

Tesis Doctoral

Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre

Zitare, Ulises Alejandro

2016-12-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zitare, Ulises Alejandro. (2016-12-15). Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zitare, Ulises Alejandro. "Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-15.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

Ulises Alejandro Zitare

Director de Tesis: **Dr. Daniel H. Murgida**

Consejero de Estudios: **Dr. Gabriel J. Gordillo**

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física -
INQUIMAE.

Buenos Aires, 2016

Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre

Resumen

En esta tesis se aborda el estudio de los parámetros que regulan las reacciones de transferencia electrónica (TE) en metaloproteínas que contienen dos tipos de sitios de cobre distintos. Para ello se utilizó una variedad de métodos espectroscópicos y electroquímicos, cuyos resultados fueron analizados en el marco de la teoría de Marcus de TE. El principal modelo de estudio es un fragmento soluble de la citocromo *ba*₃ oxidasa de *Thermus thermophilus* (Tt-Cu_A), que contiene el centro binuclear de Cu_A, aceptor de electrones primario de la enzima. Mediante distintas estrategias de mutagénesis tales como mutaciones puntuales de primera esfera de coordinación o ingeniería de bucles, se investigaron los factores que determinan las propiedades electrónicas del sitio nativo, y que en última instancia determinan los mecanismos regulatorios de la TE. Desde la óptica de la termodinámica estadística, se logró racionalizar las contribuciones entálpica y entrópica al potencial de reducción del sitio de Cu_A y se verificó la aditividad de los efectos producidos por las distintas mutaciones de primera y segunda esfera de coordinación.

Diferentes estudios espectroscópicos (RR, RMN, UV-Vis, EPR) revelan que la estructura electrónica del sitio de Cu_A puede ser descrita mediante una superficie de energía potencial con dos pozos que corresponden a estados fundamentales alternativos. Más aún, la población relativa de estos estados puede ser modulada a través de mutaciones de primera y segunda esfera, y en una mutante específica mediante el pH del medio. Empleando voltametría cíclica de *films* proteicos fue posible determinar los parámetros cinéticos de TE para ambos estados fundamentales de manera independiente. En particular, la mutante puntual de ligando axial M160H constituye el primer caso conocido en que resulta posible activar selectivamente dos estados fundamentales diferentes mediante un simple cambio de pH.

Por otra parte, estudios realizados sobre sitios de cobre tipo 1 (T1) reconstruidos en el esqueleto proteico de Tt-Cu_A mediante ingeniería de bucles muestran claras diferencias en relación a los sitios T1 nativos. Grandes cambios espectroscópicos o notables desplazamientos de los potenciales redox demuestran el rol determinante de la matriz proteica sobre las propiedades estructurales y funcionales de los sitios redox. Estos sistemas novedosos presentan además la capacidad de modificar la coordinación del sitio activo a partir del agregado de un ligando exógeno sin perder su actividad redox, permitiendo el estudio de este tipo de fenómenos en un sistema biológico.

Palabras clave: transferencia electrónica, citocromo *c* oxidasa, sitio de Cu_A, sitio T1, Marcus, bioelectroquímica, espectroscopia, monocapas autoensambladas, estados fundamentales alternativos, *switch* funcional, mutagénesis dirigida, matriz proteica.

Regulatory mechanisms and manipulation of electron transfer properties in copper metalloproteins

Abstract

The purpose of this thesis is to study the parameters that regulate electron transfer (ET) reactions in metalloproteins containing two different kinds of copper sites. A variety of spectroscopic and electrochemical methods were used in the research and the results were analyzed in the context of Marcus ET theory. The main study model is a soluble fragment of the cytochrome *ba*₃ oxidase from *Thermus thermophilus* that contains the Cu_A binuclear center (Tt-Cu_A), which is the primary electron acceptor of this enzyme. Using different mutagenesis strategies, such as axial ligand point mutations -in the first coordination sphere- or loop engineering, elements defining the native site electronic properties, which also define ET regulatory mechanisms, were analyzed. The entropic and enthalpic contributions to the reduction potential of the Cu_A site were rationalized in terms of statistical thermodynamics, and the additivity of first and second coordination sphere mutational effects was verified.

Spectroscopic studies (RR, NMR, UV-Vis, EPR) reveal that the electronic structure of the Cu_A site can be described by a double well potential energy surface related to alternative ground states. Moreover, relative populations of these states can be modulated through mutations in the first and second coordination sphere, and through pH in a particular point mutant. By means of protein film cyclic voltammetry, ET kinetic parameters in both ground states could be independently established. The mutant M160H constitutes the first example of a model center in which two different ground states can be selectively activated through a simple pH change.

Finally, the characterization of type 1 (T1) sites artificially introduced in the Tt-Cu_A protein backbone by loop engineering shows prominent differences with respect to native T1 sites. This includes important spectroscopic changes and large redox potential shifts; thus pointing out to the decisive role played by the protein matrix in defining functional (redox) and structural properties. These novel systems also show the capability to bind exogenous ligands without losing its redox activity, allowing research of this kind of phenomenon in a biological system.

Key words: electron transfer, cytochrome *c* oxidase, Cu_A site, T1 site, Marcus, bioelectrochemistry, spectroscopy, self-assembled monolayers, alternative ground states, functional switch, directed mutagenesis, protein backbone.

Índice

1- Introducción y fundamentos teóricos	1
1.1- Motivación y objetivos generales	3
1.2- Metaloproteínas redox y su entorno fisiológico	5
1.2.1- Sitios de cobre en metaloproteínas	6
1.2.2- La cadena de transporte de electrones	8
1.2.3- La interfaz membrana-solución	13
1.2.4- Metaloproteínas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados	15
1.3- Transferencia electrónica	19
1.3.1- Cinética de la reacción de TE: teoría extendida de Marcus	19
1.3.2- Obtención electroquímica de parámetros redox: Voltametría cíclica	24
1.4- Técnicas espectroscópicas y auxiliares	28
1.4.1- Espectroscopia de absorción electrónica: UV-Vis	29
1.4.2- Espectroscopia de dispersión Raman resonante (RR)	32
1.4.3- Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	35
1.4.4- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) Paramagnética	39
1.5- Referencias	42
 2- Materiales y métodos	 47
2.1- Materiales	49
2.1.1- Reactivos	49
2.1.2- Muestras proteicas	49
2.2- Métodos electroquímicos	52
2.2.1- Preparación de electrodos y celda electroquímica	52

2.2.2- VC para especies adsorbidas	53
2.2.3- VC para especies adsorbidas	55
2.3- Métodos espectroscópicos	56
2.3.1- Espectroscopia Raman resonante (RR)	56
2.3.2- Espectroscopia UV-Vis	58
2.4- Técnicas auxiliares	58
2.4.1- Resonancia electrónica paramagnética (EPR)	58
2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Paramagnética	58
2.4.3 Resonancia de plasmón superficial (SPR)	59
2.4.4 Difracción de Rayos X	59
2.4.5 Cálculos y simulaciones computacionales	60
2.5- Referencias	61

3- Determinantes de las propiedades espectroscópicas y funcionales en el sitio

de Cu_A	63
3.1- Introducción	65
3.1.1- El sitio de Cu _A en la naturaleza	65
3.1.2- Primeros antecedentes en el estudio del sitio de Cu _A	70
3.1.3- Un modelo biológico robusto: Cu _A -Azu	73
3.1.4- Un modelo nativo: Tt-Cu _A	76
3.1.5- Descripción electrónica del sitio de Cu _A	78
3.2- Resultados	83
3.2.1- Efectos de mutaciones puntuales en la primera esfera de coordinación: caracterización espectroscópica	83
3.2.2- Efectos de mutaciones de segunda esfera de coordinación: caracterización espectroscópica	91
3.2.3- Estudio electroquímico de la reacción de TE en el sitio de Cu _A	103
3.2.4- Control entrópico y control entálpico de la reacción de TE	111
3.3- Conclusiones	118
3.4- Referencias	123

4- El sitio de Cu_A en la interfaz electrodo-solución	131
4.1- Introducción	133
4.1.1- Adsorción de Tt-Cu _A sobre electrodos biocompatibles	133
4.1.2- Primeros resultados a partir del sistema Tt-Cu _A /SAM/Au	136
4.1.3- Dos estados redox activos en el sitio de Cu _A	139
4.2- Resultados	145
4.2.1- Adsorción sobre electrodos biocompatibles	145
4.2.2- Efecto de la fuerza iónica sobre el valor de E ⁰	149
4.2.3- Determinación de parámetros cinéticos de la reacción de TE	153
4.2.4- Dependencia de la velocidad de TE con la distancia muestra-electrodo	162
4.2.5- Efecto del pH sobre el sobre el sitio de Cu _A en un entorno Biocompatible	167
4.2.6- El <i>switch</i> en el estado redox activo del sitio de Cu _A	176
4.3- Conclusiones	195
4.4- Referencias	198
5- Estudio de la transferencia electrónica en centros T1 novedosos	207
5.1- Introducción	209
5.1.1- Las proteínas azules de cobre	209
5.1.2- Características estructurales generales de los sitios T1	211
5.1.3- Descripción electrónica de los sitios T1	216
5.1.4- El modelo de distorsión acoplada	221
5.2- Resultados	225
5.2.1- Desarrollo y caracterización espectroscópica de sitios T1 novedosos	226
5.2.2- Ami-Cu _A : Estructura cristalográfica y cálculos computacionales	232
5.2.3- Caracterización electroquímica de Ami-Cu _A y Az-Cu _A	238
5.2.4- Coordinación reversible de un ligando exógeno	245

5.2.5- Az-Cu _A y Ami-Cu _A adsorbidas sobre electrodos biocompatibles	256
5.3- Conclusiones	265
5.4- Referencias	268
6- Conclusiones generales	279
6.1- Conclusiones y modelo regulatorio propuesto	281
6.2- Referencias	287
7- Agradecimientos	289
8- Abreviaturas	293

Introducción y fundamentos teóricos

Introducción y fundamentos teóricos

1.1- Motivación y objetivos generales

A partir de los experimentos pioneros de Lavoisier acompañado del matemático Laplace en 1783 acerca del consumo de oxígeno por distintos organismos, el primero sentenció que “los organismos aeróbicos obtienen la mayor parte de su energía para desarrollar los procesos biológicos a partir de la combustión de sus alimentos empleando el oxígeno molecular del aire”. Desde aquel descubrimiento, que permitió desterrar definitivamente la teoría flogística, los mecanismos biológicos para la generación de energía han constituido un campo de enorme interés para la biología y para la química. Hoy sabemos que, en contraste con la enorme diversidad existente entre las distintas especies biológicas (en términos genéticos, morfológicos, fisiológicos, comportamentales, etc.), existe una gran similitud entre los mecanismos empleados para la generación de energía y las maquinarias celulares donde se llevan a cabo. En todos los organismos conocidos existen diversas proteínas que catalizan las reacciones redox necesarias para la transducción energética y, en consecuencia, el sostenimiento de la vida. Estas proteínas, asociadas a cofactores, coenzimas, membranas y/u otras proteínas conforman una maquinaria altamente ordenada en la membrana interna mitocondrial (o en la membrana plasmática de organismos procariotas) constituyendo la estructura supramolecular denominada “cadena de transporte electrónico”.

Las reacciones de transferencia electrónica (TE) ocupan un rol central en estos mecanismos y son, de hecho, la reacción química más elemental de la naturaleza. Los procesos que comprenden este tipo de reacciones han sido estudiados en un encuadre común y de carácter cuantitativo a partir del modelo cinético propuesto por Marcus hace más de medio siglo, y sus modificaciones subsecuentes. Este modelo constituye el marco teórico para las reacciones de TE y permite expresar la constante de velocidad del proceso (k_{TE}) de una manera simple y en función de apenas tres parámetros: el acoplamiento electrónico entre donador y aceptor ($|H_{DA}|$), la fuerza impulsora del proceso (ΔG^0) y la energía de reorganización (λ), directamente vinculada con la energía libre de activación del proceso (ΔG^*). Este marco teórico y sus modificaciones posteriores demostraron ser una herramienta muy poderosa a la hora de estudiar procesos de TE en diversos sistemas, desde la relativa simplicidad de iones, complejos inorgánicos o moléculas orgánicas pequeñas hasta la complejidad grandes biomoléculas.

Las proteínas redox constituyen sistemas de gran complejidad como consecuencia de la heterogeneidad de aminoácidos que las conforman y de complejos metálicos que constituyen generalmente sus sitios activos, así como de la variabilidad estructural que presentan y la amplia diversidad de mecanismos que exhiben en la modulación de su

actividad fisiológica. El hecho de funcionar generalmente en ambientes anisotrópicos, con alto *crowding* molecular y sometidas a fluctuaciones de las condiciones físico-químicas de su entorno (temperatura, pH, fuerza iónica, campo eléctrico, etc.) hacen de las proteínas redox sistemas dinámicos, lo que resulta una característica fundamental en su función biológica. Si bien la complejidad asociada a estos sistemas impone todo tipo de obstáculos en su estudio, es responsable también del alto grado de regulación que presentan, sin el cual ningún organismo podría responder exitosamente a los múltiples cambios en los requerimientos energéticos originados por las constantes fluctuaciones del medio. Además, la naturaleza ha tenido que armonizar dos requisitos a priori incompatibles, a saber, procesos con una baja fuerza impulsora y con una alta velocidad de reacción para que ocurra en tiempos compatibles con la vida. En este sentido, existen aún muchos interrogantes acerca de los distintos puntos de control del proceso de respiración celular y de los mecanismos que permiten una regulación fina. Un actor fundamental en estos mecanismos es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones, la citocromo c oxidasa (CcO), y en particular su aceptor primario de electrones, el sitio de Cu_A.

Se plantean en esta tesis dos objetivos generales, en torno a los cuales se desarrollan los tres capítulos experimentales. El primero es contribuir a la elucidación de los mecanismos que regulan a las reacciones de TE en el aceptor primario de electrones de la CcO, el sitio de Cu_A, y el segundo es generar un aporte en términos de la manipulación de las distintas propiedades de metaloproteínas redox de cobre. En particular, se estudió un fragmento soluble de la subunidad II que contiene el sitio de Cu_A de la CcO (Tt-Cu_A). Las variantes estudiadas son tanto la proteína silvestre como especies mutantes puntuales de un ligando axial y otras generadas mediante ingeniería de bucles. A partir de esta última estrategia mutagénica se reconstruyó además un sitio de cobre Tipo 1 con características novedosas. Los objetivos específicos de la tesis son:

- Caracterizar y racionalizar el efecto de diversas perturbaciones sobre las propiedades redox del sitio de Cu_A en un modelo nativo.
- Contribuir a la elucidación de los mecanismos que modulan la alternancia de los estados fundamentales alternativos del sitio de Cu_A.
- Generar un aporte cualitativo en términos de la manipulación racional de sitios redox de cobre.

En este primer capítulo se introducen los conceptos fundamentales de los sistemas experimentales, del marco teórico empleado y de las técnicas espectroscópicas y electroquímicas utilizadas a lo largo de la tesis. En el capítulo 2 se detallan los protocolos para la producción de las muestras proteicas y de electrodos biocompatibles, así como también el equipamiento utilizado, el diseño de los distintos experimentos y los formalismos para algunos tratamientos de datos. El capítulo 3 está dedicado al estudio espectroscópico y electroquímico de Tt-Cu_A y cuatro variantes mutagénicas, y a la

racionalización de los resultados en términos de la población diferencial de los estados fundamentales alternativos. En el capítulo 4 se profundizan estos estudios a partir de estudios en especies adsorbidas sobre electrodos biocompatibles y en particular se caracteriza un *switch* funcional dependiente del pH. Este *switch* ofrece la oportunidad de estudiar ambos estados redox activos alternativos en la misma proteína. En el capítulo 5 se abordan dos modelos de proteína de cobre Tipo 1 novedosos, reconstruidos en la matriz proteica de Tt-Cu_A mediante ingeniería de bucles. Estos modelos permiten, por un lado, estudiar el efecto de la matriz proteica sobre las propiedades redox del sitio activo y, por el otro, avanzar en términos de la manipulación racional de las propiedades redox de metaloproteínas de cobre. En particular, estos modelos presentaron la capacidad de incorporar un ligando exógeno en la coordinación del sitio activo, modificando sus propiedades sin perder actividad redox. Finalmente, en el capítulo 6 se realiza un análisis global de los resultados producidos a lo largo de la tesis y se propone un modelo regulatorio para la porción de la cadena de transporte electrónico en la que participa el sitio de Cu_A.

1.2- Metaloproteínas redox y su entorno fisiológico

Se estima que entre un cuarto y un tercio de todas las proteínas de un organismo requieren de uno o más átomos metálicos como cofactores necesarios para llevar a cabo su actividad fisiológica ^{1,2}. De hecho, las metaloproteínas abarcan una enorme variedad de funciones *in vivo*, siendo una de las más destacadas la de llevar a cabo reacciones redox. Esta estrategia evolutiva permite superar las limitaciones que representarían contener únicamente los grupos funcionales de los aminoácidos como centros dadores o aceptores de electrones ³. Típicamente, el metal se presenta coordinado por átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre de los residuos aminoácidos de la cadena polipeptídica y/o de un ligando macrocíclico (grupo prostético) incorporado en la proteína ⁴. De este último caso, los más conocidos y estudiados son los de las hemoproteínas, donde un átomo de hierro se encuentra coordinado ecuatorialmente por átomos de una porfirina (grupo prostético hemo) y axialmente por ligandos de la metaloproteína ⁵.

Son muchos y muy variados los átomos metálicos que actúan como cofactores de metaloproteínas, siendo los más ubicuos hierro, cobre, zinc, magnesio, manganeso, cobalto y mercurio ⁶. De ellos, el de mayor presencia en los organismos vivos es el hierro, siendo el cobre el que ostenta el segundo lugar ⁷. Sobre estos últimos se centrará la atención en la siguiente sección y, en particular, en dos subgrupos de las metaloproteínas de cobre, que configuran los sistemas de estudio en esta tesis: los sitios de cobre tipo 1 y los sitios de Cu_A.

1.2.1- Sitios de cobre en metaloproteínas

Existen en la naturaleza distintos tipos de sitios de cobre, que pueden estar conformados por un único átomo de cobre, denominados tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y Cu_B , por dos átomos de cobre, denominados Cu_A y tipo 3 (T3), o por 4 átomos de cobre, denominados Cu_Z (figura 1-1). En el sitio T1 el ion metálico se encuentra coordinado por dos histidinas, una cisteína y una metionina axial débilmente unida, y es el tipo de centros que se encuentra en proteínas tales como la Plastocianina, Pseudoazurina, Azurina o Amicianina, entre otras ⁸. Este tipo de sitios redox, presentes principalmente en las llamadas “proteínas azules de cobre”, será introducido en detalle y estudiado a lo largo del capítulo 5. Por su parte, los sitios T2 suelen presentar al ion cobre coordinado por cuatro histidinas, pero existe cierta variabilidad, habiendo reportes de ácidos aspárticos o tirosinas en la primera esfera de coordinación ⁹. Este tipo de centros se encuentra en las superóxido dismutasas y galactosa oxidasas. El sitio de Cu_B , también mononuclear, tiene una coordinación de tres histidinas en una geometría piramidal trigonal, y se encuentra en la Citocromo c oxidasa (CcO) y algunas NO reductasas, en todos los casos asociados a un grupo hemo ¹⁰.

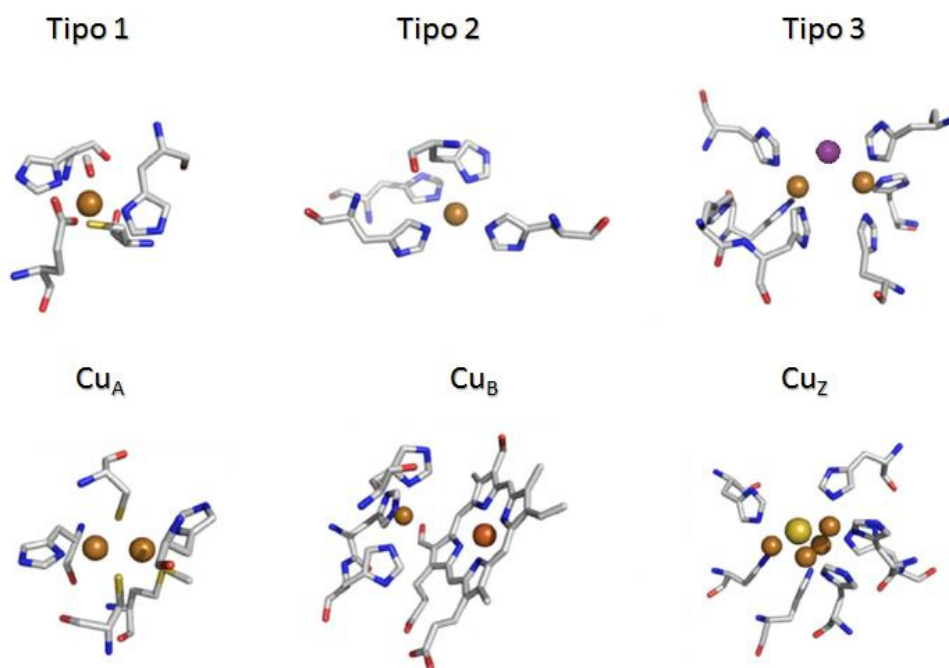


Figura 1-1. Representación esquemática de los distintos centros redox biológicos que contienen átomos de cobre. Se distinguen con colores los átomos de carbono (gris), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), azufre (amarillo), cobre (naranja) y hierro (rojizo). Para el caso de sitios T3, se presenta en violeta un átomo que adquiere distintas identidades entre las variantes del sitio y que “puntea” a los iones metálicos. En el caso del centro de Cu_B , se representa un grupo hemo al que se encuentra siempre asociado.

En el sitio dinuclear T3 los átomos de cobre se encuentran coordinados por histidinas y puenteados generalmente (aunque hay excepciones) por un átomo de oxígeno, de modo que no se establece un enlace entre ambos ^{11,12}. Este tipo de centro redox se encuentra por ejemplo en la hemocianina y en la tirosinasa. El sitio tetranuclear Cu₄ tampoco presenta enlace entre los iones metálicos. En este caso los cuatro átomos de cobre se encuentran coordinados por siete residuos de histidinas y puenteados por uno o dos átomos de azufre ¹³. Este sitio se ha encontrado únicamente en la N₂O reductasa (N₂OR) y participa en su actividad catalítica ^{14,15}. En contraste, el sitio de Cu_A es el primer ejemplo conocido de un enlace entre dos iones metálicos en la naturaleza. Los átomos de cobre forman un enlace covalente entre sí y se encuentran coordinados ecuatorialmente por una histidina cada uno, dos cisteínas que a su vez actúan de puente entre ambos iones y dos ligandos axiales débiles conservados: una metionina y el carbonilo amídico de una glutamina ¹⁶⁻¹⁹. Es un sitio que intercambia un solo electrón en la reacción de TE, quedando con un electrón desapareado completamente deslocalizado entre ambos átomos de cobre en su estado oxidado. Estos sitios se encuentran en las CcOs y las N₂ORs, presentando en todos los casos conocidos un alto grado de conservación tanto en sus características estructurales como en sus propiedades funcionales ^{20,21}. Este tipo de sitios redox será introducido extensamente y estudiado en detalle en los capítulos 3 y 4.

Las proteínas que contienen sitios T1 y aquellas que contienen al sitio de Cu_A comparten una estructura general conservada de la matriz proteica, denominada plegamiento cupredoxina ²²⁻²⁴. El motivo canónico de esta estructura conservada consiste en un barril β formado por ocho láminas β y una o dos hélices α (figura 1-2). Estas hélices α pueden variar, no sólo entre una o dos, sino en su extensión, aunque en ningún caso participa del cuerpo principal de la matriz proteica, quedando relegadas a posiciones superficiales. Si bien las proteínas que contienen sitios T1 y Cu_A son conocidas como cupredoxinas por presentar este tipo de plegamiento, la recíproca no es cierta, habiendo ejemplos de cupredoxinas que contienen sitios T2 como la Nitrosocianina o T3 como la Haemocianina, entre otras ^{9,25}. No obstante, los sitios T1 y Cu_A son los únicos que sólo existen en proteínas con este tipo de plegamiento. Los ligandos de primera esfera de coordinación en las cupredoxinas se encuentran en los bucles ubicados entre algunas de las láminas β de la matriz proteica. Generalmente el bucle C-terminal es el que presenta la mayor cantidad de ligandos al/los cobre/s (tres en sitios T1 y cinco en sitios de Cu_A), razón por la cual recibe el nombre de “bucle ligante”. Este bucle ha sido y sigue siendo objeto de estudios mediante mutagénesis dirigida dada su relevancia en la determinación de las propiedades estructurales del sitio activo en cupredoxinas, lo cual será discutido a lo largo de los capítulos experimentales.

