Biochem.* 103 (10) :1342–1346.
- [75] SL Andrade, CD Brondino, MJ Feio, I Moura, JJ Moura (2000) Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 EPR assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site. *Eur. J. Biochem.* 267 (7) :2054–2061.

- [76] S Stoll, A Schweiger (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* 178 (1) :42–55.
- [77] J Caldeira, V Belle, M Asso, B Guigliarelli, I Moura, JJ Moura, P Bertrand (2000) Analysis of the electron paramagnetic resonance properties of the [2Fe-2S]¹⁺ centers in molybdenum enzymes of the xanthine oxidase family: assignment of signals I and II. *Biochemistry.* 39 (10) :2700–2707.
- [78] NI Neuman, M Perek, PJ González, MCG Passeggi, AC Rizzi, CD Brondino (2010) Single crystal EPR study of the dinuclear Cu(II) complex [Cu(tda)(phen)]₂·H₂O (tda = thiodiacetate, phen = phenanthroline): influence of weak interdimeric magnetic interactions. *J. Phys. Chem. A.* 114 (50) :13069–13075.
- [79] SK Hoffmann, W Hilczer, J Goslar (1994) Weak long-distance superexchange interaction and its temperature variations in copper(II) compounds studied by single crystal EPR. *Appl. Magn. Reson.* 7 (2-3) :289–321.
- [80] O Kahn (1985) Dinuclear Complexes with Predictable Magnetic Properties. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 24 (10) :834–850.
- [81] HD Correia, J Marangon, CD Brondino, JJG Moura, MJ Romão, PJ González, T Santos-Silva (2015) Aromatic aldehydes at the active site of aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*: reactivity and molecular details of the enzyme-substrate and enzyme-product interaction. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2) :219–229.
- [82] JC Phillips, R Braun, W Wang, J Gumbart, E Tajkhorshid, E Villa, C Chipot, RD Skeel, L Kalé, K Schulten (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26 (16) :1781–1802.
- [83] AD MacKerell Jr, D Bashford, M Bellott, RL Dunbrack Jr, JD Evanseck, MJ Field, S Fischer, J Gao, H Guo, S Ha, Others (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.* 102 (18) :3586–3616.
- [84] J-D Chai, M Head-Gordon (2008) Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (44) :6615–6620.
- [85] WR Wadt, PJ Hay (1985) Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* 82 (1) :284–298.
- [86] PJ Hay, P Jeffrey Hay, WR Wadt (1985) Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* 82 (1) :270–283.
- [87] PJ Hay, WR Wadt (1985) Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* 82 (1) :299–310.
- [88] X Li, MJ Frisch (2006) Energy-Represented Direct Inversion in the Iterative Subspace within a Hybrid Geometry Optimization Method. *J. Chem. Theory Comput.* 2 (3) :835–839.
- [89] C Peng, PY Ayala, H Bernhard Schlegel, MJ Frisch (1996) Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* 17 (1) :49–56.
- [90] C Peng, H Bernhard Schlegel (1993) Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States. *Isr. J. Chem.* 33 (4) :449–454.
- [91] TJ Dolinsky, JE Nielsen, JA McCammon, NA Baker (2004) PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 32 (Web Server issue) :W665–7.
- [92] CR Søndergaard, MHM Olsson, M Rostkowski, JH Jensen (2011) Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J. Chem. Theory Comput.* 7 (7) :2284–2295.
- [93] MHM Olsson, CR Søndergaard, M Rostkowski, JH Jensen (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2) :525–537.
- [94] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G,

- Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas O, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ (2009) Gaussian 09.
- [95] AW Ehlers, M Böhme, S Dapprich, A Gobbi, A Höllwarth, V Jonas, KF Köhler, R Stegmann, A Veldkamp, G Frenking (1993) A set of f-polarization functions for pseudo-potential basis sets of the transition metals Sc-Cu, Y-Ag and La-Au. *Chem. Phys. Lett.* 208 (1-2) :111–114.
