Plan de Gestión de Datos

INFORMACION SOBRE EL PROYECTO

1. – Título del Proyecto

- Titulo del Proyecto (en castellano)

Relación entre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de centros metálicos redox de metaloenzimas presentes en los ciclos del carbono y nitrógeno.

- Titulo del Proyecto (en inglés)

Correlation between the structure and physicochemical properties of the redox metal centers of metalloenzymes involved in carbon and nitrogen cycle

-Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El proyecto involucra el estudio de metaloenzimas redox, metaloproteínas y compuestos de coordinación que contienen metales de transición paramagnéticos como una propuesta de investigación multidisciplinaria que, aun estando en el área de investigación básica, puede impactar en una amplia variedad de aplicaciones. Por un lado se estudiará el mecanismo catalítico de metaloenzimas aisladas de rizobacterias que son parte de los ciclos del N y del C y las características estructurales del sistema de transporte de Mo (ModABC) a la célula el cual es esencial para producir enzimas activas. Paralelamente, se estudiarán compuestos modelo, complejos extendidos de Cu(II) (S=1/2) y Co(II) de alto espín (S= 3/2) en distintos entornos de coordinación con comportamientos estructurales y/o magnéticos 0-3D, incluyendo sistemas dopados, para modelar caminos químicos que actúan como caminos de transferencia electrónica en metaloenzimas. El estudio de todos estos sistemas tiene como objetivo ampliar el conocimiento sobre las oxidoreductasas nitrato (NapAB) y nitrito reductasas (Nir) y formato dehidrogenasa (Fdh) para su uso potencial en aplicaciones tales como el desarrollo de catalizadores para procesos de biorremediación y producción sustentable de combustibles alternativos.

Las técnicas con que contamos para las investigaciones planteadas están asociadas con microbiología (para el cultivo de microorganismos), biología molecular (para la producción de vectores de expresión y construcción de variantes de las enzimas), cinética enzimática, espectroscopia (rayos X, Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), UV-vis, dicroísmo circular, (espectro)electroquímica) y cálculos computacionales. Estas técnicas se utilizarán para la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los centros metálicos, evaluación del rol de aminoácidos esenciales en la catálisis e interacciones proteína-proteína, entre los aspectos más importantes. Para los compuestos modelo se trabajará en la síntesis, cristalización y caracterización estructural, espectroscópica y magnética complementadas con cálculos computacionales.

Tal como lo requiere la propuesta el equipo de trabajo es multidisciplinario, con investigadores especialistas en los sistemas estudiados en el Grupo Responsable e

investigadores de disciplinas complementarias, estudiantes de doctorado, de grado y docentes/investigadores en el Grupo Colaborador.

-Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

The project comprises the study of redox metalloenzymes, metalloproteins and coordination compounds containing paramagnetic transition metals as a multidisciplinary research project which, although in the field of basic research, may have implications for a variety of applications. On one hand, the catalytic mechanism of metalloenzymes isolated from rhizobacteria, which are part of the N and C cycle, and the structural characteristics of the Mo transport system (ModABC) to the cell will be studied. In parallel, model compounds, extended complexes of Cu(II) (S=1/2) and high spin Co(II) with high spin (S= 3/2), will be studied in different coordination environments with structural and/or magnetic behaviors 0- 3D, including doped systems. The aim is to produce model chemical pathways that serve as electron transfer pathways in metalloenzymes. The study of all these systems aims to extend the knowledge about nitrate oxidoreductases (NapAB), nitrite reductases (Nir) and formate dehydrogenase (Fdh) for their potential use in applications such as the development of catalysts for bioremediation processes and sustainable production of alternative fuels. The techniques used in the proposed research project are related to microbiology (for the cultivation of microorganisms), molecular biology (for the preparation of expression vectors and the construction of enzyme variants), enzyme kinetics, spectroscopy (X-rays, electronic paramagnetic resonance (EPR), UV-Vis, circular dichroism, (spectro)electrochemistry), and computational calculations. These techniques are used to characterize the physicochemical properties of the metal centers, evaluate the role of essential amino acids in catalysis and protein-protein interactions, among the most important aspects. For the model compounds, work will be done on synthesis, crystallization and structural, spectroscopic and magnetic characterization complemented by computational calculations.
As required by the proposal, the research team is multidisciplinary, with specialists in the systems studied in the Responsible Group and researchers from complementary disciplines, doctoral students, undergraduate students and teachers/researchers in the Collaborating Group.

-Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano)

METALOPROTEÍNAS	COMPUESTOS MODELO	TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en inglés)

METALLOPROTEINS,	MODEL COMPOUNDS	ELECTRON TRANSFER

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

María Gabriela Rivas

- Unidad Académica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

- Teléfono oficial de contacto

0342-4575213
-Teléfono móvil de contacto
03482-15681249
-E-mail del Director/a del Proyecto
mrivas@fbcb.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar

Las proteínas recombinantes se producirán a partir de vectores de expresión preparados mediante la amplificación del gen de interés por PCR y posterior clonado en vectores apropiados. Estos vectores serán utilizados para transformar células de *E. coli* (BL21(DE3), Rosetta gami, etc) y se evaluarán las condiciones de cultivo (composición del medio, temperatura, concentración del inductor, tiempo de inducción) para las que se produzca mayor cantidad de proteína soluble. Una vez que estén determinadas las condiciones de cultivo, se realizarán crecimientos a mayor escala, las células se separarán del medio por centrifugación, se lisarán por ultrasonicado y la fracción soluble se obtendrá por centrifugación.

Para el caso de las proteínas obtenidas de los organismos nativos, se determinarán las condiciones de cultivo en las cuales las enzimas de interés se produzcan en mayor cantidad. Luego se realizarán cultivos a gran escala controlando las variables temperatura, pH y fuente de carbono mediante controladores diseñados por integrantes del grupo responsable (Pablo J González) y del grupo colaborador (Axel Kemmerer). Las células serán posteriormente recolectadas, lisadas y la fracción soluble obtenida por centrifugación, como explicado para las proteínas recombinantes.

En todos los casos las proteínas serán purificadas por técnicas de cromatografía líquida con resinas de intercambio iónico (DEAE-Sepharose, SP-Sepharose, Q-Sepharose), exclusión molecular (Superdex 200 y Superdex 75), pseudoafinidad (IMAC) e interacción hidrofóbica. La pureza de las proteínas será evaluada por SDS-PAGE.

La estructura cuaternaria será evaluada combinando las técnicas de cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE o espectrometría de masas.

Las estructuras de algunas de las proteínas se determinarán por cristalografía de Rayos X (en colaboración con el CNPEM, Brasil).

Los parámetros cinéticos serán calculados a partir de los datos obtenidos de los ensayos cinéticos en solución, en estado estacionario.

La estabilidad de las proteínas será evaluada por *Thermal Shift Assay* utilizando un equipo de RT-PCR y por dicroísmo circular.

Los estudios de voltametría cíclica se utilizarán para determinar las propiedades redox de las enzimas y se llevarán a cabo utilizando una celda electroquímica con un sistema de tres electrodos conectado a un potenciostato/galvanostato controlado por computadora a través del software provisto por el fabricante.

En el caso que sea posible, los potenciales de reducción se determinarán por espectroscopia UV-vis o de EPR, titulando la proteína con un reductor (ditionito de sodio) en presencia de mediadores.
Para el caso de sistemas modelo, se analizan tres tipos de muestras: monocristales, polvos policristalinos obtenidos por molienda de monocristales, y soluciones de los compuestos. Los monocristales se obtienen por evaporación lenta a temperatura ambiente de soluciones que contienen los complejos disueltos a estudiar, sintetizados a partir de los respectivos ligandos y metales de transición de interés. Los monocristales son aislados cuidadosamente para su estudio mediante espectroscopia de EPR en muestras orientadas.
En el Departamento de Física de la FBCB contamos con la mayor parte del equipamiento para realizar los estudios planteados. Algunos de los equipos (espectrómetro de masas y RT-PCR) son de uso común o pueden contratarse como servicios en la FBCB. Para los estudios de dicroísmo circular y difracción de Rayos X trabajaremos en colaboración con laboratorios del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (CNPEM, Campinas, Brasil).

– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)	
	NO
X	**SI. Elija una de las opciones:**
	se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes no se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible existe un contrato con un tercero que impide la divulgación Otro. Justifique. *Los resultados obtenidos serán parte de manuscritos enviados a revistas científicas internacionales especializadas en el área para ser publicados luego de pasar por un proceso de referato. Dichas revistas exigen que los no hayan sido publicados con anterioridad.*
– Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público. **Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".**	

	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años X
	Otro.
	Motivos: *Los motivos coinciden con el ítem anterior.*