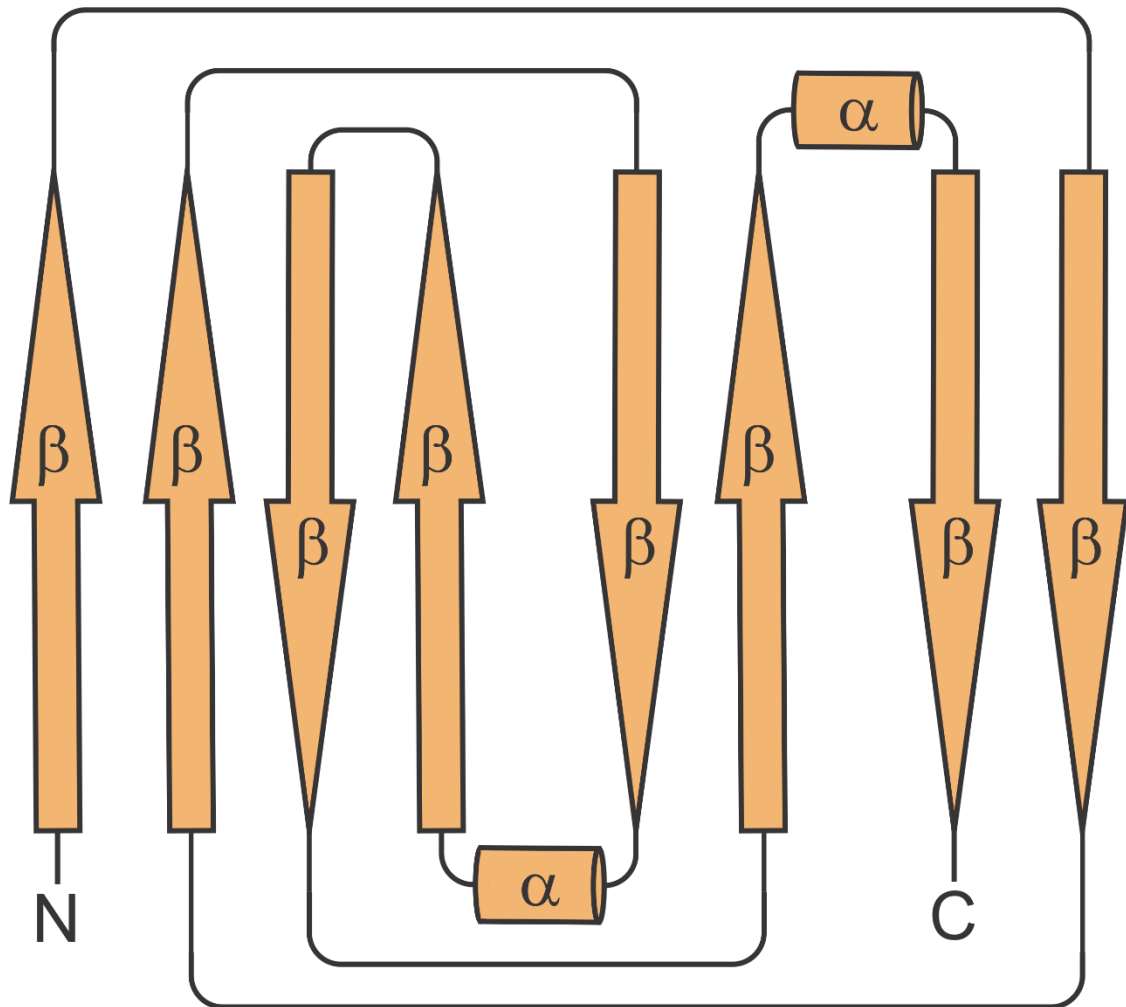


Figura 1-2. Representación topológica del plegamiento cupredoxina, con sus 8 hojas β , sus (hasta) dos hélices α y sus múltiples bucles, donde se encuentran la mayoría de los ligandos al/los átomo/s de cobre.

1.2.2- La cadena de transporte de electrones

La fuente casi absoluta de energía para los seres vivos en la Tierra es el Sol, dado que los organismos fotosintéticos (plantas, cromistas y muchos grupos procariotas) utilizan la radiación solar como fuente de energía para sintetizar biomoléculas (típicamente glucosa) constituyendo así el primer eslabón de la cadena alimentaria. La glucosa, ya sea ingerida o sintetizada, es degradada a través de un conjunto de reacciones metabólicas dando como resultado moléculas de adenosín trifosfato (ATP) a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato ²⁶. Se dice que estas moléculas de ATP ofician de “moneda energética” ya que su hidrólisis se encuentra acoplada a muchas de las reacciones involucradas en la mayoría de los demás procesos celulares, que no podrían ocurrir sin aporte de energía libre ²⁷. Si bien existen en la biología diversas rutas metabólicas para la síntesis de ATP, tales como distintas variantes de la fermentación y respiración celular,

todas comparten a las reacciones redox como el mecanismo central. La respiración celular es el más eficiente de los procesos conocidos, ya que durante el mismo se obtiene la mayor cantidad de moléculas de ATP por glucosa frente al resto de los mecanismos conocidos por la biología. La respiración comprende, en realidad, 3 grandes rutas metabólicas: la glicólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (figura 1-3).

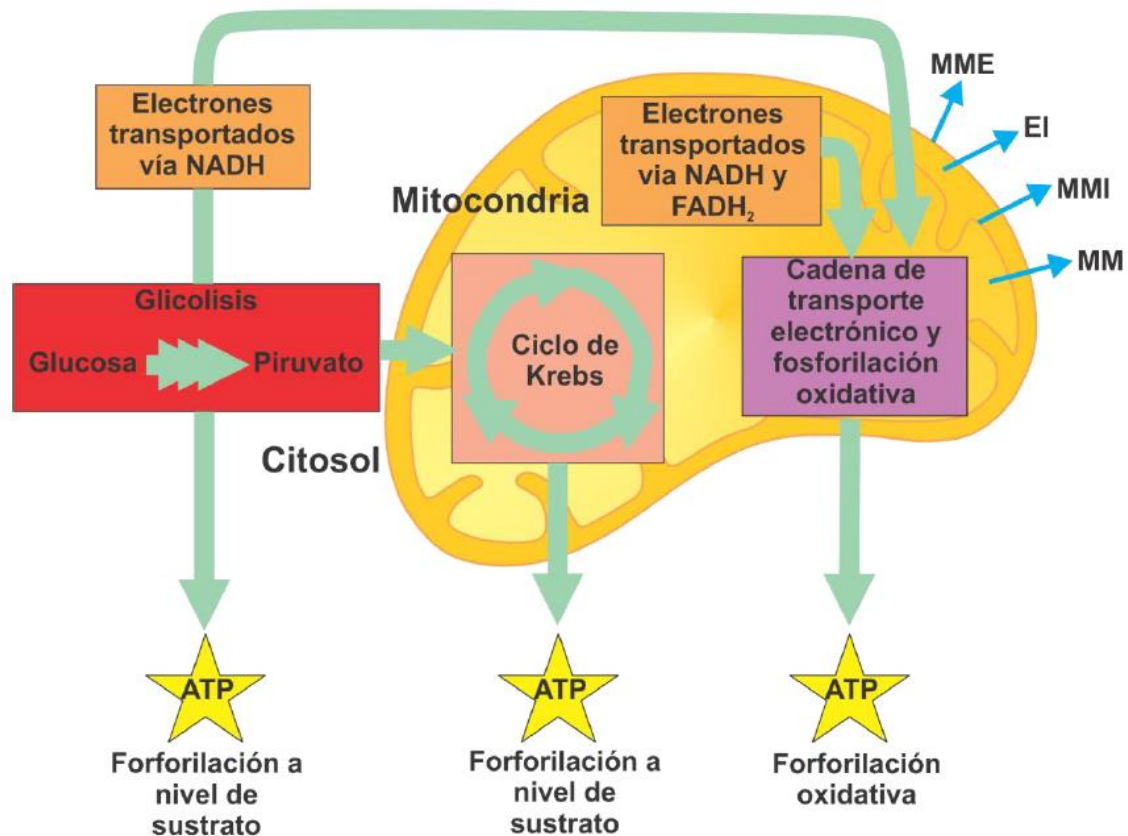


Figura 1-3. El conjunto de rutas metabólicas necesario para obtener energía de la glucosa mediante la respiración celular. MME: Membrana mitocondrial externa. EI: Espacio intermembrana. MMI: Membrana mitocondrial interna. MM: Matriz mitocondrial. Durante la glicólisis comienza la degradación de las moléculas de glucosa, para continuar luego en el ciclo de Krebs. Así, la degradación ocurre secuencialmente generándose el denominado “poder reductor” (NADH y FADH₂) y moléculas de ATP.

El primer paso de la respiración celular es la glicólisis, que ocurre en el citosol, durante la cual una molécula de glucosa es fragmentada y convertida en dos moléculas de ácido pirúvico, produciéndose una liberación de energía suficiente para formar dos moléculas de ATP. El piruvato ingresa luego a la mitocondria (en el caso de células eucariotas), donde una secuencia de reacciones y la asociación con la coenzima A (CoA)

lo convierten en acetil-CoA para luego entrar al proceso metabólico denominado ciclo de Krebs (también conocido como ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos). Durante este proceso, se desarrollan oxidaciones secuenciales del reactivo produciéndose CO_2 , ATP y el denominado “poder reductor”. Este último se genera mediante la extracción de varios electrones y protones que son captados por moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) y flavín adenín dinucleótido (FAD), dando como productos NADH, NADPH y FADH_2 , todos ellos formados mediante reacciones de 2 electrones. Estos protones y electrones serán utilizados durante la fosforilación oxidativa, un proceso que involucra a la cadena de transporte de electrones y la enzima ATP-sintetasa.

La cadena de transporte de electrones se encuentra constituida por un conjunto de macromoléculas que trabajan en una interfaz delimitada por una membrana lipídica (figura 1-4). Algunos de los componentes se encuentran directamente embebidos como proteínas transmembrana, mientras que otros son solubles, pero desarrollan sus tareas en la interfaz lípido-solución. En organismos eucariotas, esta cascada de reacciones ocurre en la mitocondria, siendo entonces la membrana interna mitocondrial el escenario en el que se despliega este proceso. Por el contrario, en organismos procariotas, que carecen de organelas, es en la propia membrana celular donde se encuentra conformada la cadena de transporte de electrones (entre otras diferencias). En cualquier caso y como fue comentado en la sección anterior, el sitio de Cu_A se encuentra presente en la CcO (además de la N_2OR , ajena a la respiración celular). Este sitio redox es de enorme relevancia biológica teniendo en cuenta el carácter absolutamente ubicuo de la CcO, actor fundamental de la cadena de transporte de electrones, en los organismos aeróbicos de nuestro planeta. A lo largo de esta tesis, el sitio de Cu_A será el sistema estudiado en mayor extensión y profundidad, y algunas de las conclusiones finales estarán vinculadas con su rol biológico. Además, el entorno fisiológico en el que se desenvuelven los actores de la cadena de transporte de electrones, una membrana biológica, presenta características determinantes para su función (que serán comentadas en la siguiente sección).

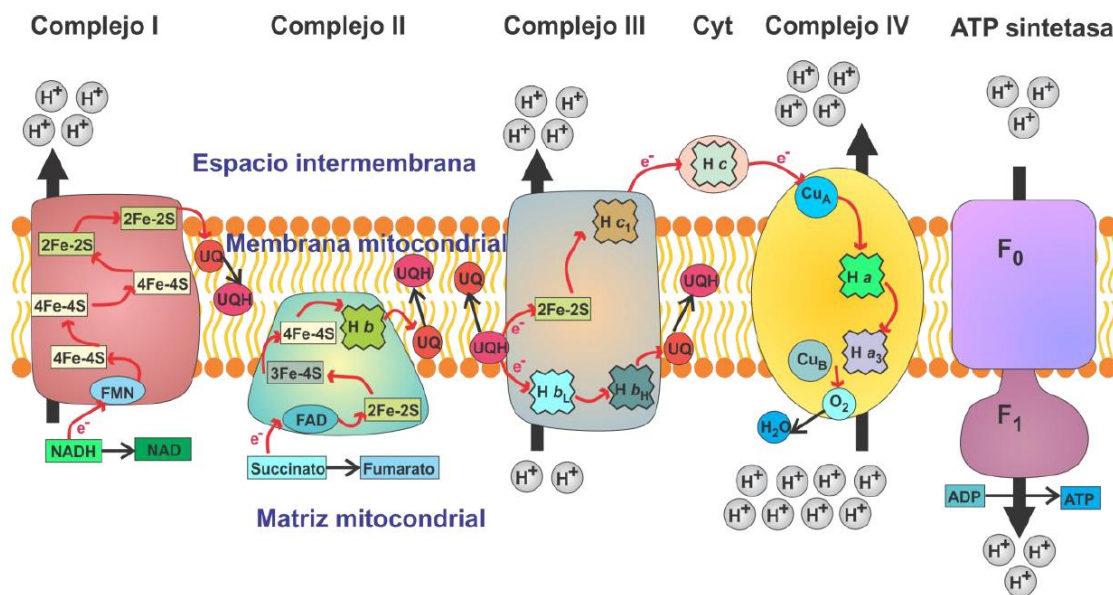


Figura 1-4. Representación de la cadena respiratoria mitocondrial en la cual se esquematizan los diversos complejos proteicos insertados en la membrana interna mitocondrial. Cada complejo contiene en su interior distintos centros redox que son los que efectivamente reciben electrones para luego cederlos al siguiente centro. El flujo de electrones está indicado con flechas rojas. El complejo I recibe electrones del NADH, que entonces se oxida a NAD. Los electrones se transfieren secuencialmente a través de los seis centros redox de dicho complejo, para finalmente ser transferidos a una UQ que se reduce a UQH. El complejo II, a su vez, capta electrones del succinato proveniente del ciclo de Krebs y los transfiere finalmente a la UQ, generando fumarato y UQH. La UQH, (que es liposoluble) migra a través de la membrana hacia el complejo III donándole electrones que son luego transferidos al citocromo c (que es hidrosoluble). Este transfiere electrones al complejo IV que los utiliza para reducir el O₂ a H₂O. En los complejos I, III y IV las reacciones de TE están acopladas a la transferencia de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (contragradiante). Finalmente, el gradiente protónico se disipa a través de la ATP sintetasa, de manera acoplada a la síntesis de ATP.

En la cadena de transporte de electrones canónica, existen dos puntos de ingreso para los electrones: la NADH deshidrogenasa (complejo I) y la succinato deshidrogenasa (complejo II). La primera (complejo I) cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hacia la coenzima ubiquinona (UQ), un compuesto pequeño e hidrofóbico capaz de difundir dentro de la membrana interna mitocondrial. Este complejo I involucra más de 30 cadenas polipeptídicas, una molécula de flavín mononucleótido (FMN), y hasta 7 *clusters* de Fe-S. Básicamente, el NADH reduce al FMN a FMNH₂ en una reacción de dos electrones, y esta es luego oxidada en dos reacciones de un electrón en la que cada uno es transferido del FMNH₂ a un *cluster* de Fe-S, y de allí a la UQ. La transferencia

del primer electrón resulta en la forma radicalaria de la quinona (el intermediario semiquinona) y la transferencia del segundo electrón la convierte en ubiquinol (UQH). Durante este proceso, cuatro protones son translocados desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, contribuyendo a la generación de un potencial electroquímico. Por su parte, la succinato deshidrogenasa (complejo II) es la única enzima del ciclo de Krebs que se constituye como una enzima integral de membrana, en la membrana interna mitocondrial, y está compuesta por cuatro subunidades. Esta proteína presenta *clusters* de Fe-S en dos de sus subunidades y está asociada a un FAD, por lo que es una flavoproteína. Cuando el succinato es convertido en el ciclo de Krebs a fumarato, ocurre la reducción concomitante del FAD a FADH₂ en el Complejo II, lo que desencadena la transferencia electrónica (TE) hacia los *clusters* de Fe-S y finalmente a la UQ para formar UQH.

El citocromo *bc*₁ (complejo III) es un dímero en el que cada monómero está integrado por once subunidades proteicas. La estructura dimérica posee un dominio de gran tamaño que se extiende dentro de la matriz mitocondrial, un dominio transmembrana y un pequeño dominio que se encuentra en el espacio intermembrana. En este complejo, el ciclo de las quinonas sigue contribuyendo a la conformación del gradiente protónico a través de una captura y liberación asimétrica de protones. Se remueven dos electrones del UQH y se transfieren secuencialmente a dos moléculas de citocromo *c* (Cyt *c*) que se localizan en el espacio intermembrana. Otros dos electrones son transferidos a través de la proteína para la reducción de una molécula de UQ a UQH a partir de protones de la matriz mitocondrial, contribuyendo al establecimiento del gradiente protónico. Tanto la UQ como el Cyt *c* son transportadores solubles de electrones, pero el primero es liposoluble (se desplaza en el interior de la membrana interna mitocondrial) mientras que el segundo es hidrosoluble (se desplaza en el espacio intermembrana). Más aún, esta hemoproteína globular pequeña es el único de los citocromos de la cadena de transporte de electrones que resulta soluble en agua, encontrándose débilmente asociado a la membrana mitocondrial interna. El Cyt *c* recibe electrones del citocromo *c*₁ del complejo III y luego migra sobre la superficie de la membrana en su estado reducido, transportando electrones hacia la CcO, que constituye el complejo IV de la cadena de transporte de electrones.

En la CcO (complejo IV) se remueven cuatro electrones de cuatro moléculas de Cyt *c* y se transfieren, vía una cadena de reacciones de transferencia electrónica intramolecular, al último aceptor. Si la respiración es aeróbica, este aceptor es el O₂, produciéndose como resultado dos moléculas de agua y la translocación de cuatro protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, lo que contribuye al establecimiento del gradiente protónico. Este complejo proteico de gran tamaño se encuentra formado por 13 subunidades en mamíferos (variaciones entre especies serán comentadas en la sección 3.1.1) y posee cuatro sitios redox. Dos de ellos son centros hémicos (citocromos *a* y *a*₃) y los otros dos, como fue comentado en la sección anterior,

son los sitios de Cu_A y Cu_B. La reducción de una molécula de oxígeno requiere el pasaje de cuatro electrones a través de estos transportadores, mediante reacciones mono-electrónicas. Los electrones son transferidos desde el Cyt c al centro de Cu_A y desde allí al hemo α . Este último los cede al centro dinuclear constituido por el Cu_B y el hemo α_3 , que se encuentran situados muy próximamente. Es aquí donde se cataliza la reducción de O₂ a H₂O, acoplada a la transferencia de cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial. El gradiente protónico entre ambos lados de la membrana genera una diferencia de potencial electroquímico que es luego utilizado durante el último paso de la fosforilación oxidativa. El componente molecular que acopla la disipación de este gradiente a la síntesis de ATP es la ATP sintetasa, también conocida como *lollipop* por su particular estructura tridimensional. Esta proteína consta típicamente de dos dominios, el primero de los cuales actúa como un canal iónico que permite el flujo de los protones a favor del gradiente, mientras que el segundo aprovecha la energía libre de esa disipación para la síntesis de ATP.

La glicólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa han constituido un campo de investigación de gran actividad para la biología, la química y disciplinas asociadas (bioquímica, biofísica, etc.). Si bien el conocimiento adquirido sobre los procesos que ocurren en la cadena de transporte de electrones es muy extenso, muchos estudios realizados fallan en captar las características del sistema en condiciones reactivas. Este punto no resulta un elemento exclusivo de la cadena de transporte de electrones, sino que afecta a todos los procesos metabólicos que involucran proteínas transmembrana o asociadas a membranas biológicas, lo cual representa una porción muy significativa de los procesos biológicos conocidos. La inclusión experimental de algunas de las características presentes en las membranas biológicas resulta entonces no sólo aconsejable, sino necesaria para profundizar su entendimiento.

1.2.3- La interfaz membrana-solución

Las membranas biológicas, lejos de ser tan solo separadores entre compartimentos celulares, representan un medio en el cual un sinnúmero de proteínas desarrolla su actividad biológica ²⁷. Este tipo de medios presenta propiedades físicas particulares, cuya consideración resulta indispensable a la hora de estudiar sistemas biológicos vinculados a ellos. Tanto las proteínas transmembrana como las asociadas a membrana o aquellas que actúan en sus inmediaciones desempeñan su actividad en un medio altamente anisotrópico. Estas membranas presentan una estructura ordenada de bicapa lipídica, donde los grupos polares (o cargados) están expuestos al solvente, minimizando el contacto de este con las cadenas alifáticas. Dichos grupos no se encuentran homogéneamente distribuidos en las superficies de las membranas, sino que se encuentran también agrupados y asociados a otros actores celulares. Como consecuencia de estas características estructurales, la interfaz membrana solución

presenta un perfil de potencial eléctrico (ψ) de enorme relevancia para en los procesos biológicos que allí se desarrollan ²⁸⁻³⁰ (figura 1-5). Este perfil de potencial responde a la contribución de tres fenómenos distintos propios de las membranas biológicas: la diferencia de concentraciones iónicas entre los compartimentos que separan, la presencia de cargas eléctricas sobre las ambas superficies y la orientación de los dipolos (moléculas de agua, residuos aminoacídicos, etc.) en las inmediaciones.

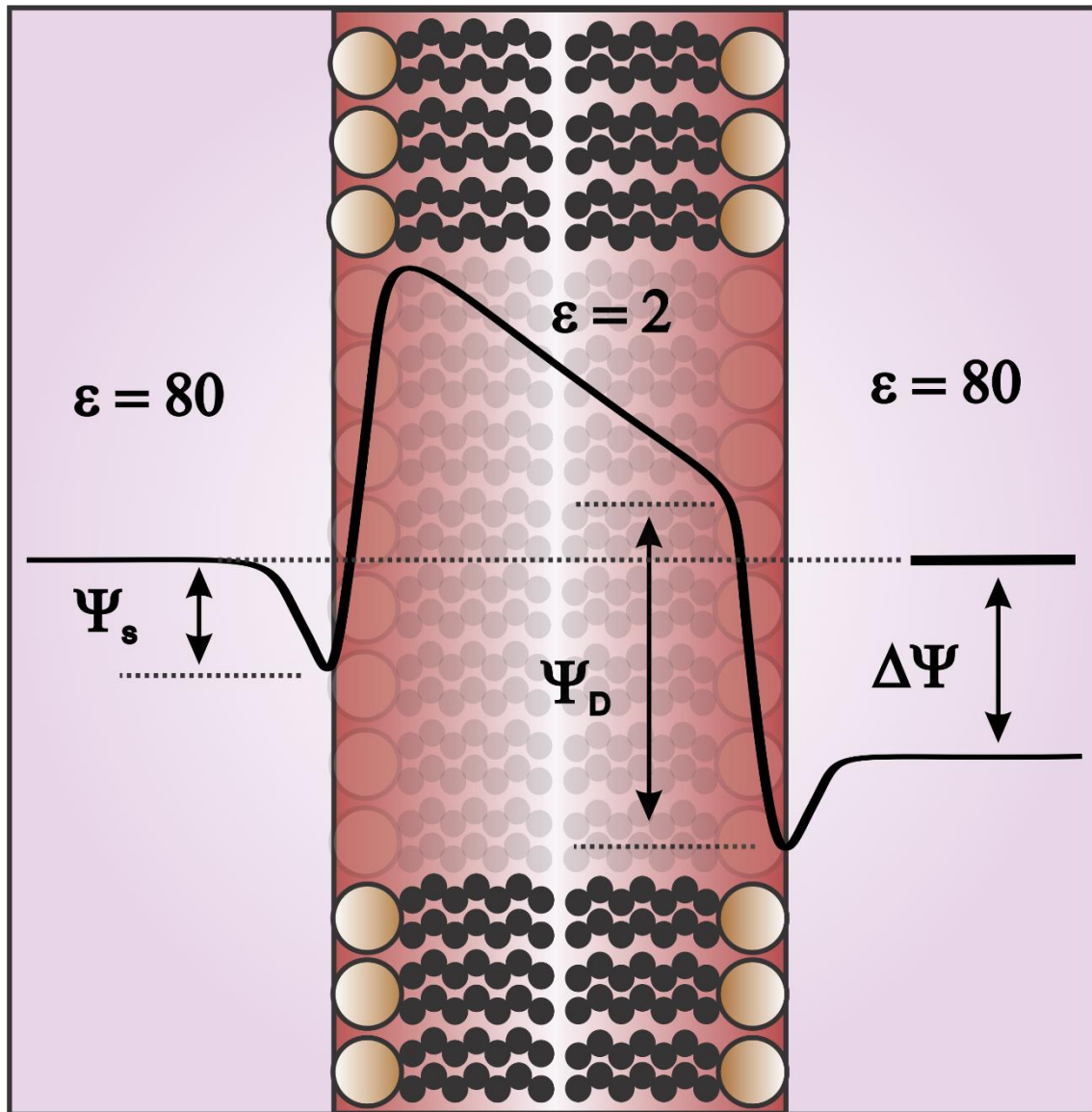


Figura 1-5. (figura adaptada de Murgida et al. 2004 ²⁹) *Perfil de potencial para las interfaces entre membranas biológicas (típicamente cargadas) y soluciones. Las contribuciones mayoritarias se deben a la diferencia de potencial transmembrana $\Delta\psi$, el potencial de superficie ψ_s y el potencial dipolar ψ_D .*

El primer fenómeno mencionado da origen al potencial transmembrana ($\Delta\Psi$), de enorme impacto en la magnitud del campo eléctrico interfacial y del potencial efectivo sobre la superficie de la membrana ³¹. Un valor de $\Delta\Psi$ de 100 mV a través de una membrana cuyo espesor sea de 4 nm resulta en un campo eléctrico de aproximadamente $2,5 \cdot 10^7$ V/m ³². La segunda componente, la presencia de cargas eléctricas superficiales, origina el denominado potencial de superficie (Ψ_s). Este no sólo es consecuencia de los grupos cargados de los lípidos que constituyen la bicapa, sino también de los iones de la solución situados sobre su superficie. La magnitud del campo eléctrico producido por este fenómeno es comparable al producido por el $\Delta\Psi$, y su valor ha sido estimado en el orden de 10^7 V/m. La última contribución y la de mayor magnitud es el potencial de dipolo (Ψ_D), consecuencia de la orientación de los dipolos en el entorno de la bicapa lipídica. El valor de Ψ_D decae rápidamente con la distancia, razón por la cual su medición directa presenta grandes dificultades. Así, a distancias mínimas de la superficie de las membranas biológicas este campo eléctrico resulta muy intenso, y han sido estimados valores de hasta 10^9 V/m.