- [96] S Fletcher (2014) Discovery of a single molecule transistor in photosystem II. *J. Solid State Electrochem.* 19 (1) :241–250.
- [97] JPW Young (1996) Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant Soil.* 186 (1) :45–52.
- [98] JN Galloway, AR Townsend, JW Erisman, M Bekunda, Z Cai, JR Freney, LA Martinelli, SP Seitzinger, MA Sutton (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science.* 320 (5878) :889–892.
- [99] G Wilkinson, RD Gillard, JA McCleverty (1987) Comprehensive Coordination Chemistry: Late transition elements. Pergamon.
- [100] I Bertini, A Sigel (2001) Handbook on Metalloproteins. CRC Press.
- [101] JJ Moura, I Moura, TA Kent, JD Lipscomb, BH Huynh, J LeGall, AV Xavier, E Münck (1982) Interconversions of [3Fe-3S] and [4Fe-4S] clusters. Mössbauer and electron paramagnetic resonance studies of *Desulfovibrio gigas* ferredoxin II. *J. Biol. Chem.* 257 (11) :6259–6267.
- [102] BA Goodman, JB Raynor (1970) Electron Spin Resonance of Transition Metal Complexes. *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, p. 135–362.
- [103] ABP Lever (1984) Inorganic electronic spectroscopy. Elsevier Science Ltd, p.
- [104] H Sigel (1990) Mechanistic aspects of the metal ion promoted hydrolysis of nucleoside 5'-triphosphates (NTPs). *Coord. Chem. Rev.* 100 :453–539.
- [105] J Chin (1991) Developing artificial hydrolytic metalloenzymes by a unified mechanistic approach. *Acc. Chem. Res.* 24 (5) :145–152.
- [106] J Reedijk, E Bouwman (1999) Bioinorganic Catalysis.
- [107] P Bertrand (1991) Application of electron transfer theories to biological systems. *Structure and Bonding*, p. 1–47.
- [108] J Peisach, P Aisen, WE Blumberg (1966) The Biochemistry of Copper: Proceedings, September 8-10, 1965.
- [109] W Kaim, J Rall (1996) Copper—A“Modern” Bioelement. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 35 (1) :43–60.
- [110] R Malkin, BG Malmström (1970) The state and function of copper in biological systems. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 33 :177–244.
- [111] E Underwood (2012) Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Elsevier.
- [112] RH Holm, P Kennepohl, EI Solomon (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem. Rev.* 96 (7) :2239–2314.
- [113] H Beinert (1997) Copper A of cytochrome c oxidase, a novel, long-embattled, biological electron-transfer site. *Eur. J. Biochem.* 245 (3) :521–532.
- [114] EI Solomon, MJ Baldwin, MD Lowery (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem. Rev.* 92 (4) :521–542.
- [115] K Penfield, R Gay, R Himmelwright, N Eickman, V Norris, H Freeman, E Solomon (1981) Additions and Corrections - Spectroscopic Studies on Plastocyanin Single Crystals: A Detailed Electronic Structure Determination of the Blue Copper Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* 103 (23) :7037–7037.

- [116] MD Lowery, EI Solomon (1992) Axial ligand bonding in blue copper proteins. *Inorganica Chim. Acta.* 198-200 :233–243.
- [117] JM Guss, PR Harrowell, M Murata, VA Norris, HC Freeman (1986) Crystal structure analyses of reduced (CuI) poplar plastocyanin at six pH values. *J. Mol. Biol.* 192 (2) :361–387.
- [118] WB Church, JM Guss, JJ Potter, HC Freeman (1986) The crystal structure of mercury-substituted poplar plastocyanin at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261 (1) :234–237.
- [119] M Kukimoto, M Nishiyama, ME Murphy, S Turley, ET Adman, S Horinouchi, T Beppu (1994) X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: roles of two copper atoms in nitrite reduction. *Biochemistry.* 33 (17) :5246–5252.