Los campos eléctricos en la superficie de las membranas biológicas ejercerán ineludiblemente un efecto sobre la estructura y la dinámica de las proteínas que allí desarrollan sus funciones, aunque la magnitud de este efecto dependerá de cada caso particular. Un ambiente tan ubicuo en los sistemas biológicos debe haber ejercido una presión de selección tal que la mayoría de los procesos desarrollados sobre bicapas lipídicas estén optimizados a dichas condiciones. Más aún, es esperable que se hayan generado evolutivamente mecanismos regulatorios que involucren estos potenciales, agregando un grado de complejidad adicional. Por lo tanto, tener en cuenta este perfil de potencial en las inmediaciones de las membranas celulares resulta indispensable para abordar el estudio de las proteínas que allí desarrollan su actividad fisiológica. Si bien la gran mayoría de los estudios sobre proteínas se realiza en solución, un ambiente isotrópico que carece de estas características, existen distintas estrategias para incorporar en cierta medida la complejidad asociada a estas interfaces. En la siguiente sección se comentará una de estas estrategias, muy difundida para el estudio de metaloproteínas redox y, en particular, la empleada a lo largo de esta tesis.

1.2.4- Metaloproteínas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados

La utilización de técnicas electroquímicas para el estudio de proteínas redox resultó siempre de gran atractivo dados los resultados producidos a partir de sistemas más simples, como complejos inorgánicos o moléculas orgánicas pequeñas. Pero el paso a sistemas de esta complejidad no fue inmediato, principalmente debido a la dificultad de generar una comunicación directa entre el electrodo de trabajo y el sitio redox de una proteína preservando su integridad estructural, y por lo tanto su funcionalidad. La voluminosidad de las proteínas, el hecho de que en muchos casos el sitio redox se

encuentra embebido en la matriz, y el efecto desnaturalizante de las superficies metálicas sobre la mayoría de las proteínas adsorbidas representan los principales obstáculos que la electroquímica tuvo que sortear.

No fue sino hasta finales de la década del '70 que se pudieron lograr los primeros resultados robustos a partir de una variante de Cyt c adsorbida sobre electrodos biocompatibilizados^{33,34}. Poco se hizo esperar la variedad de intentos en la búsqueda de distintas estrategias de biocompatibilización de electrodos de trabajo, generalmente de oro y de plata, siendo aquel posiblemente el punto de partida de la bioelectroquímica. Las posibilidades de trabajar con proteínas redox en condiciones nativas y en ausencia de mediadores permitió que esta disciplina creciera rápidamente, gozando hasta estos días de una intensa actividad³⁵⁻³⁸. Una de las estrategias más difundidas en cuanto a la biocompatibilización de electrodos metálicos es la utilización de monocapas auto-ensambladas de alcanotioles ω -sustituídos (SAMs), que ha permitido el estudio electroquímico de proteínas redox desde hace aproximadamente 25 años³⁹⁻⁴¹. Su éxito se debe, por un lado, a la versatilidad que presentan a la hora de modificar controladamente una superficie metálica, y por el otro, al hecho de que recrean algunas de las características fundamentales de una membrana biológica, conformando un medio con cierto grado de biomimetismo para el estudio de proteínas redox (ver más adelante). La posibilidad de generar la adsorción de muestras proteicas sobre este tipo de sistemas permitió la investigación y caracterización de muchas de sus propiedades redox²¹.

El tipo de SAM más utilizada es la resultante de la quimisorción (adsorción mediante uniones covalentes) de alcanotioles sobre electrodos metálicos, que pueden ser de distintos metales “nobles” como oro, plata, platino, cobre, etc. En la conformación de estos sistemas, los ensamblados de alcanotioles se organizan espontáneamente sobre las superficies metálicas, formando estructuras semicristalinas (figura 1-6). Los alcanotioles presentan distintos grupos funcionales, que serán los que interactúen con la muestra proteica ya que conformarán la superficie funcionalizada. Así, el empleo de distintos ω -sustituyentes permite modificar la superficie para lograr tipos de contactos específicos con la proteína redox de interés (uniones hidrógeno, puentes salinos, contactos hidrofóbicos, etc.). Típicamente, la composición de grupos funcionales de la SAM se optimiza para la mayor adsorción de muestra proteica y en la orientación promedio deseada, aunque existen casos distintos, como por ejemplo experimentos electroquímicos sobre especies en solución (ver sección 2.2.1). La alta afinidad del grupo funcional tiol por este tipo de superficies metálicas posibilita la construcción de superficies orgánicas sobre ellas, en las cuales puede controlarse la composición química, es decir, los grupos funcionales expuestos de la superficie⁴². Son estas cualidades, sumadas a la capacidad de controlar la distancia entre la superficie de la SAM y la superficie metálica utilizando alcanotioles de distinto largo de cadena, las que dotan a estos sistemas de gran versatilidad en cuanto al control del entorno de las proteínas adsorbidas.

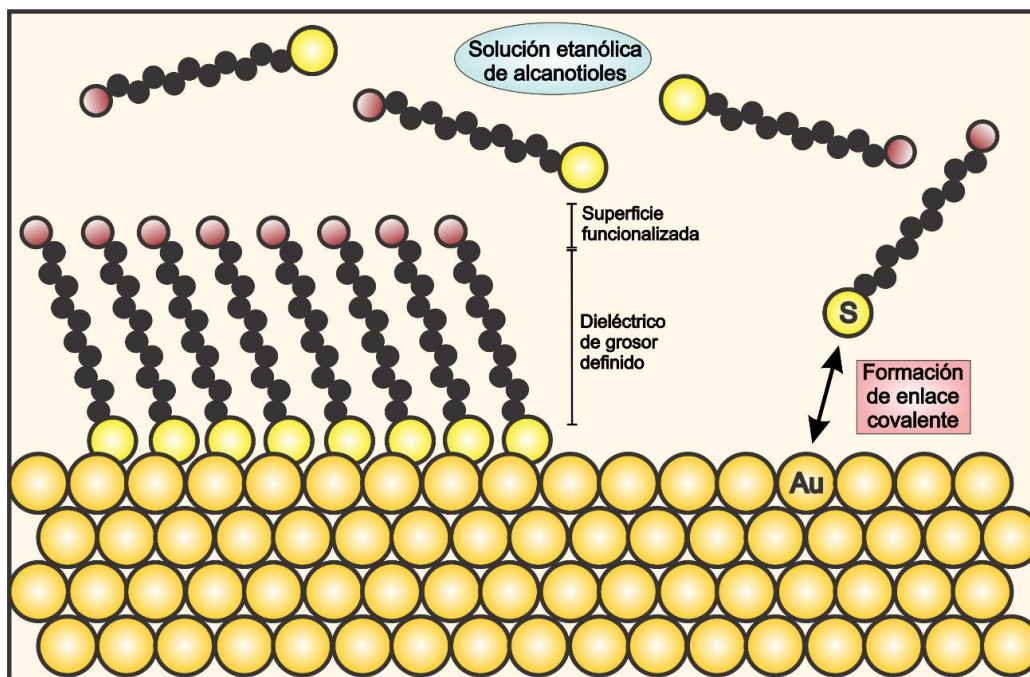


Figura 1-6. *Proceso de autoensamblado de SAMs, donde los alcanotioles se aproximan a la superficie y establecen un enlace covalente entre la superficie metálica (de oro) y el átomo de azufre. Las interacciones intermoleculares entre las cadenas alifáticas favorecen el empaquetamiento, dando origen a la SAM de grosor definido.*

Las SAMs empleadas suelen ser estables en el rango de valores de potencial de interés cuando se estudian sistemas proteicos, debido a que los potenciales de desorción reductiva son muy negativos, con valores de aproximadamente -1 V vs Ag/AgCl ^{43,44}. Cabe comentar que algunos autores han reportado transiciones de fase dependientes del potencial para SAMs de alcanotioles puros (con el grupo terminal metilo), cuyo valor crítico depende de la longitud de cadena de los alcanotioles y puede encontrarse entre $0,15$ V y $-0,35$ V ⁴⁵. Este fenómeno, sin embargo, no ha sido observado para SAMs de dos componentes con grupos terminales metilo e hidroxilo. Por su parte, las SAMs puras de hidroxilo y las SAMs mixtas hidroxilo/metilo ensambladas sobre electrodos de oro (los sistemas empleados en esta tesis) han sido caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas vibracionales (Raman e infrarrojo), observándose una orientación homogénea de los alcanotioles, con casi todas las cadenas alifáticas completamente trans y pocas irregularidades en la estructura general ^{46,47}.

Como ya fue comentado, la ventaja de la utilización de SAMs no es meramente la de un espaciador que preserva la estructura nativa de las proteínas, si no que pueden conformar un entorno biocompatible que actúa como un modelo simple de membranas biológicas, ya que pueden emular varias características importantes de las capas lipídicas, como un interior hidrofóbico y cabezas cargadas o polares. Electrodos metálicos biocompatibilizados de esta manera presentan un perfil de potencial

complejo en la interfaz entre el electrodo y la solución, de características análogas a las de una bicapa lipídica ^{29-31,48,49} (figuras 1-5 y 1-7). Estos sistemas exhiben las contribuciones Ψ_s y Ψ_D , y la diferencia de potencial entre el potencial del electrodo y el potencial de carga cero ($\Delta\phi$) emula la contribución del $\Delta\Psi$ de las membranas biológicas (ya que se asemejan en perfil y magnitud). En consecuencia, existe un campo eléctrico local en la región de unión de la proteína que depende del largo de cadena de los alcanotioles (que definen el espesor de la monocapa), la funcionalización de la SAM, el potencial del electrodo, el pH y la fuerza iónica de la solución. En particular, la distancia entre la proteína y el sitio metálico modifica el potencial efectivo y la magnitud del campo eléctrico interfacial, especialmente para SAMs delgadas. Este fenómeno y su efecto sobre el sitio de Cu_A será estudiado y discutido en el capítulo 4.

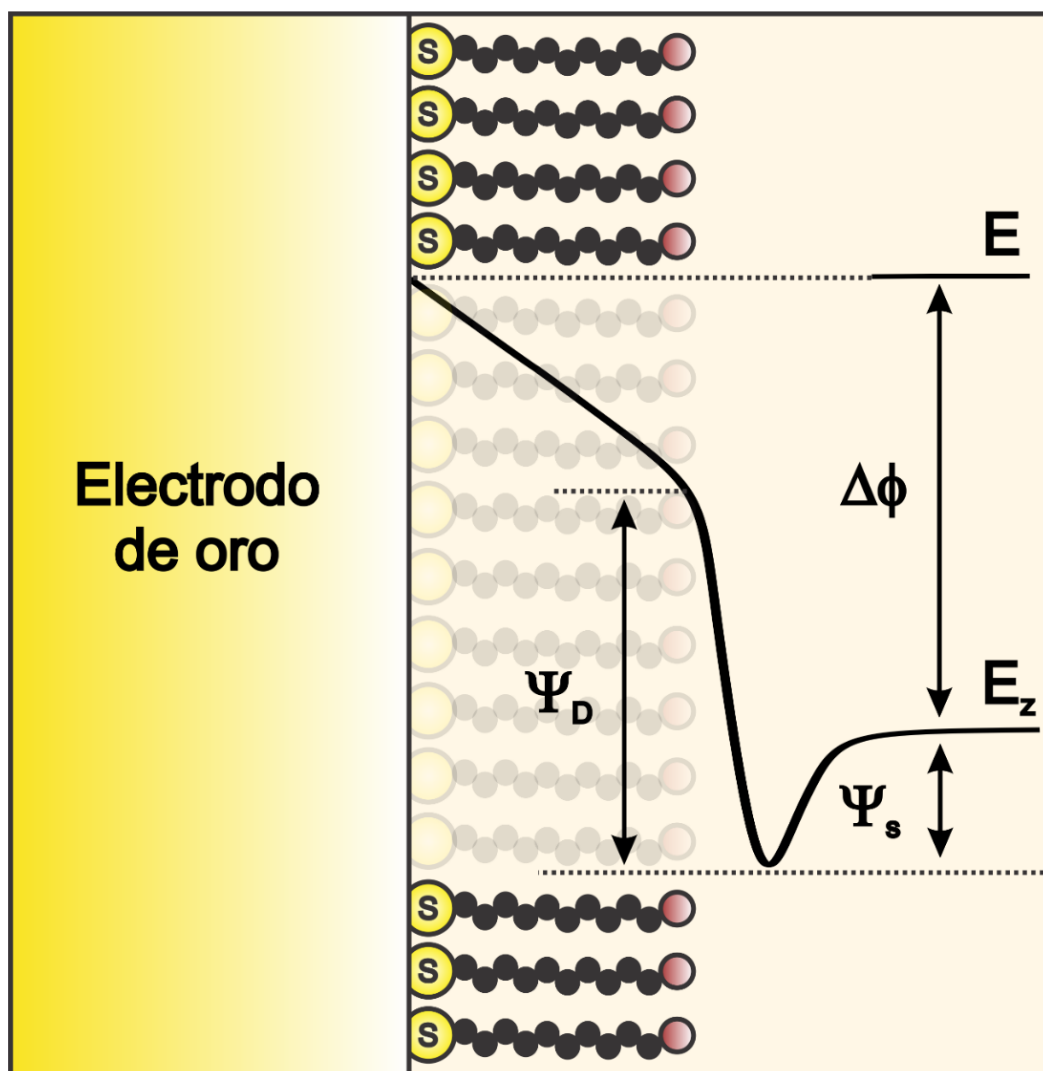


Figura 1-7. Perfil de potencial para la interfaz electrodo/SAM/solución. Las contribuciones mayoritarias se deben a la diferencia de potencial entre el potencial del electrodo (E) y el potencial de carga cero (E_z) $\Delta\phi$, el potencial de superficie Ψ_s y el potencial dipolar Ψ_D .

1.2- Transferencia electrónica

La reacción de TE constituye la reacción química más elemental en la naturaleza y en consecuencia es transversal a muchas áreas del conocimiento. Su estudio incluye procesos sobre electrodos metálicos, en sólidos, coloides, micelas y proteínas hasta reacciones de TE acopladas a transferencia protónica y la elucidación del rol protagónico de la TE en diferentes mecanismos de reacciones orgánicas, la quimioluminiscencia y la fotosíntesis ⁵⁰⁻⁵². En el marco de esta tesis, resultan de particular interés las reacciones de TE proteica tanto en solución como de especies adsorbidas sobre electrodos metálicos.

1.3.1- Cinética de la reacción de TE: teoría extendida de Marcus

La teoría semiclásica de Marcus constituye un modelo simple pero efectivo que permite el abordaje de la cinética de procesos de TE ⁵¹. Este modelo ha sido modificado y refinado posteriormente por distintos autores, tales como Dogonadze, Hush y Levich, entre otros, tanto para extender el formalismo a reacciones heterogéneas como para vincularlos a la descripción cuántica del sistema ⁵³. No obstante, estas subsecuentes modificaciones se mantienen sobre los mismos conceptos fundamentales.

En su caso más sencillo, el formalismo semiclásico de las reacciones de TE está descrito en términos de la interacción de dos curvas armónicas de energía libre en función de la configuración nuclear de las especies: una correspondiente al estado inicial y la otra al estado final ⁵¹ (figura 1-8). En su intersección, ambas especies (reactivos y productos) presentan la misma energía libre y la misma configuración nuclear, y según este formalismo es allí donde se produce la ecualización de niveles electrónicos que permite el tuneo electrónico. Por lo tanto, los reactivos deben sufrir un reordenamiento nuclear de modo de alcanzar este punto de intersección para que la TE pueda ocurrir. Alcanzada la intersección, existe una probabilidad de que la TE ocurra, asociada a la interacción electrónica o el acoplamiento electrónico ($|H_{DA}|$) entre los reactivos.

La constante de velocidad de transferencia electrónica (k_{TE}) para un sistema de estas características se puede expresar como:

$$k_{TE} = \nu_n \kappa_{el} \kappa_n \quad (1)$$

donde ν_n es la frecuencia nuclear efectiva con la que los reactivos alcanzan la intersección de las curvas armónicas, κ_{el} es el coeficiente de transmisión electrónica vinculado a la probabilidad de que se transfiera el electrón alcanzada la intersección y κ_n es el factor de reorganización nuclear o de Franck-Condon.

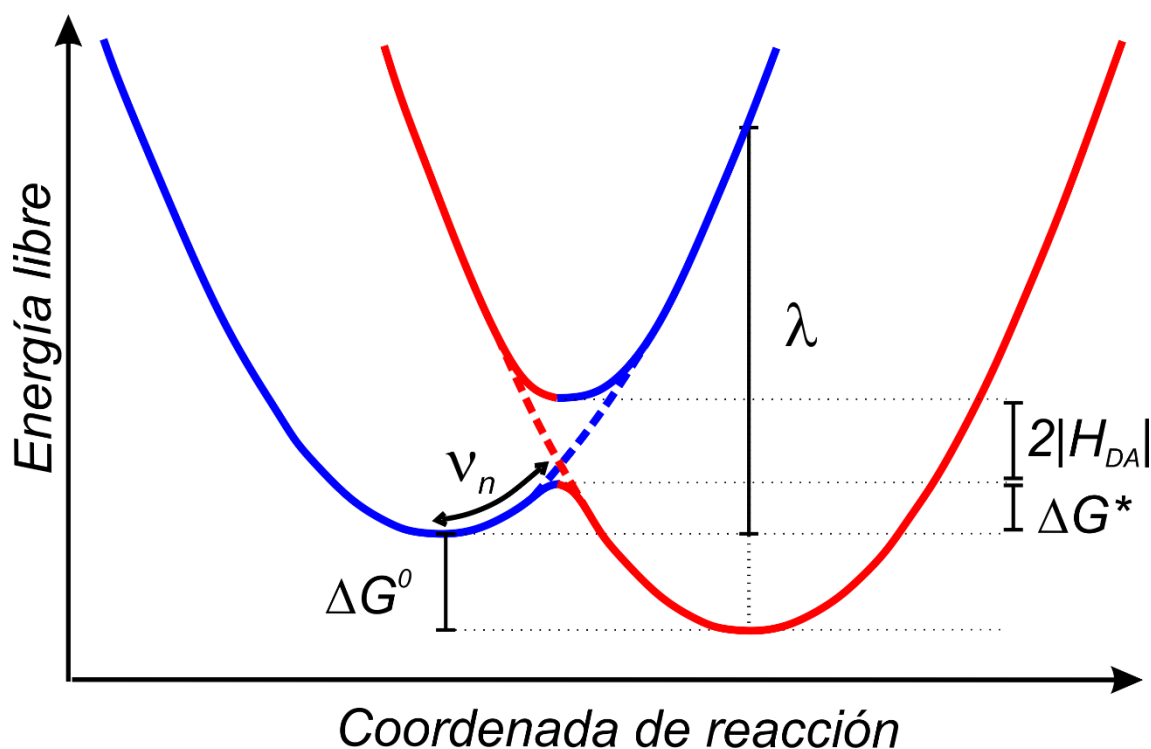


Figura 1-8. Superficies de energía libre para reactivos (azul) y productos (rojo) de una reacción de TE en función de una coordenada generalizada de reacción. Se indican en la figura los parámetros termodinámicos y cinéticos relevantes en términos de la teoría de Marcus: energía libre de reacción (ΔG^0), frecuencia nuclear efectiva (ν_n), energía de reorganización (λ), energía libre de activación (ΔG^*) y acoplamiento electrónico ($|H_{DA}|$).

En el límite semiclásico de altas temperaturas, este último factor puede expresarse como:

$$\kappa_n = \exp\left(\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (2)$$

donde λ es la energía de reorganización, ΔG^0 es la fuerza impulsora de la reacción de TE (la energía libre de reacción) y k_B es la constante de Boltzman. El parámetro λ , íntimamente vinculado con la energía libre de activación del proceso (ΔG^*), fue definido por Marcus como la energía necesaria para realizar los cambios estructurales que lleven a los reactivos a la configuración nuclear de equilibrio de los productos pero sin que se produzca la reacción de TE. Este parámetro puede separarse en (al menos) dos componentes o términos aditivos, a saber, $\lambda = \lambda_{in} + \lambda_{out}$. El primero es la energía de reorganización de la esfera interna (λ_{in}), correspondiente a las contribuciones del desplazamiento de la posición de equilibrio ($x_i - x_{i,0}$) de todos los modos normales con constante k_i involucrados en la distorsión de los reactivos hacia la geometría de los productos. Esta contribución puede expresarse como:

$$\lambda_{in} = \sum_i \frac{1}{2} k_i (x_i - x_{i,0})^2 \quad (3)$$

El segundo es la energía de reorganización de esfera externa (λ_{out}), vinculada con la energía necesaria para que el solvente de constante dieléctrica estática (ϵ_s) y óptica (ϵ_{op}) responda ante el cambio en la carga transferida (Δe) entre el donador y aceptor de radios r_D y r_A , respectivamente, separados una distancia r_{DA} . Esta contribución puede expresarse como:

$$\lambda_{out} = \frac{\Delta e^2}{4\pi\epsilon_0} (2r_D^{-1} + 2r_A^{-1} - r_{DA}^{-1}) (\epsilon_s^{-1} + \epsilon_{op}^{-1}) \quad (4)$$

donde ϵ_0 es la permitividad en el vacío. A partir de la ecuación (2) puede apreciarse que cuando $\Delta G^0 = 0$ se cumplirá que $\Delta G^* = \lambda/4$. Por otra parte, puede observarse que el factor κ_n adopta su valor máximo (y también k_{TE} a valores fijos de ν_n y κ_{el}) cuando se cumple que $\lambda = -\Delta G^0$, lo cual impone un límite a la posibilidad de aumentar la velocidad de un proceso redox mediante el aumento de su fuerza impulsora. Aumentos de la fuerza impulsora más allá de esta condición derivan en lo que se conoce como “zona invertida”, donde k_{TE} disminuye a medida que ΔG^0 se torna más negativa^{54,55}.

El coeficiente de transmisión electrónica κ_{el} es una medida de la probabilidad de que se produzca la reacción de TE una vez alcanzada la intersección de las curvas de reactivos y productos. Este factor puede adoptar valores entre 0 y 1, definiendo así el régimen de la reacción de TE: cuando $\kappa_{el} \approx 1$ se dice que la reacción se produce en el régimen adiabático, mientras que si se cumple que $\kappa_{el} \ll 1$ se dice que la reacción es “no adiabática” o “diabática”. En el régimen adiabático, donde la probabilidad de que la reacción ocurra una vez alcanzada la intersección es prácticamente 1, la constante de TE queda definida como:

$$k_{TE} = \nu_n \kappa_n \quad (5)$$

Por otra parte, en el régimen no adiabático el coeficiente κ_{el} es función tanto de la frecuencia de salto del electrón (ν_{el}) en un evento de acceso a la intersección de las curvas de reactivos y productos como de la frecuencia nuclear efectiva (ν_n). Considerando la probabilidad de la reacción de TE en la intersección de dos curvas parabólicas idénticas (P_{TE}), se puede expresar:

$$\kappa_{el} = \frac{2P_{TE}}{1 + P_{TE}} \quad (6)$$

donde:

$$P_{TE} = 1 - e^{-\left(\frac{\nu_{el}}{2\nu_n}\right)} \quad (7)$$

Teniendo en cuenta la condición del régimen no adiabático, es decir que tanto P_{TE} como $v_{el}/2v_n$ adoptan valores muy pequeños, se puede despreciar P_{TE} del divisor en la ecuación (6) y linealizar la ecuación (7), y consecuentemente reexpresarse κ_{el} como:

$$\kappa_{el} = v_{el}/v_n \quad (8)$$

Es decir que en el régimen no adiabático de TE, la constante cinética de TE se puede expresar como:

$$k_{TE} = v_{el}\kappa_n \quad (9)$$

Esto significa que, cuando la probabilidad de que ocurra la TE en la intersección de las curvas es alta, la cinética del proceso depende directamente de la frecuencia con la que los núcleos acceden a tal conformación (ecuación (5)), mientras que cuando dicha probabilidad es muy baja, la velocidad de la reacción se torna a priori independiente de v_n y pasar a depender de v_{el} (ecuación (9)). Este último parámetro se define como:

$$v_{el} = \frac{(2\pi|H_{DA}|)^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \quad (10)$$

donde h es la constante de Plank y $|H_{DA}|$ es el elemento de matriz del acoplamiento electrónico. Este último exhibe una dependencia exponencial con la distancia, que responde a la siguiente expresión:

$$|H_{DA}| = |H_{DA}^0| \exp[-\beta(R_e - R_0)] \quad (11)$$

donde β es un parámetro empírico que depende de la composición del puente que interconecta donador y aceptor, R_e es la distancia que separa donador de aceptor, R_0 es la distancia mínima posible (máximo acoplamiento) y $|H_{DA}^0|$ es el acoplamiento electrónico cuando se cumple que $R_0 = R_e$. Notar que para que se cumpla la condición de régimen no adiabático ($\kappa_{el} \ll 1$), el acoplamiento electrónico debe ser chico. Así, la distancia entre donador y aceptor es determinante para que la reacción se produzca en un régimen u otro. La implicancia experimental inmediata es que, manipulando la distancia entre donador y aceptor es posible controlar la transición entre ambos regímenes. Esto puede hacerse por ejemplo a partir de manipular el grosor de la SAM que separa una proteína adsorbida de la superficie metálica del electrodo, estrategia empleada en la sección 4.2.4. Finalmente, reescribiendo la ecuación (9) a partir las expresiones (2) y (10), se obtiene la expresión semiclásica para k_{TE} según la teoría de Marcus para dos especies en solución (en el régimen no adiabático de TE):

$$k_{TE} = \frac{(2\pi|H_{DA}|)^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left[-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}\right] \quad (12)$$

En esta expresión se pueden observar con claridad los tres parámetros inherentes al sistema que determinan la constante de velocidad de la reacción de TE: ΔG^0 , λ y $|H_{DA}|$.

El primero es un parámetro termodinámico que resulta relativamente sencillo de determinar mediante diversas técnicas experimentales. Los otros dos parámetros, en cambio, no brindan tales facilidades y determinarlos experimentalmente suele representar un desafío. En esta tesis, se llevarán adelante medidas directas del valor de λ , cuya metodología se desarrolla en la sección 4.2.3, y se sacarán conclusiones acerca del acoplamiento electrónico a partir del modelo de Marcus. Sin embargo, se emplearán técnicas electroquímicas para el estudio de la reacción de TE en las enzimas redox, lo cual implica que la reacción se producirá no entre dos sitios redox, sino entre un sitio redox y un electrodo metálico. Se hace entonces necesario el empleo de un modelo extendido de esta teoría, desarrollado por Dogonadze y Kuznetsov, para reacciones de TE heterogénea ⁵³.

Si bien el modelo extendido resulta conceptualmente similar al modelo para reacciones homogéneas, la expresión para la k_{TE} presenta diferencias asociadas a la inclusión de la descripción de los niveles energéticos del electrodo metálico. Ha sido demostrado que la velocidad de TE entre una especie química y electrodo metálico es la suma de las probabilidades parciales de las transiciones electrónicas entre el orbital redox activo (r) de energía ϵ_r de la especie molecular y los estados electrónicos $\{k\}$ de energía $\{\epsilon_k\}$ del electrodo ⁵⁶⁻⁵⁸. Las principales diferencias entre este tratamiento y el modelo anterior son, por un lado, que en los experimentos con electrodos metálicos no existe una única superficie de energía potencial, sino tantas como niveles de energía ϵ_k , y por el otro, que la fuerza impulsora viene dada por el sobrepotencial aplicado al electrodo (ξ). No obstante, la expresión de k_{TE} conserva conceptualmente una forma similar, siendo para el caso de una reacción de TE no adiabática:

$$k_{TE}(\xi) = \frac{1}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\epsilon) \sum_k |h_{rk}|^2 \delta(\epsilon - \epsilon_k) \kappa_n(\xi) d\epsilon \quad (13)$$

y para el caso de una TE adiabática:

$$k_{TE}(\xi) = v_n \kappa_n(\xi) \quad (14)$$

donde $f(\epsilon)$ es la distribución de Fermi-Dirac, h_{rk} es el acoplamiento electrónico entre el orbital r y cada nivel k del metal, $\delta(\epsilon - \epsilon_k)$ es el delta de Dirac para cada energía ϵ_k , definido como la densidad de estados $\rho(\epsilon)$, y ϵ es la variable de integración. La expresión en este caso para el factor de reorganización nuclear o de Franck-Condon es, en esencia, la misma que en fase homogénea, pero donde la fuerza impulsora corresponde al sobrepotencial del electrodo tomando en cuenta los niveles energéticos del metal:

$$\kappa_n(\xi) = \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[\frac{(\lambda - e\xi + \epsilon)}{4\lambda k_B T}\right] d\epsilon \quad (15)$$

Una diferencia fenomenológica que distingue a las reacciones de TE heterogénea sobre metales con las homogéneas es la ausencia de región invertida, como consecuencia de la distribución electrónica continua del metal. A mayor ξ , los niveles por debajo del nivel de Fermi actúan como aceptores dominantes (reacción de reducción), mientras que cuando el nivel de Fermi se encuentra muy por debajo del valor de E^0 , los niveles por encima pueden actuar como aceptores (reacción de oxidación). Así, la dependencia de k_{TE} con ξ presenta una forma sigmoidea, en la que tras alcanzar su valor máximo se vuelve insensible a aumentos en la fuerza impulsora.

Condensando todos los valores $|h_{rk}|$ en un promedio efectivo de acoplamiento electrónico (que por simplicidad será denominado como el acoplamiento en reacciones homogéneas: $|H_{DA}|$) se accede a la expresión conocida como Marcos DoS, utilizada para reacciones de TE heterogénea (en el régimen no adiabático):

$$k_{TE}(\xi) = \frac{|H_{DA}|^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\epsilon) \rho(\epsilon) \exp\left[\frac{(\lambda - e\xi + \epsilon)}{4\lambda k_B T}\right] d\epsilon \quad (16)$$

1.3.2- Obtención electroquímica de parámetros redox: Voltametría cíclica

La electroquímica comprende muchos y muy variados métodos experimentales que permiten acceder a los parámetros termodinámicos y cinéticos de una cupla redox ⁵⁹. De entre todas ellas, a lo largo de esta tesis se utilizó la voltametría cíclica (VC) como técnica preferencial para los experimentos electroquímicos. Para el desarrollo de esta técnica es necesario emplear una celda electroquímica de 3 electrodos: un electrodo de trabajo (W), otro de referencia (R) y un tercero denominado contraelectrodo (C) empleado para cerrar el circuito (figura 1-9). Este tipo de diseños permite variar arbitrariamente el potencial entre el electrodo W y el electrodo R, que serán de oro (y recubierto con alguna SAM) y de Ag/AgCl (KCl 3,5M) a lo largo de la tesis, respectivamente ^{60,61}. El electrodo W es el que participa en la reacción de transferencia de carga con el sitio redox de la metaloproteína, actuando como aceptor y donador de electrones a lo largo de la voltametría. Su potencial se encuentra determinado en relación al electrodo R, que actúa como una hemicelda con un potencial de reducción conocido por el cual no circula corriente, siendo su función la de medir y controlar el potencial del electrodo W. El circuito eléctrico es cerrado por el contraelectrodo C, a través de cual circula toda la corriente necesaria para balancear el flujo de electrones del electrodo W. Para producir dicha corriente, el contraelectrodo alcanzará potenciales extremos de modo de oxidar o reducir cualquier molécula en su entorno, ya sean moléculas de solvente, del *buffer* o del electrolito soporte.

La muestra proteica puede estar adsorbida sobre la SAM del electrodo W, en cuyo caso la técnica se denomina VC de *film* proteico (especies adsorbidas), o bien puede

estar disuelta en la solución. Si bien la respuesta electroquímica obtenida en las dos condiciones experimentales es diferente, la perturbación impuesta es la misma. Se aplica una rampa de potencial que comienza en un valor inicial (generalmente el más oxidante de la rampa), llega a un potencial de retorno en el cual se revierte el sentido del barrido (generalmente el más reductor), y finalmente se alcanza el potencial final que típicamente es igual al inicial (figura 1-10 A). La velocidad de barrido (v), medida en V/s, es constante a lo largo de la voltametría, y su variación permite producir la transición entre los regímenes reversibles, cuasirreversibles e irreversibles de la cupla redox. Esta transición depende de la relación entre la velocidad de barrido y el valor de k_{TE} , de modo que cuando se cumpla que $v \ll k_{TE}$, la reacción ocurre reversiblemente, mientras que procede de manera irreversible cuando $v \gg k_{TE}$.

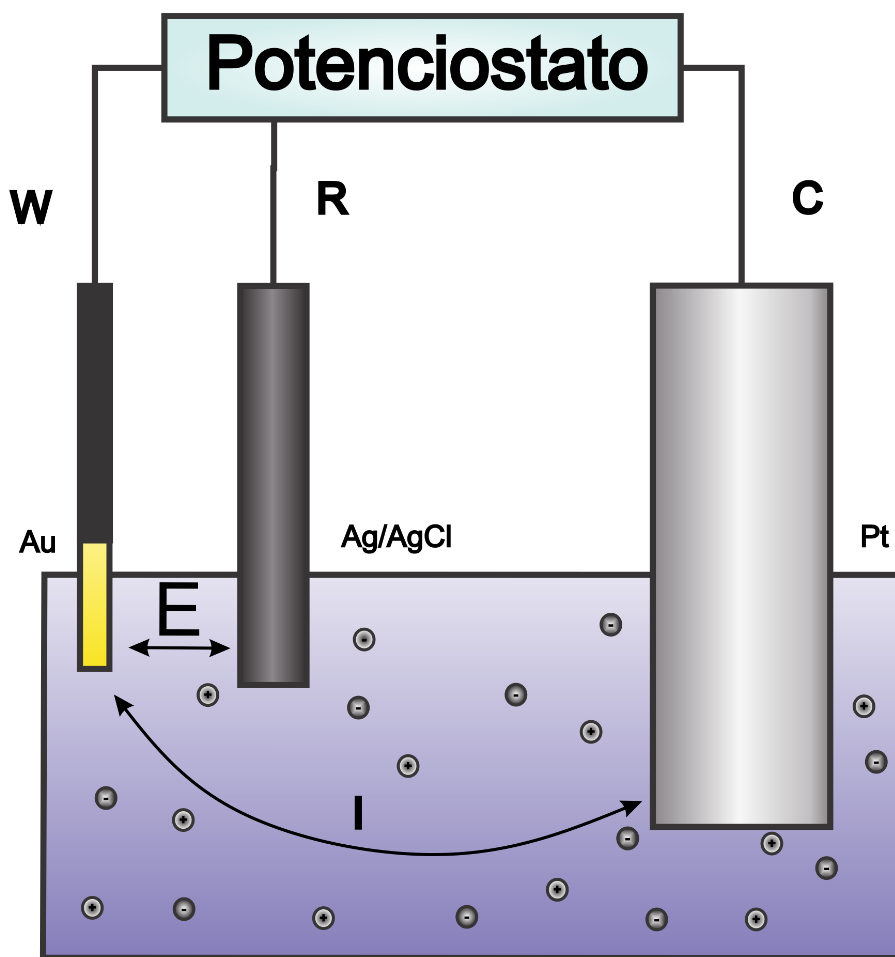


Figura 1-9. Celda electroquímica de 3 electrodos en una solución de medida con electrolito soporte. En el electrodo de trabajo (W) es donde ocurre la reacción de TE de interés, y el potencial es regulado a partir del electrodo de referencia (R). El contraelectrodo (C) cierra el circuito, generando una corriente de igual magnitud y signo opuesto a la que tiene lugar en el electrodo W.

Tanto para especies adsorbidas como para especies en solución, la desviación de la idealidad se refleja en la distancia entre los potenciales de pico catódico ($E_{p,c}$) y anódico ($E_{p,a}$). Idealmente, esta diferencia entre ambos potenciales (ΔE_p) debería ser de 0 mV en para especies adsorbidas y 57 mV para una transferencia monoelectrónica de especies en solución (figura 1-10 B y C). La diferencia en las curvas entre ambos métodos proviene de la contribución difusional a la corriente en el caso de especies en solución, que puede razonarse en términos de los perfiles de concentración generados en las inmediaciones del electrodo W durante la voltametría (figura 1-10 D). Para especies en solución, luego de alcanzar el valor máximo de pico la corriente faradaica nunca se extingue, debido a que el proceso difusional constantemente renueva la cantidad de moléculas que sufren la reacción redox sobre el plano del electrodo, fenómeno ausente en el caso de especies adsorbidas.

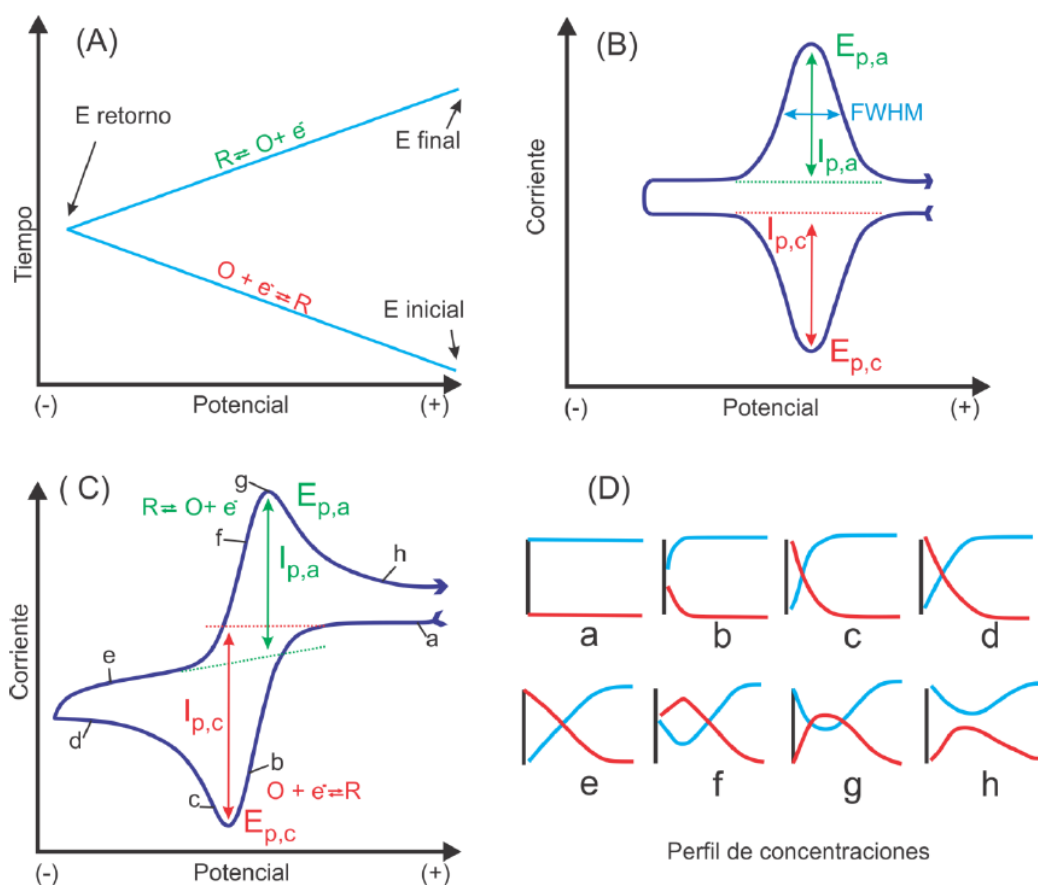


Figura 1-10. (A) Rampa de potencial en función del tiempo aplicada para la realización de un experimento de voltametría cíclica. (B) Representación esquemática de un voltograma para especies adsorbidas, donde se indican los potenciales de pico catódico y anódico, al igual que las corrientes. (C) Representación esquemática de un voltograma para especies en solución. Las diferencias con el experimento ejemplificado en (B) provienen de la contribución difusional a la variación de la concentración de las especies oxidadas y reducidas sobre la superficie del electrodo, como se ejemplifica en (D) para las especies oxidadas (celeste) y reducido (rojo).

Los voltagramas contienen una gran cantidad de información acerca del sistema medido, como será desarrollado a continuación. Sin dudas, los parámetros más utilizados de un voltograma son los valores de E_{pc} y E_{pa} , ya que a partir de su promedio ($E_{1/2}$) se estima típicamente el valor del potencial redox (E^0). Esta aproximación es válida en tanto que las especies redox no participen en reacciones secundarias luego de aceptar o donar el electrón y, en el caso de especies en solución, que los coeficientes de difusión para ambas formas redox sean similares. A lo largo de la tesis, se empleará siempre este método para la determinación del E^0 a partir de un voltograma:

$$E^0 \approx E_{1/2} = \frac{1}{2}(E_{pc} + E_{pa}) \quad (17)$$

Otro parámetro con valor informativo de un voltograma es la corriente en el máximo de pico (I_p) tanto anódico (I_{pa}) como catódico (I_{pc}), que idealmente son iguales en modulo y de signo opuesto. El valor de I_p puede ser predicho analíticamente en función de parámetros accesibles, no obstante, las diferencias entre ambas condiciones experimentales de la muestra (en solución y adsorbida) conlleva diferencias en las expresiones que predicen el comportamiento electroquímico del sistema. Para el caso de especies en solución, I_p responde a la siguiente ecuación:

$$I_p = \chi nFA[C] \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad (18)$$

donde n es el número de electrones que se transfiere por reacción y por molécula (y vale 1 para sitios T1 y Cu_A), F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo W, $[C]$ es la concentración de la muestra en la solución sobre el electrodo, D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, R es la constante universal de los gases y χ es un factor que depende de la respuesta electroquímica del sistema y adquiere típicamente el valor de 0,4463 para una respuesta reversible. Por otra parte, en el caso de especies adsorbidas sobre el electrodo W, I_p responde a una expresión diferente:

$$I_p = \frac{(nF)^2 v A \Gamma_0}{RT} \quad (19)$$

donde Γ_0 es la concentración superficial de la especie adsorbida sobre el electrodo W. Notar que las expresiones (16) y (17) difieren en la dependencia con I_p con la velocidad de barrido: mientras que para especies en solución se cumple $I_p \propto v^{1/2}$, cuando las especies están adsorbidas la proporcionalidad es directa, $I_p \propto v$. Esto representa una característica distintiva de ambas situaciones, y se utiliza para descartar ciertas anomalías. Por ejemplo, desvíos de la correspondiente proporcionalidad para medidas sobre especies en solución pueden ser indicio de la adsorción inespecífica de la muestra sobre el electrodo W, obteniendo una señal compuesta tanto de moléculas adsorbidas

como de moléculas disueltas. Por otro lado, medidas de especies adsorbidas que se desvíen de la relación $I_p \propto \nu$ pueden estar indicando desorción de la muestra o fenómenos de difusión lateral o reorientación.

Otro parámetro relevante, especialmente en el estudio de especies adsorbidas, es el ancho a la altura media de pico (FWHM), es decir, el ΔE para los valores de corriente que cumplen $I = I_p/2$ en cada pico. En el caso de una reacción reversible, el valor de dicho parámetro a 25 °C y $n = 1$ es de 90,6 mV, y desviaciones de este valor son un indicador de la no idealidad de la reacción de TE. Este parámetro, al igual que ΔE_p e I_p , aumenta a velocidades de barrido muy altas, dado el alejamiento de las condiciones de reversibilidad de la reacción de TE. Un elemento a destacar es la existencia de formalismos y tratamientos matemáticos mediante los cuales es posible obtener el valor de k_{TE} a partir de la dependencia de ΔE_p con ν , parámetros que no están vinculados analíticamente en una relación biunívoca. Este tipo de información es de gran utilidad, no sólo por el valor de la constante obtenida en sí misma, sino porque ofrece la posibilidad de acceder a parámetros de activación, en particular a λ . Las estrategias de medición y los formalismos empleados para tales fines serán comentados en el capítulo 2 y desarrollados en detalle en la sección 4.2.3. También es posible discriminar entre las contribuciones entálpica y entrópica (ΔH^0 y ΔS^0 , respectivamente) del valor de E^0 para una cupla redox, y el detalle del tratamiento de datos que implica será desarrollado en la sección 3.2.4.

En suma, empleando la técnica de VC es posible obtener información valiosa sobre el sistema de estudio a partir de la selección adecuada de condiciones experimentales (como el control de la composición de las SAMs y de la solución de medida, de ν , de T , etc.) y del empleo de distintos tratamientos para el análisis de los resultados. Así, esta técnica permite obtener valores tanto de los parámetros termodinámicos (E^0 , ΔH^0 y ΔS^0) como cinéticos (k_{TE} y λ) de la reacción de TE.

1.4- Técnicas espectroscópicas y auxiliares

Diversas técnicas espectroscópicas han sido utilizadas a lo largo de toda la tesis, complementando los resultados electroquímicos y permitiendo un abordaje más completo de los sistemas estudiados. Estas técnicas sacan ventaja de distintos fenómenos físicos contribuyendo así a monitorear detalladamente las características geométricas y la descripción electrónica de los sitios de Cu_A y T1⁶². A continuación, se desarrollan brevemente los fundamentos básicos de las principales técnicas espectroscópicas utilizadas a lo largo de los tres capítulos experimentales.

1.4.1- Espectroscopia de absorción electrónica: UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis es sin lugar a dudas la técnica espectroscópica más difundida en la actualidad, probablemente como consecuencia de combinar sencillez, sensibilidad y bajo costo ⁶². Esta técnica se basa en la excitación de los electrones de las capas externas de las moléculas y, como consecuencia, brinda información sobre la estructura electrónica de las muestras. El principio de Franck-Condon establece que una transición electrónica ocurre a una velocidad tal que se encuentra, en principio, desacoplada de los movimientos nucleares, de modo que esta espectroscopia no brinda información de tipo vibracional. El espectro UV-Vis de una biomolécula hace las veces de huella dactilar, y suele usarse tanto para su identificación como para el monitoreo de procesos que la modifiquen (degradación, transiciones, cambios de coordinación, etc.). Así, es una técnica valiosa tanto para la identificación y estudio de una muestra, como para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen cromóforos ⁶².

En el caso de centros metálicos se pueden agrupar tres tipos de transiciones, cuya energía está generalmente contenida en la región que permite monitorear esta técnica, en función de los orbitales involucrados: transiciones que involucran electrones π , σ (enlazantes y/o antienlazantes) y/o n ; transiciones que involucran transferencia de carga (metal $\rightarrow$ ligando o ligando $\rightarrow$ metal) y transiciones entre niveles d o f ⁶³ (figura 1-11). En el primer caso, las energías de los diferentes tipos de orbitales moleculares suelen diferir significativamente, por lo que son transiciones que se ubican típicamente en la región del UV o más energética aún. Son posibles cuatro tipos de transiciones, en orden descendente de energía: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. Por otra parte, los últimos dos casos cobran especial relevancia para el caso de sitios activos de metaloproteínas (cromóforos), en donde el metal de transición presenta transiciones internas entre orbitales d ($d \rightarrow d$) y transiciones de transferencia de carga ligando metal (TCLM) con los ligandos coordinantes de la proteína ⁶² (figura 1-11).