- [120] JP Klinman (1996) Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates. *Chem. Rev.* 96 (7) :2541–2562.
- [121] ET Adman (1991) Copper protein structures. *Adv. Protein Chem.* 42 :145–197.
- [122] ZH Abraham, DJ Lowe, BE Smith (1993) Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem. J.* 295 (Pt 2) :587–593.
- [123] S Suzuki, K Kataoka, K Yamaguchi, T Inoue, Y Kai (1999) Structure–function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* 190-192 :245–265.
- [124] I Moura, JJG Moura, SR Pauleta, LB Maia (2016) Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts. Royal Society of Chemistry.
- [125] T Inoue, M Gotowda, Deligeer, K Kataoka, K Yamaguchi, S Suzuki, H Watanabe, M Gohow, Y Kai (1998) Type 1 Cu structure of blue nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 at 2.05 Å resolution: comparison of blue and green nitrite reductases. *J. Biochem.* 124 (5) :876–879.
- [126] Y Fukuda, H Koteishi, R Yoneda, T Tamada, H Takami, T Inoue, M Nojiri (2014) Structural and functional characterization of the *Geobacillus* copper nitrite reductase: Involvement of the unique N-terminal region in the interprotein electron transfer with its redox partner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1837 (3) :396–405.
- [127] TJ Lawton, KE Bowen, LA Sayavedra-Soto, DJ Arp, AC Rosenzweig (2013) Characterization of a Nitrite Reductase Involved in Nitrifier Denitrification. *J. Biol. Chem.* 288 (35) :25575–25583.
- [128] MJ Boulanger, MEP Murphy (2002) Crystal structure of the soluble domain of the major anaerobically induced outer membrane protein (AniA) from pathogenic *Neisseria*: a new class of copper-containing nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* 315 (5) :1111–1127.
- [129] FM Ferroni, SA Guerrero, AC Rizzi, CD Brondino (2012) Overexpression, purification, and biochemical and spectroscopic characterization of copper-containing nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011. Study of the interaction of the catalytic copper center with nitrite and NO. *J. Inorg. Biochem.* 114 :8–14.
- [130] FE Dodd, J Van Beeumen, RR Eady, SS Hasnain (1998) X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner. *J. Mol. Biol.* 282 (2) :369–382.
- [131] E Libby, BA Averill (1992) Evidence that the Type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter cycloclastes* nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 (3) :1529–1535.
- [132] LM Murphy, FE Dodd, FK Yousafzai, RR Eady, SS Hasnain (2002) Electron donation between copper containing nitrite reductases and cupredoxins: the nature of protein-protein interaction in complex formation 1 Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* 315 (4) :859–871.
- [133] RW Strange, LM Murphy, FE Dodd, ZH Abraham, RR Eady, BE Smith, SS Hasnain (1999) Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase. *J. Mol. Biol.* 287 (5) :1001–1009.

- [134] MJ Boulanger, M Kukimoto, M Nishiyama, S Horinouchi, ME Murphy (2000) Catalytic roles for two water bridged residues (Asp-98 and His-255) in the active site of copper-containing nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 275 (31) :23957–23964.
- [135] K Kataoka, H Furusawa, K Takagi, K Yamaguchi, S Suzuki (2000) Functional Analysis of Conserved Aspartate and Histidine Residues Located Around the Type 2 Copper Site of Copper-Containing Nitrite Reductase. *J. Biochem.* 127 (2) :345–350.
- [136] S Suzuki, T Kohzuma, Deligeer, K Yamaguchi, N Nakamura, S Shidara, K Kobayashi, S Tagawa (1994) Pulse Radiolysis Studies on Nitrite Reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013: Evidence for Intramolecular Electron Transfer from Type 1 Cu to Type 2 Cu. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (24) :11145–11146.