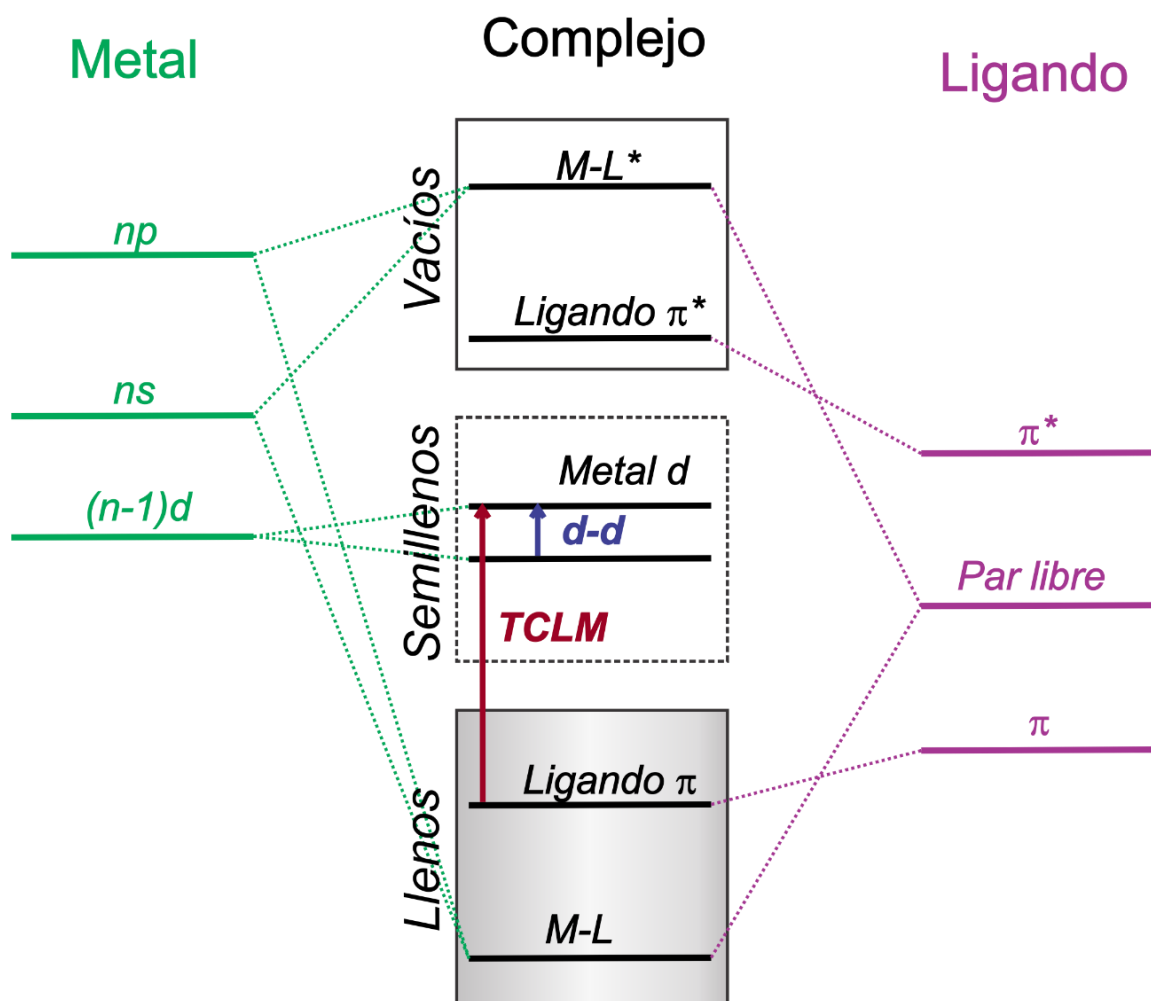


Figura 1-11. Diagrama de orbitales moleculares de un complejo de metal de transición (como los sitios de cobre) a modo de ejemplo. Se destacan las transiciones de TCLM (bordó) y d-d (azul oscuro), con diferencias de energía típicamente dentro del rango UV-Vis.

La mayoría de los iones de los metales de transición absorben en la región ultravioleta o visible del espectro electromagnético ¹. Desde un punto de vista biológico, lo más relevante es la absorción por elementos de la primera y segunda serie de metales de transición, en los que los electrones responsables corresponden a orbitales 3d y 4d. La diferencia de energía entre los distintos orbitales d del mismo nivel se puede describir a partir del efecto de campo ligando que ejerce el entorno químico del átomo (o ion) metálico, ya sea el solvente si está libre, o los ligandos si forma un complejo inorgánico o un sitio activo en una metaloproteína (figura 1-12). Básicamente, este efecto resulta de las fuerzas diferenciales de repulsión electrostática entre el par de electrones del dador y los electrones de los diversos orbitales d del ion metálico central. La diferencia de energía entre los orbitales d desdoblados por este campo ligando determina lo que se denomina fuerza del campo ligando. Será de especial interés el campo ligando

octaédrico en el capítulo 5, donde se introduce el modelo de distorsión acoplada propuesto por Solomon para la racionalización de las características espectroscópicas de sitios T1 en función de sus propiedades estructurales ^{8,64,65}. Cabe comentar que, típicamente, las transiciones $d \rightarrow d$ en los distintos sitios de cobre reportados se ubican en las regiones menos energéticas del espectro UV-Vis, y con bajas intensidades debido a que son transiciones prohibidas por la regla de Laporte ⁶³.

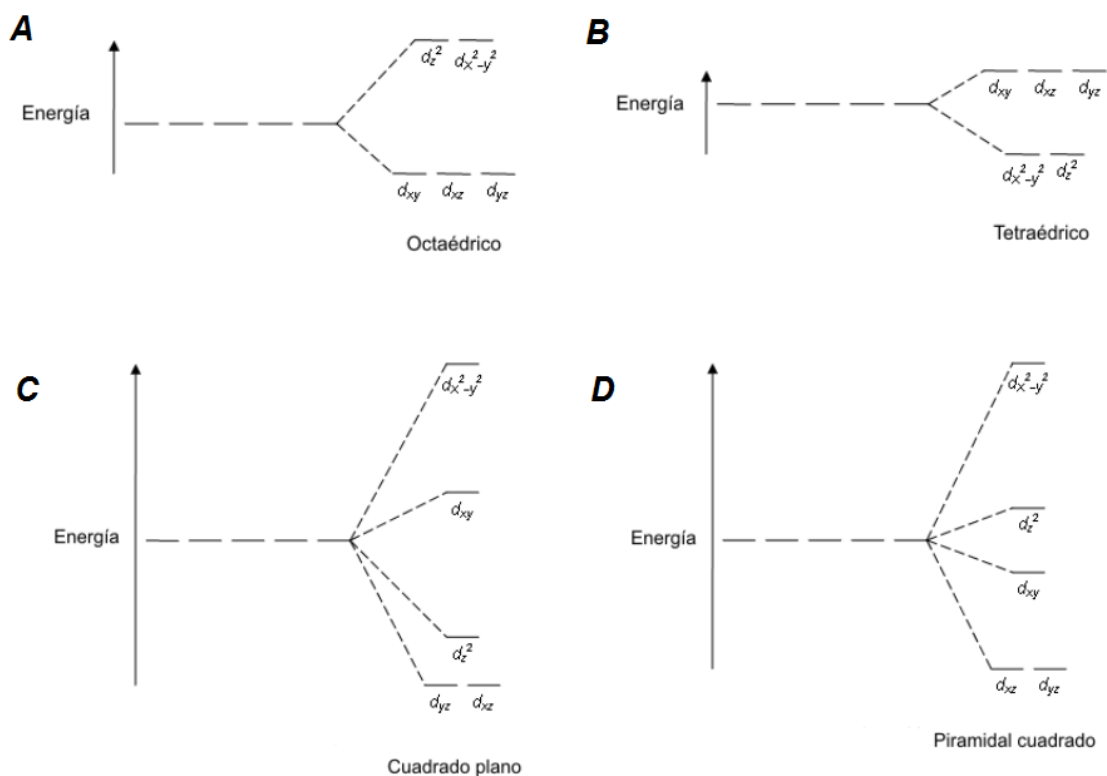


Figura 1-12. Ejemplos de diagramas de separación de orbitales en un campo ligando octaédrico (A), tetraédrico (B), cuadrado plano (C) y piramidal cuadrado (D). El caso del campo ligando octaédrico será de particular interés en la introducción del capítulo 5 para la descripción de sitios T1.

Por otra parte, para que un complejo o un sitio redox presente una banda de TCLM en su espectro UV-Vis, es necesario que uno de sus componentes tenga características de dador de electrones y el otro componente tenga propiedades de aceptor de electrones. La absorción de la radiación implica entonces la transferencia de un electrón desde el dador hasta un orbital que está muy asociado con el aceptor ⁶³. Por esta razón, el estado excitado puede considerarse como el producto de un tipo de proceso redox interno. Tal comportamiento difiere del de cualquier cromóforo orgánico (sin átomos metálicos), donde el electrón en el estado excitado está en un orbital molecular formado

por dos o más átomos. Las especies que presentan absorción por transferencia de carga tienen particular importancia en cuanto a los fines analíticos, ya que las absorptividades molares suelen ser altas. Posiblemente el ejemplo más destacado de esto en metaloproteínas es la banda de Soret en la hemoproteína Cyt c, proveniente de la porfirina, cuya absorptividad molar es del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁶⁶. Las bandas correspondientes a estas transiciones, en comparación a las bandas d→d, se encuentran típicamente en regiones más energéticas del espectro UV-Vis (hacia el violeta) y presentan una mayor absorptividad molar, dado que responden a transiciones permitidas ⁶⁷. Tanto las transiciones d→d como las de TCLM están directamente vinculadas con la configuración electrónica del sitio redox y con su geometría (ambas propiedades estrechamente vinculadas), por lo que la espectroscopia UV-Vis será de capital importancia a lo largo de esta tesis.

1.4.2- Espectroscopia de dispersión Raman resonante (RR)

El fenómeno de dispersión Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz monocromática, generalmente proveniente de un láser, ya sea del espectro visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano. Este fenómeno ha sido aprovechado en el desarrollo de una variedad de técnicas espectroscópicas que permiten el estudio de modos de baja frecuencia de un sistema, a saber, rotacionales y vibracionales ^{62,68} (en esta tesis, dado que se trabaja con macromoléculas en solución, sólo resulta relevante la componente vibracional). Básicamente, el efecto Raman ocurre cuando la radiación electromagnética incide sobre una molécula e interactúa con su densidad electrónica polarizable. Esta perturbación puede racionalizarse en términos de un estado virtual que se puebla previo a la dispersión inelástica de un fotón. El fotón resultante de esta dispersión puede tener mayor (anti-Stokes) o menor (Stokes) energía que el fotón incidente y como consecuencia de este proceso la molécula se encontrará en un estado vibracional distinto del de partida (Figura 1-13). La diferencia en energía entre el estado inicial de la molécula y el estado resultante de la dispersión de luz da lugar a un corrimiento en frecuencia del fotón emitido respecto de la frecuencia de excitación ⁶⁹.

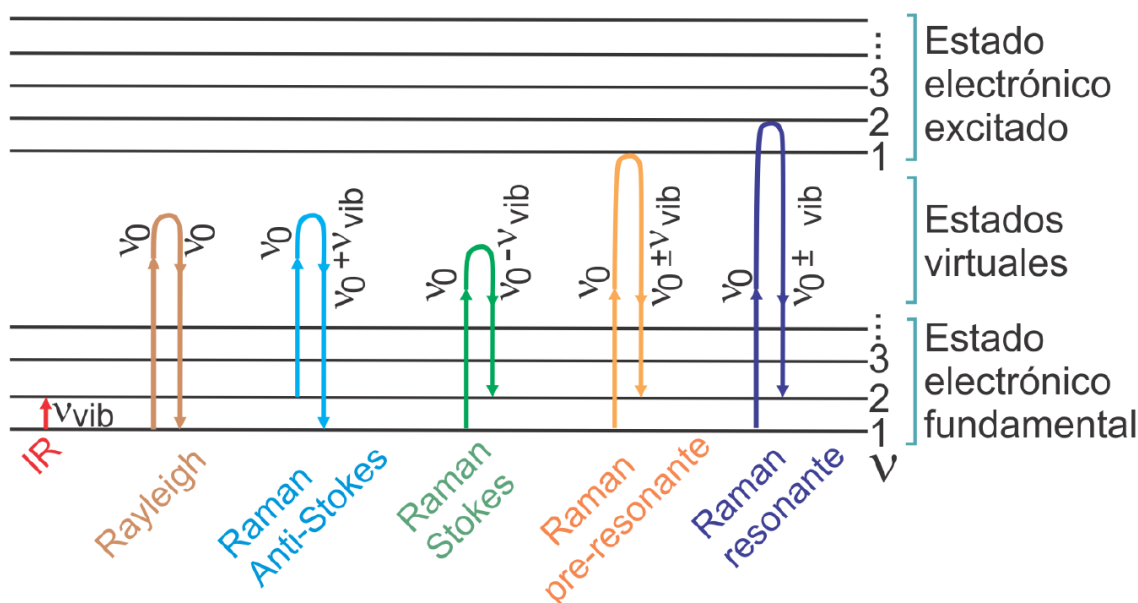


Figura 1-13. Representación de diversos estados electrónicos con sus correspondientes estados vibracionales, y de los estados virtuales. El fenómeno de absorción IR involucra la absorción de un cuanto equivalente a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales. Los diferentes fenómenos dispersivos se clasifican dependiendo de la energía de la radiación dispersada en relación a la radiación incidente ν_0 . La radiación dispersada de menor longitud de onda presenta un corrimiento anti-Stokes, mientras que la de mayor longitud de onda presenta un corrimiento Stokes. A su vez, dependiendo de la magnitud de ν_0 en relación con la energía necesaria para promover una transición electrónica, se puede trabajar en condiciones de pre-resonancia o resonancia.

La intensidad total de luz dispersada resulta proporcional a la polarizabilidad de la molécula según la expresión:

$$I_D = I_0 \nu_0^4 \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{IF}|^2 \quad (18)$$

donde ν_0 es la frecuencia del láser y $(\alpha_{\rho\sigma})_{IF}$ agrupa a los elementos de la matriz de polarizabilidad de la transición entre el estado inicial (I) y final (F) referidos al sistema de coordenadas de la radiación incidente (ρ) y la dispersada (σ)⁷⁰. Cada uno de los elementos de matriz del tensor polarizabilidad puede ser calculado a partir de los momentos de la transición entre los distintos estados de la molécula. A este desarrollo se lo denomina teoría de la dispersión, la cual involucra la suma sobre distintas perturbaciones de segundo orden⁷¹. Un aspecto importante es que, a diferencia de la espectroscopia de absorción en la que magnitud de la señal es proporcional al momento de la transición, la intensidad de una señal Raman depende del producto de entre los

momentos de transición ⁷⁰. Esto da lugar al llamado “principio de exclusión mutua”, que indica que para moléculas centro-simétricas, aquellos modos que son visibles en espectroscopia IR (cambio del momento dipolar) son invisibles en Raman (cambio de la polarizabilidad) y viceversa. (figura 1-14). Esto implica que las transiciones que dan lugar al efecto Raman serán las descritas por una perturbación nuclear totalmente simétrica con la distorsión en la nube electrónica ^{69,70}.

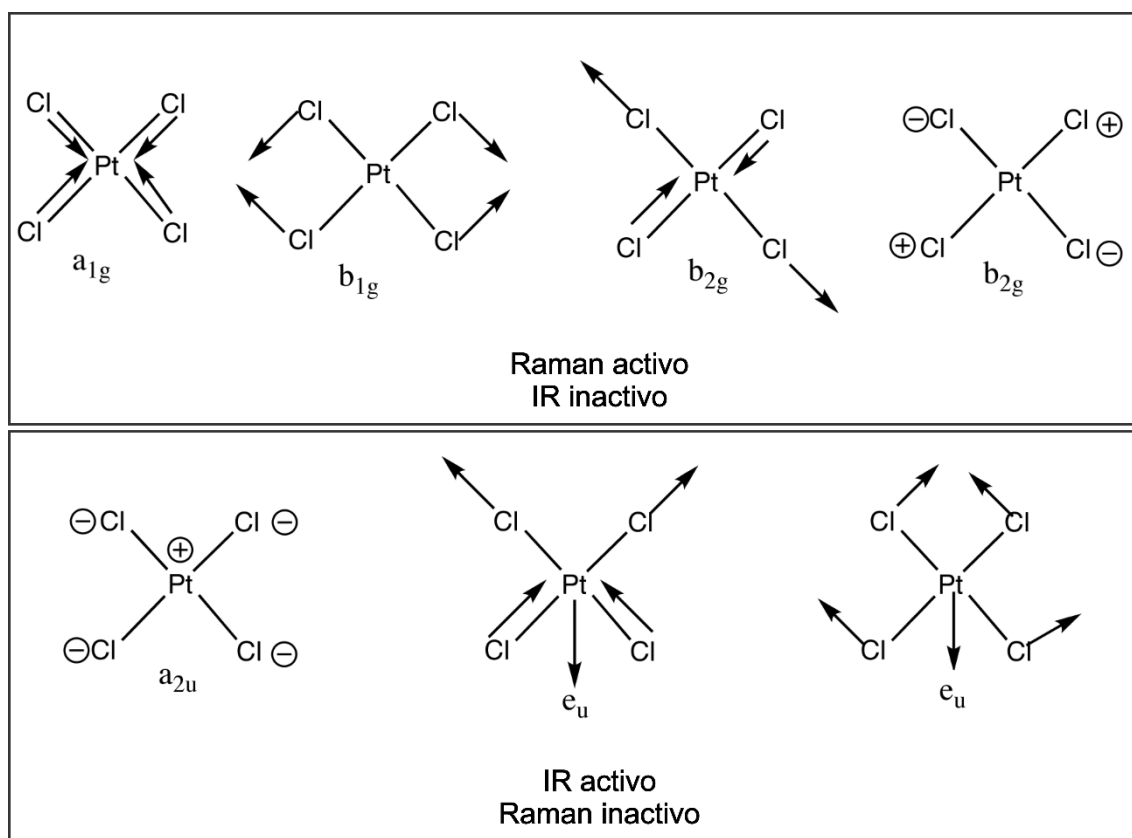


Figura 1-14. Modos vibracionales del PtCl_4 , un sistema centro-simétrico (D_{4h}). En la fila superior se presentan los modos Raman activos e IR inactivos, mientras que en la fila inferior se presentan los IR activos y Raman inactivos. Los modos e_u son doblemente degenerados.

Si bien el fenómeno de dispersión Raman es conceptualmente el mismo independientemente de la energía del fotón inelásticamente dispersado, existen algunas diferencias importantes en función de dicha energía, que permiten el desarrollo de poderosas técnicas espectroscópicas. Cuando la energía de la luz incidente es mucho menor que la necesaria para acceder un nivel electrónico excitado se dice que la transición (en este caso a un estado virtual) es no resonante, si es cercana se la denomina pre-resonante, y si permite tal transición se llama resonante (Figura 1-13). La

intensidad de la respuesta Raman no resonante es muy baja; de hecho, la dispersión Rayleigh es la dominante mientras que la dispersión Raman involucra uno de cada 10^6 fotones dispersados aproximadamente. Por su parte, en condiciones de resonancia las intensidades Raman del cromóforo son selectivamente intensificadas en hasta cinco órdenes de magnitud ^{68,69}. Esto implica una ventaja importante respecto de otras técnicas estructurales aplicadas a proteínas con cofactores, ya que si el cofactor es un cromóforo puede medirse selectivamente su espectro vibracional, sin interferencias del resto de la muestra. De esta forma, las bandas vibracionales estudiadas mediante espectroscopia Raman resonante (RR) reflejan de forma directa la estructura a nivel del sitio activo de donde se encuentra el cofactor.

Como se presentó en la sección 1.2.1, los sitios de cobre estudiados en esta tesis (Cu_A y T1) cuentan con una o dos cisteínas en su coordinación, presentando en sus espectros UV-Vis una o dos TCLM entre la/s cisteína/s el el/los átomo/s de cobre ²¹. En estos sistemas, la espectroscopia RR resulta una poderosa herramienta que permite interrogar selectivamente al sitio redox, obteniendo información de sus modos normales, que a su vez permite evaluar indirectamente algunos aspectos de su estructura electrónica (como será discutido en cada caso particular).

1.4.3- Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica que permite interrogar especies paramagnéticas a partir de su interacción electrónica con un campo magnético externo. A priori, es una técnica aplicable a cualquier especie con al menos un electrón desapareado, tales como radicales libres, tripletes o complejos que contengan metales de transición. Este último caso resulta de especial interés en el estudio de sitios redox de metaloproteínas, ya que un espectro EPR es capaz de brindar información acerca del detalle de la descripción electrónica y la geometría de un sitio redox paramagnético, como es el caso de los sitios de cobre Cu_A y T1 en sus formas oxidadas ⁶². El fundamento del EPR radica en la interacción entre el momento magnético electrónico de una especie ($\mu_e = -g\beta_e S$) y un campo magnético externo (B), que responde a la siguiente ecuación:

$$E = g\beta_e SB \quad (19)$$

donde E es el cambio de energía del electrón que interactúa con el campo magnético aplicado de intensidad B , g es el factor de desdoblamiento cuyo valor se ubica en torno a 2, β_e es el magnetón de Bohr para un electrón (cuyo valor es $9,274 \cdot 10^{-21} \text{ erg G}^{-1}$) y S es el espín electrónico total de la especie. En consecuencia, un electrón que interactúa con un campo magnético externo puede verse estabilizado o desestabilizado, en función de la proyección de S sobre B (ambas magnitudes vectoriales). Así, para una especie de $S = 1/2$ (único caso relevante en esta tesis), la diferencia de energía entre los niveles

desdoblados por el campo magnético equivale a $\Delta E = g\beta_e B$, lo cual implica una proporción de aproximadamente 0,1% más electrones en el nivel “estabilizado” respecto del nivel “desestabilizado”, para valores de B típicos (entre 0,1 y 1 T) a temperatura ambiente. La medición de un espectro EPR implica poblar el estado más energético, para lo cual se aplican microondas que deben cumplir la denominada condición de resonancia:

$$h\nu = g\beta_e B \quad (20)$$

donde $h\nu$ corresponde a un cuanto energético, siendo h la constante de Planck y ν la frecuencia, en este caso, del campo magnético oscilante aplicado para la medición. Así, cuanto mayor sea la desproporción de población entre los estados desdoblados, mayor será la absorción del cuanto energético, lo cual indica (según la ley de Boltzman) que la sensibilidad de la técnica aumenta a bajas temperaturas. La ecuación (20) deja en evidencia que ΔE depende tanto de B como de ν , siendo a priori posible obtener un espectro EPR variando cualquiera de los dos y dejando el otro constante. Sin embargo, las dificultades experimentales que implican la variación de ν han hecho de esta una configuración experimental no utilizada, por lo que las medidas EPR constan típicamente del barrido de un determinado rango de valores de B con ν constante ⁷² (figura 1-15). Si bien los valores de B y ν utilizados en los experimentos EPR dependen de cada particular, típicamente se encuentran entre 0,1 y 1 T y en torno a los 9GHz (conocido como banda X), respectivamente, para metaloproteínas.

El factor g , cuyo valor es básicamente el parámetro que permite evaluar un espectro EPR, fue introducido inicialmente en la expresión de μ para “corregir” la discrepancia entre el espín magnético que predice la teoría clásica y el medido experimentalmente (aproximadamente el doble). Para un electrón libre, su valor exacto es $g = 2,0023$, pero esta magnitud no sólo resulta sensible al detalle estructural y a distintas interacciones, sino que es altamente anisotrópica. Esta cualidad, consecuencia directa de la interacción espín-orbita, hace del factor g un tensor de nueve componentes, que para los casos de interés biológico pueden convertirse en tres componentes rotando el sistema de coordenadas cartesianas.

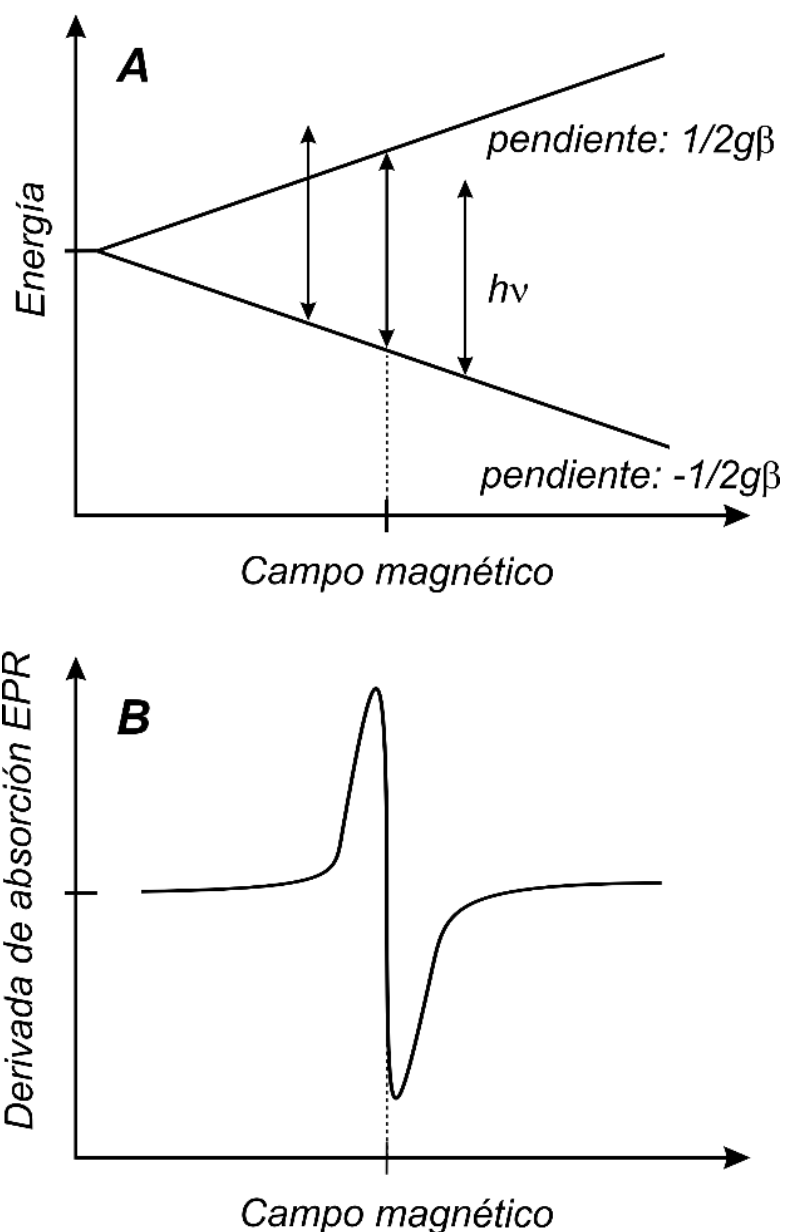


Figura 1-15. (A) Desdoblamiento energético del electrón de $S=1/2$ por su interacción con el campo magnético aplicado. La doble flecha vertical indica el cuanto energético de las microondas, que cumple la condición de resonancia para un único valor de B . (B) Respuesta EPR (primera derivada, como suele presentarse) para el sistema presentado en (A).

Así, utilizando el denominado sistema de coordenadas principales se definen los tres valores principales de respuesta, a saber, g_x , g_y y g_z , que para una molécula en solución (donde no existe a priori ninguna orientación preferencial) responden a la siguiente expresión:

$$g\theta_\varphi = \sqrt{g_x^2 \cos^2(\varphi) \sin^2(\theta) + g_y^2 \sin^2(\varphi) \sin^2(\theta) + g_z^2 \cos^2(\theta)} \quad (21)$$

donde θ y φ son los ángulos polar y azimutal, respectivamente, entre el eje principal del tensor g y la dirección de B . Los valores g_x , g_y y g_z responden entonces a las proyecciones de B en el tensor g y la proporción de moléculas asociadas a cada orientación posible es proporcional al ángulo θ . Típicamente, la ecuación (21) se resuelve de manera numérica para simular un espectro EPR y, a partir de un ajuste iterativo respecto de un espectro experimental, obtener los valores de g_x , g_y y g_z . Los resultados posibles de tales ajustes pueden ser discriminados en cuatro grupos distintos: $g_x = g_y = g_z$ (respuesta isotrópica), $g_x = g_y < g_z$ (respuesta axial prolato), $g_x = g_y > g_z$ (respuesta axial oblato) y $g_x \neq g_y \neq g_z$ (respuesta rómbica). A los fines de esta tesis, de los tres casos anisotrópicos será especialmente considerado el axial prolato (a partir de ahora sólo axial), ya que es el tipo de respuesta observada para los sitios activos de cupredoxinas en sus formas oxidadas ⁶⁷ (figura 1-16). Típicamente, en sistemas axiales se denomina $g_{\parallel}$ al valor de g_z y $g_{\perp}$ al valor de g_x y g_y .

Hasta aquí, el efecto de la geometría de un sitio redox sobre los valores principales del factor g se ve reflejado en las características de su espectro EPR, no obstante, existe otro fenómeno relevante para cupredoxinas que afecta su espectro EPR (pero sin alterar los valores del factor g): el acoplamiento hiperfino. Cuando el electrón desapareado interactúa con el campo magnético de un núcleo (B_N) con espín no nulo ($I \neq 0$), además del campo aplicado B , su respuesta se desdobra en $0,5 I + 1$ frecuencias. Para el caso particular del núcleo de cobre ($I = 3/2$), el acoplamiento hiperfino genera un desdoblamiento de la señal EPR en cuatro señales de igual intensidad (siete señales para el sitio binuclear de Cu_A), con un espaciado energético que responde a la constante de acoplamiento hiperfino (A), parámetro que también resulta del ajuste de los datos experimentales (figura 1-16). Cabe mencionar que, aunque en algunos casos la estructura hiperfina del espectro EPR no pueda ser resuelta, los valores g_x , g_y y g_z (que contienen la información estructural más valiosa) pueden obtenerse con gran precisión.

En esta tesis, se emplearán los espectros EPR de distintas variantes de sitios de Cu_A y T1 principalmente para evaluar su integridad estructural y la conservación de las características distintivas en mutantes de primera esfera de coordinación, de segunda esfera y de la matriz proteica. En este sentido, el EPR resulta una técnica útil, y los valores del factor g excelentes diagnósticos que, combinados con otras técnicas, permiten validar los sistemas generados a partir de diversas técnicas mutagénicas.

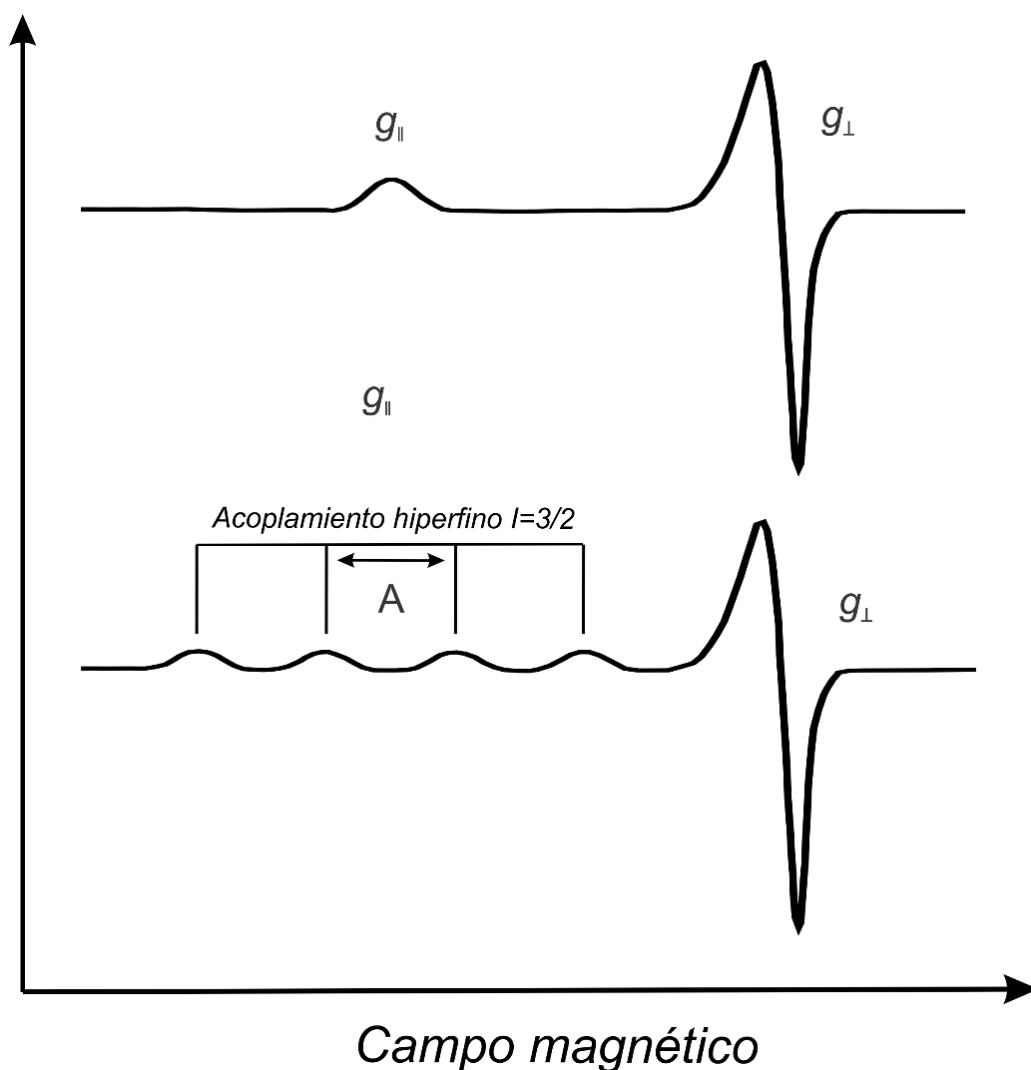


Figura 1-16. Espectros calculados para una respuesta axial sin (arriba) y con (abajo) acoplamiento hiperfino a un núcleo de espín 3/2, como el caso del átomo de cobre.

1.4.4- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) paramagnética

La resonancia magnética nuclear es una herramienta muy versátil en el estudio estructural y dinámico de biomoléculas, y ha sido empleada tanto en sistemas diamagnéticos como paramagnéticos. El principio fundamental de la técnica para ambos casos es el mismo, aunque en el segundo es imprescindible la consideración del momento magnético electrónico μ_e ⁶² (unas 658 veces mayor que el protónico). En cualquier caso, el RMN puede pensarse como la contracara nuclear del EPR, ya que se basa en el fenómeno de interacción entre el momento magnético de los núcleos atómicos de una especie ($\mu_N = -g_N\beta_N I$) y un campo magnético externo, que responde a la siguiente ecuación:

$$E = g_N\beta_N IB \quad (22)$$

donde E es el cambio de energía del núcleo que interactúa con el campo magnético aplicado de intensidad B , g_N es el factor de desdoblamiento nuclear, β_e es el magnetón de Bohr el núcleo medido e I es su espín. Esta ecuación se expresa a veces en términos de la constante giromagnética nuclear ($\gamma_N = g_N\beta_N/\hbar$) y resulta análoga a la ecuación (19) como consecuencia de responder al análogo nuclear del fenómeno EPR. Así, un núcleo que interactúa con un campo magnético externo puede verse estabilizado o desestabilizado y la diferencia de energía entre los niveles desdoblados por el campo magnético equivale a $\Delta E = g\beta_N IB$, lo cual impone también condiciones de resonancia para la radiofrecuencia de medida aplicada a partir de $\Delta E = h\nu$ (figura 1-17). Cabe destacar que, mientras los valores de ν en las medidas EPR corresponden típicamente al IR, en el caso del RMN se encuentran en la región de las ondas de radio, dado los bajos valores de ΔE .

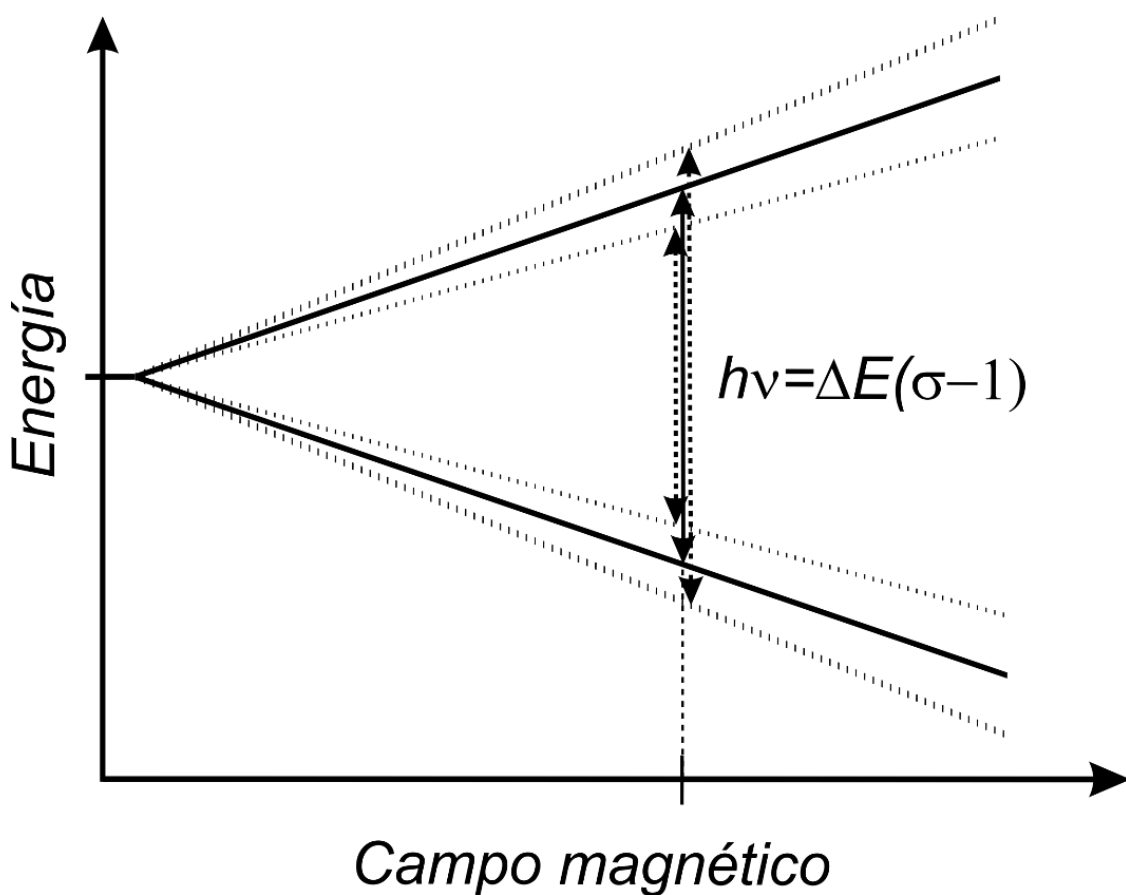


Figura 1-17. Desdoblamiento energético del núcleo resonante por su interacción con el campo magnético aplicado. La doble flecha vertical indica el cuanto energético del campo magnético de medida y las flechas punteadas (desplazadas lateralmente para que el diagrama sea claro) marcan el cambio de magnitud de $h\nu$ por efectos de protección y desprotección (consecuencia de la densidad electrónica) que producen los desplazamientos químicos. Estos desplazamientos se ven modificados y fuertemente intensificados en especies paramagnéticas.

El desplazamiento químico (δ) es la propiedad más informativa en un espectro RMN, dado que depende del entorno electrónico de cada núcleo, brindando así información estructural muy detallada. La ecuación (22) se completa típicamente con un término $(1 - \sigma)$ donde σ es la constante de apantallamiento que da cuenta de este fenómeno (figura 1-17). Esto es válido para especies paramagnéticas, pero dada la magnitud de μ_e el efecto resulta mucho mayor, amplificándose más de un orden de magnitud. Por ejemplo, los valores de δ típicos de los protones piridínicos, inferiores a los 10 ppm, resultan superiores a los 100 ppm cuando estas especies forman parte de complejos paramagnéticos⁷³. Esta amplificación es consecuencia de dos fenómenos: el contacto de Fermi, dado por la interacción del espín desapareado deslocalizado a lo largo de los enlaces químicos con los núcleos (acoplamiento hiperfino), y la interacción dipolar, que no es otra cosa que la interacción entre los momentos magnéticos ($\mu_e \leftrightarrow \mu_N$). El Hamiltoniano para un sistema de estas características puede expresarse como la sumatoria de un término electrónico, uno nuclear (o de Zeeman), uno de contacto de Fermi y uno dipolar (respetando el orden):

$$\mathcal{H} = g_e \beta_e S B + g_N \beta_N I B + A S I + g_e \beta_e g_N \beta_N D(r, S, I, l) \quad (22)$$

donde g_e es el factor de desdoblamiento electrónico (definido como g en la sección anterior), A es la constante de acoplamiento hiperfino y $D(r, S, I, l)$ una función de interacción dipolar que depende de los espines nuclear y electrónico (I y S , respectivamente), del vector distancia electrón-núcleo (r) y del momento angular neto del orbital electrónico (l). El término de Zeeman resulta siempre muy minoritario frente a los últimos dos términos, razón por la cual estos dominan los grandes desplazamientos químicos de las especies paramagnéticas. Cabe destacar que cuando la especie es magnéticamente anisotrópica, por un lado, el factor de acoplamiento hiperfino A puede resultar también anisotrópico y debe tratarse entonces como un tensor, y por otro, el término de interacción dipolar (que se anula en especies isotrópicas) cobra relevancia.

El análisis matemático de la ecuación (22) y de la técnica discutida escapa a los objetivos de esta sección y de la tesis en general, pero cabe señalar que pueden adoptarse expresiones para las componentes de contacto de Fermi y de interacción dipolar del desplazamiento químico, en función de la simetría de la especie paramagnética y de la anisotropía de sus momentos magnéticos (μ_e y μ_N). Así, el RMN paramagnético permite obtener información estructural, por ejemplo, de la coordinación de un sitio redox paramagnético, como es el caso de los sitios de Cu_A y T1 en sus formas oxidadas. Cambios en la descripción electrónica de este tipo de sistemas pueden ser monitoreados, permitiendo no sólo un diagnóstico de integridad estructural sino un escrutinio de distintos estados fundamentales alternativos, lo cual presenta una particular relevancia en el caso del sitio de Cu_A (ver capítulos 3 y 4).

1.5- Referencias

- (1) Shriver, D. F.; Atkins, P. W. *Inorganic Chemistry*, 3. ed., reprint.; Oxford Univ. Press: Oxford, **2002**.
- (2) Waldron, K. J.; Robinson, N. J. How Do Bacterial Cells Ensure That Metalloproteins Get the Correct Metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7 (1), 25–35.
- (3) *Handbook of Metalloproteins*; Messerschmidt, A., Ed.; Wiley: Chichester; New York, **2001**.
- (4) Harding, M. M. The Architecture of Metal Coordination Groups in Proteins. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, 60 (5), 849–859.
- (5) Bersuker, I. B.; Stavrov, S. S. Structure and Properties of Metalloporphyrins and Hemoproteins: The Vibronic Approach. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, 88, 1–68.
- (6) Silva, J. J. R. F. da; Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford; New York, **2001**.
- (7) Mertz, W. The Essential Trace Elements. *Science* **1981**, 213 (4514), 1332–1338.
- (8) Solomon, E. I.; Szilagy, R. K.; DeBeer George, S.; Basumallick, L. Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (2), 419–458.
- (9) Lieberman, R. L.; Arciero, D. M.; Hooper, A. B.; Rosenzweig, A. C. Crystal Structure of a Novel Red Copper Protein from *Nitrosomonas Europaea*. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, 40 (19), 5674–5681.
- (10) Sousa, F. L.; Alves, R. J.; Ribeiro, M. A.; Pereira-Leal, J. B.; Teixeira, M.; Pereira, M. M. The Superfamily of Heme–copper Oxygen Reductases: Types and Evolutionary Considerations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2012**, 1817 (4), 629–637.
- (11) Gerdemann, C.; Eicken, C.; Krebs, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35 (3), 183–191.
- (12) Kau, L. S.; Spira-Solomon, D. J.; Penner-Hahn, J. E.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. X-Ray Absorption Edge Determination of the Oxidation State and Coordination Number of Copper. Application to the Type 3 Site in *Rhus Vernicifera* Laccase and Its Reaction with Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109 (21), 6433–6442.
- (13) Pomowski, A.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H.; Einsle, O. N₂O Binding at a [4Cu:2S] Copper–sulphur Cluster in Nitrous Oxide Reductase. *Nature* **2011**, 477 (7363), 234–237.
- (14) Haltia, T.; Brown, K.; Tegoni, M.; Cambillau, C.; Saraste, M.; Mattila, K.; Djinovic-Carugo, K. Crystal Structure of Nitrous Oxide Reductase from *Paracoccus Denitrificans* at 1.6 Å Resolution. *Biochem. J.* **2003**, 369 (1), 77–88.
- (15) Berks, B. C.; Ferguson, S. J.; Moir, J. W. B.; Richardson, D. J. Enzymes and Associated Electron Transport Systems That Catalyse the Respiratory Reduction of Nitrogen Oxides and Oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1995**, 1232 (3), 97–173.
- (16) Blackburn, N. J.; de Vries, S.; Barr, M. E.; Houser, R. P.; Tolman, W. B.; Sanders, D.; Fee, J. A. X-Ray Absorption Studies on the Mixed-Valence and Fully Reduced Forms of the Soluble Cu_A Domains of Cytochrome *c* Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (26), 6135–6143.
- (17) Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodruff, W. H.; van der Oost, J.; de Vries, S. Metal-Metal Bonding in Biology: EXAFS Evidence for a 2.5 Å Copper-Copper Bond in the Cu_A Center of Cytochrome Oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, 33 (34), 10401–10407.
- (18) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (39), 11884–11885.
- (19) Slutter, C. E.; Sanders, D.; Wittung, P.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Fee, J. A. Water-Soluble, Recombinant Cu_A-Domain of the Cytochrome *ba*₃ Subunit II from *Thermus Thermophilus*. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, 35 (11), 3387–3395.

- (20) Andrew, C. R.; Han, J.; de Vries, S.; van der Oost, J.; Averill, B. A.; Loehr, T. M.; Sanders-Loehr, J. Cu_A of Cytochrome c Oxidase and the A Site of N₂O Reductase Are Tetrahedrally Distorted Type 1 Cu Cysteineates. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (23), 10805–10806.
- (21) Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4366–4469.
- (22) De Rienzo, F.; Gabdoulline, R. R.; Menziani, M. C.; Wade, R. C. Blue Copper Proteins: A Comparative Analysis of Their Molecular Interaction Properties. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2000**, *9* (8), 1439–1454.
- (23) Wittung, P.; Källebring, B.; Malmström, B. G. The Cupredoxin Fold Is Found in the Soluble Cu_A and CyoA Domains of Two Terminal Oxidases. *FEBS Lett.* **1994**, *349* (2), 286–288.
- (24) Gough, J.; Chothia, C. The Linked Conservation of Structure and Function in a Family of High Diversity. *Structure* **2004**, *12* (6), 917–925.
- (25) Jaenicke, E.; Büchler, K.; Markl, J.; Decker, H.; Barends, T. R. M. Cupredoxin-like Domains in Haemocyanins. *Biochem. J.* **2010**, *426* (3), 373–378.
- (26) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 5th ed.; W.H. Freeman: New York, **2002**.
- (27) Alberts, B. *Essential Cell Biology*, Fourth edition.; Garland Science: New York, NY, **2013**.
- (28) Clarke, R. J. The Dipole Potential of Phospholipid Membranes and Methods for Its Detection. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *89–90*, 263–281.
- (29) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Electron-Transfer Processes of Cytochrome c at Interfaces. New Insights by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (11), 854–861.
- (30) Khoa Ly, H.; Sezer, M.; Wisitruangsakul, N.; Feng, J.-J.; Kranich, A.; Millo, D.; Weidinger, I. M.; Zebger, I.; Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy for Probing Transient Interactions of Proteins with Biomimetic Interfaces: Electric Field Effects on Structure, Dynamics and Function of Cytochrome c: SERR and SEIRA Spectroscopy of Cytochrome c. *FEBS J.* **2011**, *278* (9), 1382–1390.
- (31) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Heterogeneous Electron Transfer of Cytochrome c on Coated Silver Electrodes. Electric Field Effects on Structure and Redox Potential. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (8), 1578–1586.
- (32) Skou, J. C. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *23*, 394–401.
- (33) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. Novel Method for the Investigation of the Electrochemistry of Metalloproteins: Cytochrome c. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, No. 21, 771b.
- (34) Yeh, P.; Kuwana, T. Reversible electrode reaction of cytochrome c. *Chem. Lett.* **1977**, No. 10, 1145–1148.
- (35) Willner, null; Katz, null. Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2000**, *39* (7), 1180–1218.
- (36) Hammes-Schiffer, S.; Soudackov, A. V. Proton-Coupled Electron Transfer in Solution, Proteins, and Electrochemistry. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (45), 14108–14123.
- (37) Eckermann, A. L.; Feld, D. J.; Shaw, J. A.; Meade, T. J. Electrochemistry of Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (15–16), 1769–1802.
- (38) Udit, A. K.; Gray, H. B. Electrochemistry of Heme–thiolate Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338* (1), 470–476.
- (39) Samanta, D.; Sarkar, A. Immobilization of Bio-Macromolecules on Self-Assembled Monolayers: Methods and Sensor Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2567.
- (40) Prime, K.; Whitesides, G. Self-Assembled Organic Monolayers: Model Systems for Studying Adsorption of Proteins at Surfaces. *Science* **1991**, *252* (5009), 1164–1167.