- [137] Y Fukuda, KM Tse, T Nakane, T Nakatsu, M Suzuki, M Sugahara, S Inoue, T Masuda, F Yumoto, N Matsugaki, E Nango, K Tono, Y Joti, T Kameshima, C Song, T Hatsui, M Yabashi, O Nureki, MEP Murphy, T Inoue, S Iwata, E Mizohata (2016) Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (11) :2928–2933.
- [138] NGH Leferink, C Han, SV Antonyuk, DJ Heyes, SEJ Rigby, MA Hough, RR Eady, NS Scrutton, S Samar Hasnain (2011) Proton-Coupled Electron Transfer in the Catalytic Cycle of *Alcaligenes xylosoxidans* Copper-Dependent Nitrite Reductase. *Biochemistry.* 50 (19) :4121–4131.
- [139] RG Hadt, SI Gorelsky, EI Solomon (2014) Anisotropic Covalency Contributions to Superexchange Pathways in Type One Copper Active Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (42) :15034–15045.
- [140] MJ Barnett, RF Fisher, T Jones, C Komp, AP Abola, F Barloy-Hubler, L Bowser, D Capela, F Galibert, J Gouzy, M Gurjal, A Hong, L Huizar, RW Hyman, D Kahn, ML Kahn, S Kalman, DH Keating, C Palm, MC Peck, R Surzycki, DH Wells, KC Yeh, RW Davis, NA Federspiel, SR Long (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (17) :9883–9888.
- [141] FM Ferroni, J Marangon, NI Neuman, JC Cristaldi, SM Brambilla, SA Guerrero, MG Rivas, AC Rizzi, CD Brondino (2014) Pseudoazurin from *Sinorhizobium meliloti* as an electron donor to copper-containing nitrite reductase: influence of the redox partner on the reduction potentials of the enzyme copper centers. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (6) :913–921.
- [142] MJ Ellis, SV Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, S Samar Hasnain (2004) Observation of an Unprecedented Cu Bis-His Site: Crystal Structure of the H129V Mutant of Nitrite Reductase. *Inorg. Chem.* 43 (24) :7591–7593.
- [143] MA Hough, MJ Ellis, S Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, S Samar Hasnain (2005) High Resolution Structural Studies of Mutants Provide Insights into Catalysis and Electron Transfer Processes in Copper Nitrite Reductase. *J. Mol. Biol.* 350 (2) :300–309.
- [144] MEP Murphy, S Turley, M Kukimoto, M Nishiyama, S Horinouchi, H Sasaki, M Tanokura, ET Adman (1995) Structure of *Alcaligenes faecalis* Nitrite Reductase and a Copper Site Mutant, M150E, That Contains Zinc. *Biochemistry.* 34 (38) :12107–12117.
- [145] K Kataoka, K Yamaguchi, S Sakai, K Takagi, S Suzuki (2003) Characterization and function of Met150Gln mutant of copper-containing nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM1013. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (2) :519–524.
- [146] K Olesen, A Veselov, Y Zhao, Y Wang, B Danner, CP Scholes, JP Shapleigh (1998) Spectroscopic, Kinetic, and Electrochemical Characterization of Heterologously Expressed Wild-Type and Mutant Forms of Copper-Containing Nitrite Reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 \dagger . *Biochemistry.* 37 (17) :6086–6094.
- [147] O Farver, RR Eady, G Sawers, M Prudêncio, I Pecht (2004) Met144Ala mutation of the copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* reverses the intramolecular electron transfer. *FEBS Lett.* 561 (1-3) :173–176.
- [148] L Basumallick, RK Szilagyi, Y Zhao, JP Shapleigh, CP Scholes, EI Solomon (2003)

Spectroscopic Studies of the Met182Thr Mutant of Nitrite Reductase: Role of the Axial Ligand in the Geometric and Electronic Structure of Blue and Green Copper Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (48) :14784–14792.

- [149] MA Hough, SV Antonyuk, RW Strange, RR Eady, S Samar Hasnain (2008) Crystallography with Online Optical and X-ray Absorption Spectroscopies Demonstrates an Ordered Mechanism in Copper Nitrite Reductase. *J. Mol. Biol.* 378 (2) :353–361.