- (41) Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Recent Advances in Self-Assembled Monolayers Based Biomolecular Electronic Devices. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (9), 2810–2817.
- (42) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103–1170.
- (43) Azzaroni, O.; Vela, M. E.; Andreasen, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Electrodesorption Potentials of Self-Assembled Alkanethiolate Monolayers on Ag(111) and Au(111). An Electrochemical, Scanning Tunneling Microscopy and Density Functional Theory Study. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (47), 12267–12273.
- (44) Kakiuchi, T.; Usui, H.; Hobara, D.; Yamamoto, M. Voltammetric Properties of the Reductive Desorption of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers from a Metal Surface. *Langmuir* **2002**, *18* (13), 5231–5238.
- (45) Boubour, E.; Lennox, R. B. Potential-Induced Defects in *N*-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers Monitored by Impedance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (38), 9004–9010.
- (46) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. ω -Terminated Alkanethiolate Monolayers on Surfaces of Copper, Silver, and Gold Have Similar Wettabilities. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (6), 1990–1995.
- (47) Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43* (1), 437–463.
- (48) Smith, C. P.; White, H. S. Theory of the Interfacial Potential Distribution and Reversible Voltammetric Response of Electrodes Coated with Electroactive Molecular Films. *Anal. Chem.* **1992**, *64* (20), 2398–2405.
- (49) Lecomte, S.; Hildebrandt, P.; Soulimane, T. Dynamics of the Heterogeneous Electron-Transfer Reaction of Cytochrome c_{552} from *Thermus T Hermophilus*. A Time-Resolved Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopic Study. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (45), 10053–10064.
- (50) Marcus, R. A.; Sutin, N. Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Bioenerg.* **1985**, *811* (3), 265–322.
- (51) Marcus, R. A. Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1964**, *15* (1), 155–196.
- (52) Marcus, R. A. Electron Transfer Reactions in Chemistry. Theory and Experiment. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65* (3), 599–610.
- (53) Dogonadze, R. R.; Kuznetsov, A. M.; Chernenko, A. A. Theory of homogenous and heterogeneous electronic processes in liquids. *Russ. Chem. Rev.* **1965**, *34* (10), 759–775.
- (54) Miller, J. R.; Calcaterra, L. T.; Closs, G. L. Intramolecular Long-Distance Electron Transfer in Radical Anions. The Effects of Free Energy and Solvent on the Reaction Rates. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (10), 3047–3049.
- (55) Closs, G. L.; Calcaterra, L. T.; Green, N. J.; Penfield, K. W.; Miller, J. R. Distance, Stereoelectronic Effects, and the Marcus Inverted Region in Intramolecular Electron Transfer in Organic Radical Anions. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (16), 3673–3683.
- (56) Fawcett, W. R.; Opallo, M. The Kinetics of Heterogeneous Electron Transfer Reaction in Polar Solvents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (21), 2131–2143.
- (57) Sen, R. K.; Yeager, E.; O'Grady, W. E. Theory of Charge Transfer at Electrochemical Interfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1975**, *26* (1), 287–314.
- (58) Kuznetsov, A. M.; Ulstrup, J. Theory of Electron Transfer at Electrified Interfaces. *Electrochimica Acta* **2000**, *45* (15–16), 2339–2361.
- (59) Allen J. Bard; Larry R. Faulkner. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications.*, Second Edition.; John Wiley & Sons, INC.: Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin, **2001**.

- (60) Heinze, J. Cyclic Voltammetry—"Electrochemical Spectroscopy". New Analytical Methods(25). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23 (11), 831–847.
- (61) Mabbott, G. A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, 60 (9), 697.
- (62) *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*; Que, L., Ed.; University Science Books: Sausalito, Calif, **2000**.
- (63) Atkins, P. W.; De Paula, J. *Atkins' Physical Chemistry*; W.H. Freeman: New York, **2006**.
- (64) Solomon, E. I. Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry: Blue to Green to Red Copper Sites. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (20), 8012–8025.
- (65) Solomon, E. I.; Hadt, R. G. Recent Advances in Understanding Blue Copper Proteins. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255 (7–8), 774–789.
- (66) Rimington, C. Spectral-Absorption Coefficients of Some Porphyrins in the Soret-Band Region. *Biochem. J.* **1960**, 75 (3), 620–623.
- (67) Solomon, E. I.; Hare, J. W.; Gray, H. B. Spectroscopic Studies and a Structural Model for Blue Copper Centers in Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73 (5), 1389–1393.
- (68) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*; J. Wiley: Hoboken, NJ, **2005**.
- (69) Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd ed.; Academic Press: Amsterdam; Boston, **2003**.
- (70) Albrecht, A. C. On the Theory of Raman Intensities. *J. Chem. Phys.* **1961**, 34 (5), 1476.
- (71) Tang, J.; Albrecht, A. C. Developments in the Theories of Vibrational Raman Intensities. In *Raman Spectroscopy*; Szymanski, H. A., Ed.; Springer US: Boston, MA, **1970**; pp 33–68.
- (72) Hyde, J. S.; Froncisz, W. The Role of Microwave Frequency in EPR Spectroscopy of Copper Complexes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1982**, 11 (1), 391–417.
- (73) Yan Zang; Jang, H. G.; Chiou, Y.-M.; Hendrich, M. P.; Que, L. Structures and Properties of Ferromagnetically Coupled Bis(μ -halo)diiron(II) Complexes. *Inorganica Chim. Acta* **1993**, 213 (1–2), 41–48.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

2.1- Materiales

2.1.1- Reactivos

La mayoría de los distintos alcanotioles empleados para los experimentos electroquímicos fueron adquiridos en la compañía Sigma-Aldrich. Estos son: el 4-mercaptobutanol (C_3-CH_2OH), el 6-mercaptohexan-1-ol (C_5-CH_2OH), el 8-mercaptooctan-1-ol (C_7-CH_2OH), el 11-mercaptoundecan-1-ol ($C_{10}-CH_2OH$), el 1-butanotiol (C_3-CH_3), el 1-hexanetiol (C_5-CH_3), el 1-octanetiol (C_7-CH_3), el 1-undecanotiol ($C_{10}-CH_3$) y el 1-hexadecanotiol ($C_{15}-CH_3$). En el caso del 16-mectaptohexadecan-1-ol ($C_{15}-CH_2OH$), fue adquirido en la compañía Dojindo. Por otra parte, todos los reactivos empleados en la preparación de soluciones, así como en la limpieza, preparación y modificación de electrodos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y son de grado de pureza analítico. El agua empleada en todos los experimentos fue purificada con un sistema Millipore, obteniéndose una resistencia superior a los 18 M Ω .

2.1.2- Muestras proteicas

El fragmento soluble de la subunidad II de la citocromo ba_3 oxidasa de *Thermus thermophilus* fue desarrollado y aislado en el laboratorio del grupo colaborador del Dr. Alejandro Vila en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), siguiendo el protocolo reportado por Slutter y colaboradores ¹. Brevemente, a la secuencia de DNA codificante de dicho fragmento le fueron removidos los codones correspondientes a los primeros 32 aminoácidos, pertenecientes a la α -hélice que conforma el dominio transmembrana de la subunidad II, generándose la proteína Tt-Cu_A. Las mutantes de ligando axial M160, las mutantes de segunda esfera de coordinación y las quimeras T1 en la matriz de Tt-Cu_A fueron creadas empleando métodos estándar de biología molecular y el detalle de las modificaciones que presentan en su secuencia aminoacídica se detallan en las secciones 3.2.1; 3.2.2 y 5.2.1. En todos los casos la secuencia resultante fue insertada en el plásmido pET9a, obteniendo el vector pETCu_A a partir del cual se llevó a cabo el siguiente protocolo de expresión y purificación proteica.

- *Preparación de inóculo*: se cultivan bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21 Star (DE3) (Invitrogen) que fueron previamente transformadas con dicho plásmido. Esto se realiza en un medio LB con 50 μ g/ml de kanamicina durante una noche a 37 °C.

- *Crecida*: al día siguiente se inocula el cultivo bacteriano en un volumen mayor (generalmente un litro) de medio LB con 50 μ g/ml de kanamicina a 37 °C hasta una

densidad óptica de la muestra de 0,8 (lo cual se alcanza aproximadamente en 2 horas y 30 minutos).

- *Inducción*: se centrifugan los cultivos crecidos a 5000 rpm y 4 °C por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 35 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 8 y se agrega 0,7 ml de PMSF 0,1M, 40 µl de DNasa 10mg/ml y 87 µl de MgCl₂ 2M. Luego se congela la muestra (células) a -20 °C para continuar la purificación al día siguiente. En este estado, las células pueden estar almacenadas hasta un mes.

- *Sonicar*: al día siguiente se descongelan los extractos celulares y se los somete a repetidos pulsos de 30 segundos (espaciados por un minuto) de sonicador a máxima potencia. Esto se repite hasta que el color de la muestra se aclare (generalmente 5 pulsos). Se agregan luego 30 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 8 al lisado resultante y se centrifuga a 4 °C por media hora a 20000 rpm, recogiendo luego el sobrenadante.

- *Precipitación térmica*: Se somete el extracto crudo a un baño térmico de 50 °C (cuidando no sobrepasar la barrera de los 65 °C, donde Tt-Cu_A precipita). Se retira el extracto del baño térmico 15 minutos después de la aparición de un precipitado blanco o amarillento y se centrifuga a 4 °C por media hora a 20000 rpm, recogiendo luego el sobrenadante. En algunos casos puede repetirse este paso para alcanzar un mayor grado de pureza.

- *Precipitación de ADN*: se agrega 1 ml de sulfato de estreptomicina 100 mg/ml cada 10 ml de extracto (aparece un precipitado blanco) y se agita en frío durante media hora. Se centrifuga a 4 °C y a 20000 rpm, recogiendo luego el sobrenadante.

- *Precipitación salina*: se agregan 114 g de sulfato de amonio por cada litro de extracto y se agita en frío durante media hora. Se centrifuga a 4 °C y a 13000 rpm, recogiendo luego el sobrenadante. Se agregan 189 g de sulfato de amonio por cada litro de extracto y se agita en frío durante 10 minutos. Se centrifuga a 4 °C y a 13000 rpm, descartándose el sobrenadante para resuspender el pellet (donde se encuentra la proteína) con 5 ml de solución Tris 50 mM pH 8.

A partir de este punto, el protocolo para Tt-Cu_A y las distintas mutantes de primera y segunda esfera de coordinación difiere ligeramente del utilizado para las quimeras T1. En el caso de las primeras se incorpora Cu²⁺, mientras que para las quimeras T1 se continúa la purificación de la apoproteína hasta el final.

- *Incorporación de Cu²⁺* (excepto quimeras T1): se agregan 50 µl de CuSO₄ 100 mM y se incuban en hielo por 15 minutos, agitando a intervalos (en este punto debe aparecer el característico color purpura).

- *Precipitación ácida*: se agregan 0,5 ml de NaAc 5M a pH 4,5 y se incuban en hielo durante una hora (este tiempo puede ser variable). Se centrifuga a 4 °C durante media

hora a 20000 rpm, recogiendo luego el sobrenadante, el cual se neutraliza con 50 μ l de NaOH 5M (agregando de manera lenta y con agitación para evitar altas concentraciones locales).

- *Uso de columna HiTrap-Chelatin* (excepto quimeras T1): Se equilibra previamente la columna haciendo pasar secuencialmente 15 ml de agua, 2,5 ml de CuSO_4 0,1 M, 15 ml de agua, 25 ml de solución A1 (compuesta de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M y KCl 0,5 M a pH 7), 25 ml de solución A1 con 10 mM de imidazol y finalmente 25 ml de solución A1. Tanto el equilibrado de la columna como su uso para la purificación del extracto se realizan con un sistema FPLC. Se siembra el extracto en la columna (no más del equivalente a 1,5 litros iniciales), que tiñe de color púrpura la columna, y se lava con solución A1 a flujo bajo (0,05 ml/min). Terminada la siembra se lava con 200 ml de solución A1 a 2 ml/min y luego se eluye la muestra con un pulso de solución A con 10 mM de imidazol a 2 ml/min, recolectando la muestra. La columna se lava con 25 ml de EDTA 50 mM a pH 8, luego con 25 ml de agua y finalmente 25 ml de etanol 20 % para almacenarla.

- *Uso de columna Q-Sepharose* (únicamente quimeras T1): Se equilibra previamente la columna haciendo pasar secuencialmente 15 ml de agua, 25 ml de solución B1 (compuesta de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM con DTT 0,5 mM a pH 7,5), 25 ml de solución B1 con NaCl 0,5 M y finalmente 25 ml de solución B1. Tanto el equilibrado de la columna como su uso para la purificación del extracto se realizan con un sistema FPLC. Se siembra el extracto en la columna y se lava a 2 ml/min, recogiendo el eluido (donde se encuentra la muestra proteica).

- *Diálisis*: Se dializan las muestras proteicas contra la solución deseada. Si se registra en los espectros UV-Vis una relación de absorbancias $A_{260\text{nm}} > A_{280\text{nm}}$, significa que la muestra está contaminada con material genético, en cuyo caso se repite el paso que emplea sulfato de estreptomicina. Para el caso de las quimeras T1, aquí se realiza el paso de incorporación de Cu^{2+} , eliminando el excedente de CuSO_4 mediante diálisis. Las muestras proteicas se congelan con N_2 líquido y se almacenan idealmente a -80°C , aunque generalmente se emplean -20°C .

Cabe señalar que en la expresión y purificación de las distintas muestras proteicas hubo participación activa del tesista, a lo largo de una estadía en el IBR. Para la concentración y/o cambios en la composición de las soluciones de las muestras proteicas en nuestro laboratorio se utilizaron unidades Amicon Ultra-4 para filtración con membrana NMWL de 10 kDa (el tamaño mínimo de proteína capaz de retener eficazmente) en una centrífuga HERMLE Labortechnik modelo Z 326 K, a una velocidad máxima de 4000 rpm.

2.2- Métodos electroquímicos

2.2.1- Preparación de electrodos y celda electroquímica

Se utilizaron alambres de oro de 0,5 mm de diámetro y 99,99% de pureza, se cortó el alambre en fragmentos de aproximadamente 2 cm o 5 cm (dependiendo el tipo de electrodo a producir) y se limpiaron en ácido sulfúrico 96% (18 M) a reflujo de 250 °C durante aproximadamente 4 horas. Se enjuagaron los fragmentos con agua y se calentó la punta de los alambres de oro con un mechero Meker hasta formar una gota de aproximadamente 0,05-0,11 cm² de área superficial. La gota fue calentada bajo la llama hasta alcanzar un color rojo-anaranjado, momento en el cual fue introducida en agua (solidificándose inmediatamente). Este proceso de recocido y templado se repitió al menos 10 veces hasta formar una punta semiesférica en el fragmento de alambre áurico, ahora electrodo. En los casos donde se usaron fragmentos de 5 cm el alambre de oro expuesto (lado opuesto a la pseudo esfera) fue sellado en un tubo capilar de vidrio, y la punta del alambre con la pseudo esfera de oro fue recocida y enfriada empleando una corriente de gas argón de máxima pureza. De esta manera se produjeron electrodos de área fija, mientras que con los fragmentos de 2 cm esto no se hizo, ya que se utilizaron como electrodos sin control de área (más sencillos de manipular). Para completar la limpieza de los electrodos se procedió a limpiarlos electroquímicamente, para lo cual se sumergieron en una solución de ácido perclórico 2 M y se realizaron aproximadamente entre 50 y 70 voltametrías cíclicas (VCs) hasta obtenerse la típica señal del oro policristalino ².

Para la preparación de electrodos químicamente modificados con monocapas de alcanotioles ω -sustituidos (SAMs), estos fueron sumergidos en una solución etanólica (previo enjuague con agua y luego etanol) de concentración 5 mM total de los alcanotioles empleados para la formación de las SAMs puras o mixtas. Los electrodos permanecieron en estas soluciones durante un día (para alcanotioles de 7 o menos metilenos) o dos días (para alcanotioles de 10 y 15 metilenos). En el caso de los electrodos preparados para experimentos con especies en solución, la SAM se diseñó de manera de minimizar la adsorción de muestra, mientras que, para los experimentos sobre muestras adsorbidas, el diseño de la SAM reviste la estrategia opuesta (lo cual será detallado en cada caso particular). Tras ser enjuagados primero con etanol y luego con agua, se procedió a caracterizar su capacitancia y respuesta voltamétrica en la solución de medida (figura 2-1). Luego de los experimentos electroquímicos la SAM fue removida del electrodo por inmersión en una solución “piraña” (una parte de H₂O₂ 100 volúmenes y tres partes de H₂SO₄ concentrado a 150°C) o por oxidación en presencia de HClO₄.

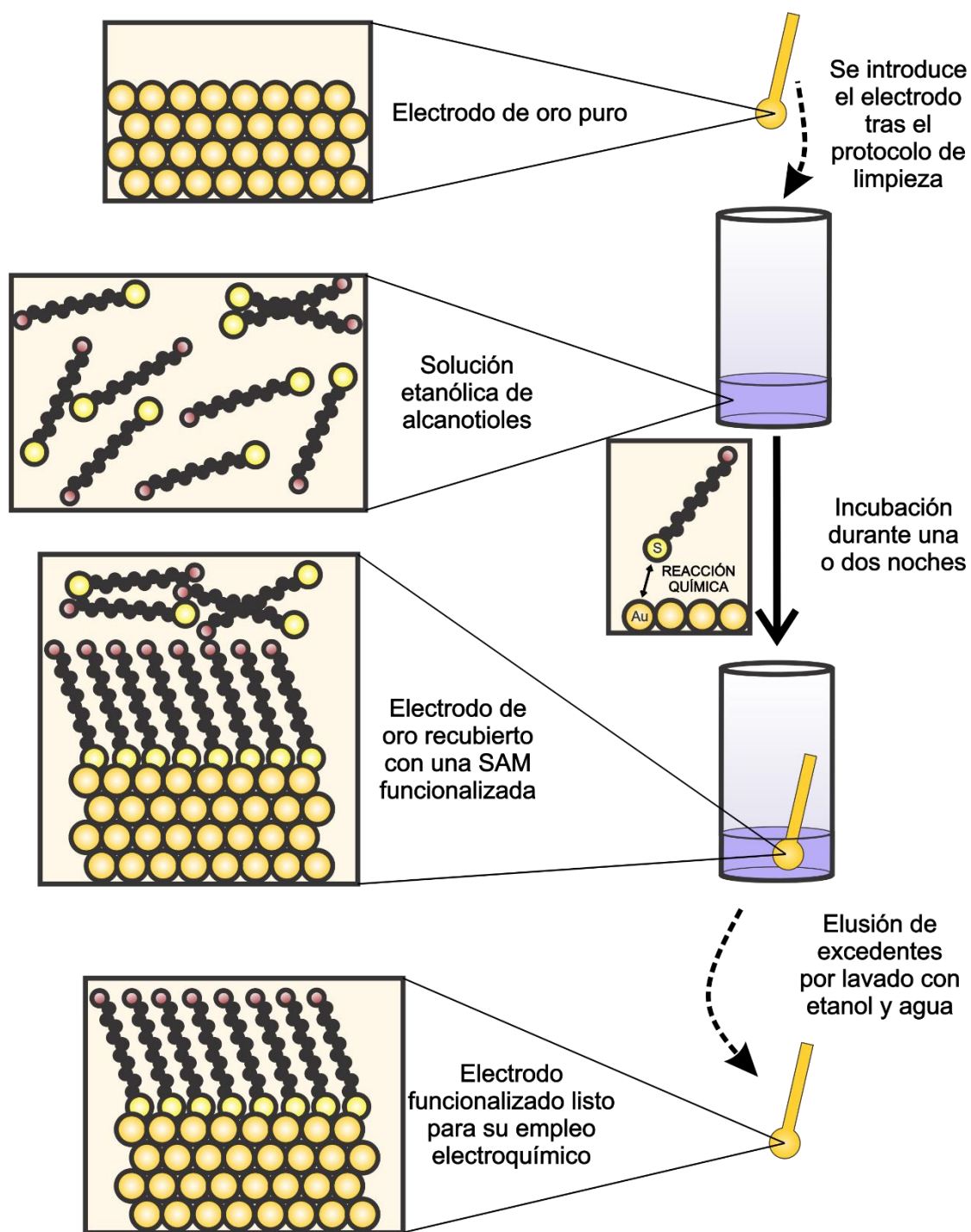


Figura 2-1. Esquema del procedimiento experimental utilizado para modificar electrodos por autoensamblado de alcanotioles.

2.2.2- VC para especies adsorbidas

Los electrodos recubiertos con SAMs fueron incubados en una solución entre 0,5 y 1 mM de la muestra proteica durante aproximadamente 2 horas (en algunos casos más tiempo) a temperatura ambiente. Los experimentos de VC se realizaron generalmente

empleando un potenciostato Gamry Reference 600, aunque algunos pocos fueron realizados con un potenciostato EG&G PAR-263. La celda electroquímica empleada es una celda Gamry termostatizable, modelo “Dr. Bob”, y todas las medidas se realizaron con la celda dentro de una caja de Faraday Gamry’s VistaShield cerrada, que además permite control digital de agitación como también burbujeo y sobrepresión de gases (figura 2-2).

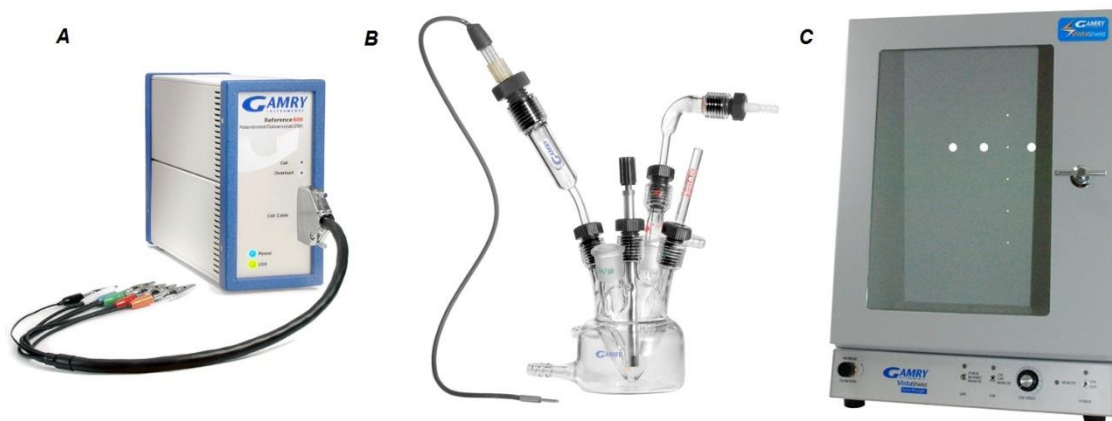


Figura 2-2. (A) potenciostato Gamry Reference 600. (B) Celda electroquímica Gamry Dr. Bob. (C) Caja de Faraday Gamry’s VistaShield.

La celda electroquímica contiene un contraelectrodo espiralado de platino, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3.5M NaCl) y el electrodo de trabajo de oro recubierto de una SAM, cuya confección se detalla en la sección anterior. Los experimentos voltamétricos se realizaron en soluciones degasadas bajo una atmósfera de argón. Para aquellos experimentos en los cuales se varió y controló la temperatura, se circuló agua a la temperatura deseada por la camisa de la celda, empleándose un termostato Fisherbrand FBC 620. Se verificó que la configuración experimental corresponde a una celda idealmente no isotérmica midiendo la dependencia del potencial redox (E^0) con la temperatura para la cupla ferro/ferricianuro de potasio. La entropía de la reacción redox así determinada resultó idéntica a los valores de literatura.