- [150] M Prudêncio, G Sawers, SA Fairhurst, FK Yousafzai, RR Eady (2002) *Alcaligenes xylosoxidans* Dissimilatory Nitrite Reductase: Alanine Substitution of the Surface-Exposed Histidine 139 Ligand of the Type 1 Copper Center Prevents Electron Transfer to the Catalytic Center†. *Biochemistry.* 41 (10) :3430–3438.
- [151] HJ Wijma, MJ Boulanger, A Molon, M Fittipaldi, M Huber, MEP Murphy, MP Verbeet, GW Canters (2003) Reconstitution of the Type-1 Active Site of the H145G/A Variants of Nitrite Reductase by Ligand Insertion†. *Biochemistry.* 42 (14) :4075–4083.
- [152] JC Cristaldi, MC Gómez, PJ González, FM Ferroni, SD Dalosto, AC Rizzi, MG Rivas, CD Brondino (2018) Study of the Cys-His bridge electron transfer pathway in a copper-containing nitrite reductase by site-directed mutagenesis, spectroscopic, and computational methods. *Biochim. Biophys. Acta.* 1862 (3) :752–760.
- [153] H Yokoyama, K Yamaguchi, M Sugimoto, S Suzuki (2005) CuI and CuII Complexes Containing Nitrite and Tridentate Aromatic Amine Ligand as Models for the Substrate-Binding Type-2 Cu Site of Nitrite Reductase. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005 (8) :1435–1441.
- [154] N Lehnert, U Cornelissen, F Neese, T Ono, Y Noguchi, K-I Okamoto, K Fujisawa (2007) Synthesis and Spectroscopic Characterization of Copper(II)–Nitrito Complexes with Hydrotris(pyrazolyl)borate and Related Coligands. *Inorg. Chem.* 46 (10) :3916–3933.
- [155] CE Ruggiero, SM Carrier, WB Tolman (1994) Reductive Disproportionation of NO Mediated by Copper Complexes: Modeling N₂O Generation by Copper Proteins and Heterogeneous Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 33 (8) :895–897.
- [156] SCN Hsu, Y-L Chang, W-J Chuang, H-Y Chen, I-J Lin, MY Chiang, C-L Kao, H-Y Chen (2012) Copper(I) nitro complex with an anionic [HB(3,5-Me₂Pz)₃][–] ligand: a synthetic model for the copper nitrite reductase active site. *Inorg. Chem.* 51 (17) :9297–9308.
- [157] Y Li, M Hodak, J Bernholc (2015) Enzymatic mechanism of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry.* 54 (5) :1233–1242.
- [158] M Biasini, S Bienert, A Waterhouse, K Arnold, G Studer, T Schmidt, F Kiefer, T Gallo Cassarino, M Bertoni, L Bordoli, T Schwede (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42 (Web Server issue) :W252–8.
- [159] F Kiefer, K Arnold, M Kunzli, L Bordoli, T Schwede (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database) :D387–D392.
- [160] N Guex, MC Peitsch, T Schwede (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis.* 30 Suppl 1 :S162–73.
- [161] W Humphrey, A Dalke, K Schulten (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14 (1) :33–38.
- [162] AD Becke (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 98 (7) :5648–5652.
- [163] C Lee, W Yang, RG Parr (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 37 (2) :785–789.
- [164] WD Cornell, P Cieplak, CI Bayly, IR Gould, KM Merz, DM Ferguson, DC Spellmeyer, T Fox, JW Caldwell, PA Kollman (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of

- Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (19) :5179–5197.
- [165] H Zhang, MJ Boulanger, A Grant Mauk, MEP Murphy (2000) Carbon Monoxide Binding to Copper-Containing Nitrite Reductase from *Alcaligenes faecalis*. *J. Phys. Chem. B.* 104 (46) :10738–10742.
- [166] PJ Gonzalez, MG Rivas, CS Mota, CD Brondino, I Moura, JJG Moura (2013) Periplasmic nitrate reductases and formate dehydrogenases: Biological control of the chemical properties of Mo and W for fine tuning of reactivity, substrate specificity and metabolic role. *Coord. Chem. Rev.* 257 (2) :315–331.
- [167] El Tocheva (2004) Side-On Copper-Nitrosyl Coordination by Nitrite Reductase. *Science.* 304 (5672) :867–870.
- [168] F Jacobson, A Pistorius, D Farkas, W De Grip, Ö Hansson, L Sjölin, R Neutze (2006) pH Dependence of Copper Geometry, Reduction Potential, and Nitrite Affinity in Nitrite Reductase. *J. Biol. Chem.* 282 (9) :6347–6355.
- [169] D Pinho, S Besson, CD Brondino, B de Castro, I Moura (2004) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135. Evidence for modulation of the rate of intramolecular electron transfer through nitrite binding to the type 2 copper center. *Eur. J. Biochem.* 271 (12) :2361–2369.
- [170] RF Baggio, R Calvo, C Brondino, MT Garland, AM Atria, E Spodine (1995) A Novel Structure of (L-Aspartato)(1,10-phenanthroline)copper(II) Hydrate. *Acta Crystallogr. C.* 51 (3) :382–385.
- [171] L Antolini, G Marcotrigiano, L Menabue, GC Pellacani (1983) Coordination behavior of L-aspartic acid: thermal, spectroscopic, magnetic, and structural properties of aqua(L-aspartato)(2,2'-bipyridine)copper(II) trihydrate. *Inorg. Chem.* 22 (1) :141–145.
- [172] SV Antonyuk, RW Strange, G Sawers, RR Eady, SS Hasnain (2005) Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (34) :12041–12046.
- [173] P Atkins, J de Paula (2010) Atkins' Physical Chemistry. Oxford University Press, USA.
- [174] D Frenkel, B Smit, MA Ratner (1997) Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. *Phys. Today.* 50 (7) :66–66.
- [175] EG Lewars (2016) Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics. Springer.
- [176] P Hohenberg, W Kohn (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review.* 136 (3B) :B864–B871.
- [177] RFW Bader (2002) Atoms in Molecules. Encyclopedia of Computational Chemistry.
- [178] W Kohn (1999) Nobel Lecture: Electronic structure of matter—wave functions and density functionals. *Rev. Mod. Phys.* 71 (5) :1253–1266.
- [179] A Warshel, M Levitt (1976) Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* 103 (2) :227–249.
- [180] T Vreven, K Morokuma, Ö Farkas, H Bernhard Schlegel, MJ Frisch (2003) Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. *J. Comput. Chem.* 24 (6) :760–769.
- [181] JA Weil, JR Bolton, JE Wertz, HA Buckmaster (1995) Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. *Physics Today.* 48 (5) :71–72.
- [182] JA Weil, JR Bolton (2006) Electron Paramagnetic Resonance.
- [183] AC Rizzi, NI Neuman, PJ González, CD Brondino (2016) EPR as a Tool for Study of Isolated and Coupled Paramagnetic Centers in Coordination Compounds and Macromolecules of Biological Interest (Eur. J. Inorg. Chem. 2/2016). *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016 (2).
- [184] JR Pilbrow (1990) Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance. Clarendon Press.
- [185] TD Smith, JR Pilbrow (1974) The determination of structural properties of dimeric transition metal ion complexes from epr spectra. *Coord. Chem. Rev.* 13 (2-3) :173–278.
- [186] R Calvo, EC Abresch, R Bittl, G Feher, W Hofbauer, RA Isaacson, W Lubitz, MY Okamura, ML

Paddock (2000) EPR Study of the Molecular and Electronic Structure of the Semiquinone Biradical QA•QB• in Photosynthetic Reaction Centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (30) :7327–7341.

[187] RA Marcus, N Sutin (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics.* 811 (3) :265–322.