Todos los voltagramas obtenidos con el *software* Gamry Instruments Framework Version 5.61 fueron exportados y analizados con el programa OriginPro 8 u 8.1. Se extrajeron las líneas de base y se obtuvieron los potenciales de pico (E_{pc} y E_{pa}), las intensidades de corriente de pico (I_{pc} e I_{pa}), y el ancho a la altura media de pico (FWHM) de las ondas catódicas y anódicas ³. El valor del E^0 se obtuvo a partir del $E_{1/2}$, promediando el valor entre E_{pc} y E_{pa} . Dada la ausencia de una relación analítica entre la constante cinética de TE (k_{TE}) y un parámetro medible electroquímicamente, se empleó la curva de trabajo de Laviron en la determinación de k_{TE} . Este método se basa en el

formalismo de Butler-Volmer y consiste en el cálculo de un parámetro definido a partir de k_{TE} y variables medibles del sistema, el parámetro m , que a su vez guarda una correspondencia biunívoca con la separación de E_{pc} y E_{pa} (ΔE_p), descrita mediante una curva de trabajo. El parámetro m se define como:

$$m = RTk_{TE}/nFv$$

donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura, n el número de electrones que una molécula transfiere en una reacción de TE, F es la constante de Faraday, k_{TE} es la constante de transferencia electrónica en ausencia de sobrepotencial ($\eta=0$) y v es la velocidad de barrido. Básicamente, para emplear este método se adquieren voltagramas a distintos valores de v y se evalúa sistemáticamente el valor de ΔE_p . A través de la curva de trabajo de Laviron, estos valores registrados experimentalmente se corresponden con valores de m y graficando este parámetro en función de $R.T.n^{-1}F^{-1}v^{-1}$ se obtiene el valor de k_{TE} de la pendiente ⁴. El método es válido para valores de ΔE_p menores a los 200 mV, y permite acceder a valores de k_{TE} tan altos como lo permite la constante temporal de la celda electroquímica.

2.2.3- Voltametría cíclica de especies en solución

Las voltametrías cíclicas en solución se realizaron empleando una celda de vidrio construida a partir de una pipeta Pasteur de vidrio, introduciendo un alambre de platino por su abertura menor, y sellándola con calor (figura 2-3 A). La celda fue limpiada con una solución de HCl 5% y luego enjuagada con agua. Tanto la muestra como los electrodos de trabajo y de referencia se introdujeron por la abertura superior. Esta celda permite minimizar el volumen de muestra necesaria para un experimento electroquímico, siendo suficiente la utilización de 40 μ L. Además, se diseñó y manufacturó en nuestro laboratorio una camisa refrigerante de politetrafluoroetileno (teflón) que permite realizar determinaciones electroquímicas con control térmico (figura 2-3 B). La temperatura se reguló con un termostato Fisherbrand FBC 620 y la celda se verificó como idealmente no isotérmica del mismo modo que en la sección anterior y se controló con un termómetro digital Termo Fluke 51 II. Los voltagramas obtenidos con el *software* Gamry Instruments Framework Version 5.61 fueron exportados y analizados con el programa Origin 8 u 8.1. Los mismos fueron procesados mediante extracción de la línea de base y se obtuvieron los valores E_{pc} y E_{pa} , I_{pc} e I_{pa} y FWHM. El valor del E^0 se obtuvo a partir del $E_{1/2}$, promediando el valor entre E_{pc} y E_{pa} ³.

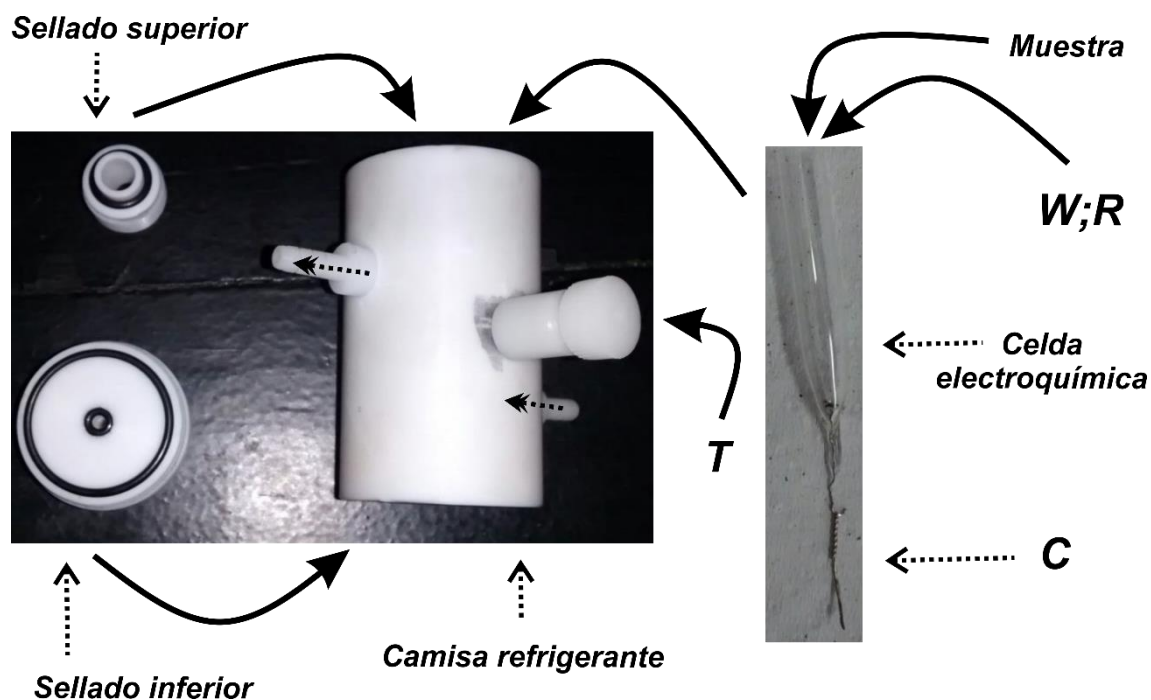


Figura 2-3. Camisa refrigerante (izquierda) y celda (derecha) para medidas electroquímicas de especies en solución con control térmico. Las flechas punteadas describen las piezas, las flechas llenas indican el armado del mecanismo y las flechas punteadas internas de la camisa refrigerante indican el sentido del (re)flujo del refrigerante (típicamente agua). La celda consiste de una pipeta Pasteur que es trabajada a la llama de modo de sellar un alambre de platino, que funciona como contraelectrodo (C). Dentro de la celda (de volumen reducido) se introducen la muestra y los electrodos de trabajo (W) y referencia (R). La celda se introduce dentro de la camisa (previo sellado con ambas tapas), se introduce un termómetro digital (T), se conecta la camisa al flujo de refrigerante y los electrodos al potenciostato. El sistema completo fue bautizado como “Roboto”.

2.3- Métodos espectroscópicos

2.3.1- Espectroscopia Raman resonante (RR)

Los espectros Raman resonante (RR) fueron adquiridos a temperatura ambiente empleando un microscopio Raman confocal Jobin Yvon XY 800 equipado con un detector CCD retroiluminado y refrigerado con N₂ líquido (figura 2-4). Las muestras fueron excitadas con la línea de 514 nm de un láser de Ar⁺ (Innova 70, Coherent) utilizando una potencia de 13 mW (514 nm) en la salida del microscopio. El haz fue dirigido mediante espejos, a través de filtros de interferencia (IF) para remover las líneas de plasma, hacia el espectrómetro. Luego del pasaje por un *pinhole* (P) el haz láser es reflejado con un divisor de haz (DS) dicróico hacia el microscopio (Olympus BX 40), donde es enfocado sobre la muestra empleando el objetivo (O) de distancia de trabajo de 24 mm (Olympus

20 ×, NA 0.35). La radiación dispersada fue colectada en una geometría de dispersión de 180 ° por el mismo objetivo (O), pasada a través del divisor de haz dicróico (DS) y luego a través de un filtro *Notch* (NF). Este arreglo permite remover eficientemente la radiación Rayleigh dispersada elásticamente. La luz colectada por el objetivo fue enfocada en un agujero confocal (H) ajustado a 1000 μm. Una lente adicional (L2) enfoca el láser dispersado sobre una apertura (*slit*) a la entrada del espectrógrafo, cuyo ancho se ajustó en 100 μm. El espectrógrafo consiste en un monocromador único de diseño Czerny-Turner (cuya distancia focal es de 800 nm) con una red de difracción de 1800 líneas/mm (G), que dispersa la radiación y la enfoca sobre el chip CCD (2048 x 512 pixeles). El espectrómetro es controlado digitalmente con el software LabSpec (versión 5). Los espectros RR fueron adquiridos a partir de gotas de 2 μl de muestra concentrada (1 mM) congeladas a 77 K. Para esto se utilizó un criostato Linkam THMS 300 acoplado a una fuente de N₂ líquido con un controlador de temperatura Linkam TMS 94. Los espectros RR fueron adquiridos a una resolución de 0,5 cm⁻¹.

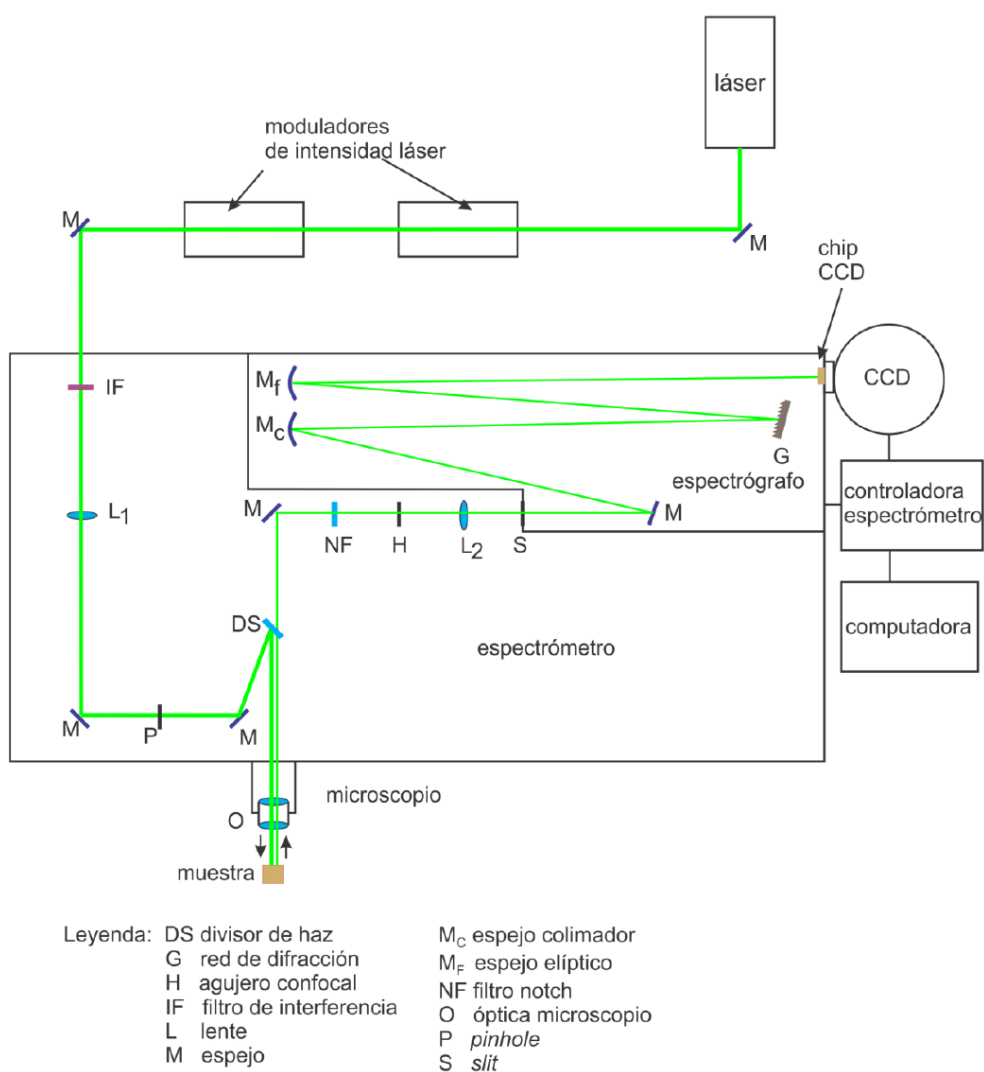


Figura 2-4. Configuración experimental empleada en las medidas Raman resonante.

2.3.2- Espectroscopia UV-Vis

Los espectros de absorción electrónica o UV-Vis fueron adquiridos con un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution Array equipado con detector de arreglo de diodos y un portacelda termostatizable. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y volumen reducido (para muestras de poco volumen) y de paso óptico reducido (para muestras muy concentradas) en las distintas determinaciones. Los espectros UV-Vis fueron procesados con el programa Origin 8 u 8.1.

2.4- Técnicas auxiliares

Los experimentos que involucran los métodos introducidos previamente fueron realizados en nuestro laboratorio. Diversos grupos colaboradores han llevado a cabo otros experimentos que han complementado y enriquecido nuestros resultados y nos han asistido en la comprensión de los sistemas de estudio. Las técnicas empleadas por dichos grupos colaboradores son el EPR, el RMN paramagnético y el SPR.

2.4.1- Resonancia electrónica paramagnética (EPR)

Los experimentos EPR fueron realizados en la facilidad que dirige el Dr. Brondino en la facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad del Litoral, Santa Fe. Los espectros fueron adquiridos en espectrómetro Bruker EMX-Plus equipado con una cavidad rectangular y un criostato de flujo continuo Oxford Instruments. En todos los casos se utilizaron microondas de 9.4 GHz de frecuencia y 2 mW de potencia; con una amplitud modulada de 4 G, una amplitud de campo de 100 kHz y una temperatura de 5K (refrigerado con He líquido). Los espectros EPR adquiridos fueron analizados y simulados con la caja de herramientas de EasySpin, basado en MATLAB ⁵. En todos los casos, las primeras simulaciones se realizaron a partir de parámetros de literatura para sistemas análogos, mejorando iterativamente estos parámetros hasta converger a los espectros simulados de menor diferencia respecto de los experimentales.

2.4.2- Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Paramagnética

Los experimentos de RMN fueron desarrollados por el grupo colaborador del Prof. Alejandro Vila, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Santa Fe. Brevemente, la asignación de las señales ^1H ^{13}C ^{15}N para las distintas variantes de Tt-Cu_A (incluyendo las quimeras T1) se realizó por una combinación de experimentos NOESY de 1D y 2D, espectros HMQC de pulsado rápido de ^1H , ^{13}C y $^1\text{H},^{15}\text{N}$ y experimentos de transferencia de saturación. Los experimentos de RMN se realizaron en un

espectrómetro Bruker Avance II de 600.13 MHz (frecuencia ^1H). El análisis de los desplazamientos químicos y su dependencia con la temperatura se realizaron como fue descrito en un trabajo previo ⁶. Brevemente, la magnetización en un material paramagnético es directamente proporcional al campo magnético aplicado e inversamente proporcional a la temperatura, lo que constituye el denominado comportamiento de tipo Curie. Sin embargo, existen muchos casos donde se observan comportamientos anti-Curie, es decir, donde tal relación no se cumple. Son múltiples los fenómenos que pueden provocar estas distorsiones, pero resulta particularmente interesante a los fines de esta tesis el caso de algunas hemo proteínas, cuyos desvíos han sido racionalizados en términos de la población térmica de estados excitados ^{7,8}. El caso del sitio de Cu_A es comparable, ya que los δ de los $\beta\text{-}^1\text{H}$ de la cisteína 153 y del $\alpha\text{-}^{13}\text{C}$ de la cisteína 149 ($\text{C149C}\alpha$) son muy sensibles al valor del $\Delta E_{\sigma_u^*}/\pi_u$ ⁶. Evaluando la dependencia anti-Curie de los δ en base a la distribución de Boltzman para un modelo de dos estados, es posible determinar la diferencia de energía entre ellos, como se realiza en el capítulo 3.2.1 y 3.2.2.

2.4.3- Resonancia de plasmón superficial (SPR)

Los experimentos SPR fueron desarrollados en el Instituto de investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), en La Plata, con participación activa del tesista. Las muestras fueron adsorbidas sobre un soporte de oro transparente (tAu) recubierto con una SAM 3:2 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6\text{-OH}/\text{HS}-(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_3$. Dicho soporte consta de una hoja de vidrio de 1 mm de espesor cubierto por una lámina de 48 nm de oro (mediado por una lámina de 2 nm de cromo), de la compañía BioNavis Ltd. Previamente fue limpiado mediante inmersión en una solución NH_4OH (28%) / H_2O_2 (100 Vol) 1:1 a temperatura de hervor por 15 minutos aproximadamente y posterior enjuague con agua y etanol. El recubrimiento con la SAM se realizó de manera análoga a la empleada para los electrodos utilizados en los distintos ensayos electroquímicos. Los espectros SPR fueron adquiridos con un equipo de SPR multiparamétrico (de la compañía BioNavis Ltd) a 670 nm y a 20 °C, y procesados inicialmente con el software de visualización de BioNavis y posteriormente con el Origin Pro 8.1.

2.4.4- Difracción de rayos X

Los cristales de Ami-Cu_A y Az-Cu_A fueron crecidos, difractados y resueltos por los integrantes de la plataforma PlaBem en el instituto Leloir. Ambas proteínas se cristalizaron por el método de *sitting drop*, mezclando la solución proteica con un volumen equivalente de solución de cristalización (60% 2-methyl-2,4-pentanediol), empleando una concentración final de proteína de aproximadamente 70 mg/ml. Los datos obtenidos mediante la difracción de rayos X fueron colectados a -173 °C en un

difractómetro de rayos X de microenfoque Bruker D8 QUEST equipado con un detector PHOTON 100 CMOS, con un máximo de resolución de 2.30 Å. Las estructuras cristalográficas fueron resueltas empleando los paquetes PHASER, Buster-TNT y Coot, teniendo éxito únicamente para el caso de Ami-Cu_A.

2.4.5- Cálculos y simulaciones computacionales

Todos los cálculos se realizaron utilizando Gaussian09. Para los cuatro ligandos del sitio T1 fueron empleados los aminoácidos enteros, aplicando las restricciones sobre los átomos que participan de las uniones peptídicas. Se emplearon las bases mixtas triple-zeta/doble-zeta (TZVP) para los átomos de Cu y S mientras que se emplearon las bases 6-31G* para el resto de los átomos. El criterio de convergencia utilizado fue el de “tight SCF” para todos los cálculos.

Los espectros UV-Vis fueron simulados realizando cálculos DFT dependientes del tiempo (TD-DFT) obteniéndose las energías e intensidades de las 100 transiciones electrónicas de menor energía. Las energías e intensidades calculadas fueron transformadas en los espectros de absorción simulados empleando funciones gaussianas de 2700 cm⁻¹ empleando el programa SWizard, en base a los FWHM experimentales de los espectros de los sitios T1 nativos.

2.5- Referencias

- (1) Slutter, C. E.; Sanders, D.; Wittung, P.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Fee, J. A. Water-Soluble, Recombinant Cu_A-Domain of the Cytochrome *Ba*₃ Subunit II from *Thermus Thermophilus*. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, 35 (11), 3387–3395.
- (2) Carvalhal, R. F.; Sanches Freire, R.; Kubota, L. T. Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. *Electroanalysis* **2005**, 17 (14), 1251–1259.
- (3) Allen J. Bard; Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*, Second Edition.; John Wiley & Sons, INC.: Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin, **2001**.
- (4) Laviron, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of Diffusionless Electrochemical Systems. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, 101 (1), 19–28.
- (5) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, 178 (1), 42–55.
- (6) Abriata, L. A.; Ledesma, G. N.; Pierattelli, R.; Vila, A. J. Electronic Structure of the Ground and Excited States of the Cu_A Site by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (5), 1939–1946.
- (7) Banci, L.; Bertini, I.; Luchinat, C.; Pierattelli, R.; Shokhirev, N. V.; Walker, F. A. Analysis of the Temperature Dependence of the ¹H and ¹³C Isotropic Shifts of Horse Heart Ferricytochrome *c*: Explanation of Curie and Anti-Curie Temperature Dependence and Nonlinear Pseudocontact Shifts in a Common Two-Level Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (33), 8472–8479.
- (8) Shokhirev, N. V.; Walker, F. A. Analysis of the Temperature Dependence of the ¹H Contact Shifts in Low-Spin Fe(III) Model Hemes and Heme Proteins: Explanation of “Curie” and “Anti-Curie” Behavior within the Same Molecule. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99 (50), 17795–17804.

*Determinantes de
las propiedades
espectroscópicas y
funcionales en el
sitio de Cu_A*

Determinantes de las propiedades espectroscópicas y funcionales en el sitio de Cu_A

3.1- Introducción

El sitio de Cu_A es un sistema de características únicas, así como también de enorme relevancia para el sostenimiento de la vida sobre la tierra tal cual la conocemos. Por esta razón su estudio es atractivo tanto desde el punto de vista fisicoquímico como desde un enfoque fisiológico e incluso evolutivo.

3.1.1- El sitio de Cu_A en la naturaleza

La citocromo *c* oxidasa (CcO) es la enzima terminal de la maquinaria de transducción energética electro-protónica de la respiración en mitocondrias y bacterias aeróbicas. Su función biológica es la de oxidar cuatro equivalentes de citocromo *c* (Cyt *c*) para reducir una molécula de oxígeno a agua, acoplando esta reacción a la translocación protónica contra-gradiente desde la matriz mitocondrial (o desde el citosol en células procariotas) hacia el espacio intermembrana. Contiene generalmente cuatro sitios redox, cada uno de los cuales es capaz tanto de recibir un electrón como de donarlo ¹.

Esta enzima pertenece a la superfamilia de las oxígeno reductasas de hemo/Cu (HCO), un extenso grupo de proteínas transmembrana que puede clasificarse en tres categorías distintas: Tipo A (que a su vez puede subdividirse entre A1 y A2), tipo B y tipo C ². Esta clasificación no es la única existente y sigue siendo objeto de debate, sin embargo es de las más aceptadas y se basa en un robusto análisis filogenético sobre los constituyentes de los canales protónicos ^{3,4}. El conjunto de las HCO tipo A es el más extendido de todos y está presente a lo largo de toda la vida eucariota y gran parte de la procariota, mientras que el tipo B se encuentra en ciertos grupos de bacterias y archeas. Las CcOs pertenecen a los Tipos A y B de HCOs, mientras que las quinol oxidasas conforman el conjunto de las HCO tipo C (figura 3-1).

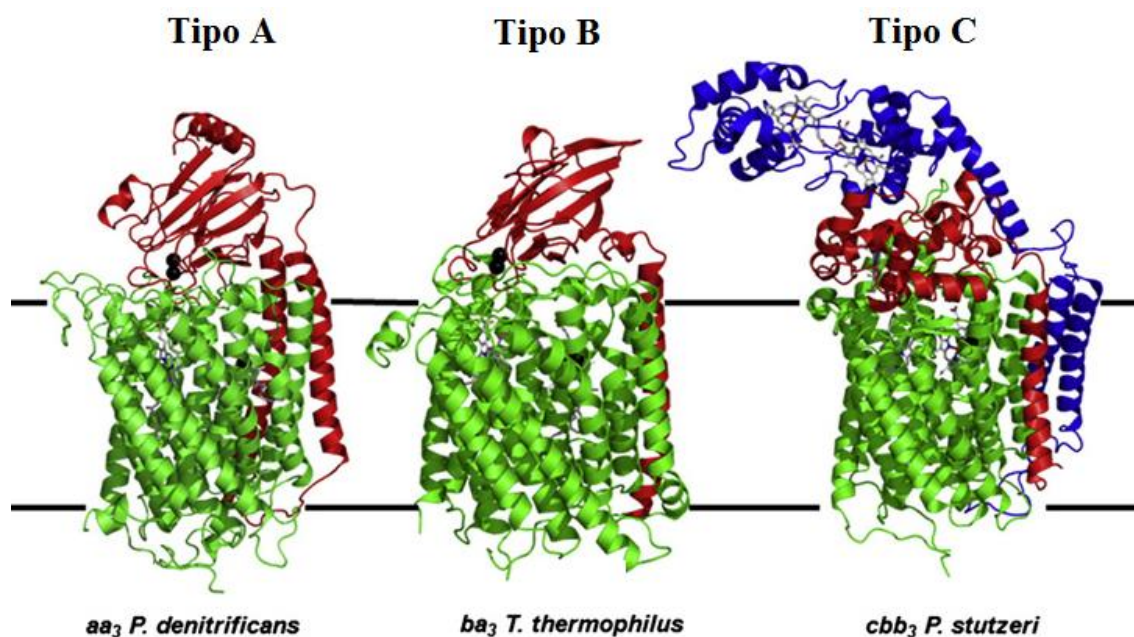


Figura 3-1. (figura adaptada de Sousa et al. 2012 ⁴) Representación de la estructura cristalográfica de un exponente procariota de cada tipo de HCO: A, B y C. En verde la subunidad 1 (catalítica), en rojo la subunidad 2 (Cu_A, excepto en tipo C donde no existe este sitio) y en azul la subunidad extra de la quinol oxidasa.

La estructura de la CcO exhibe una gran variabilidad entre los distintos grupos biológicos, desde la enorme complejidad de las CcOs tipo A de mamífero con sus 13 subunidades, hasta variantes tipo B (procariotas) que pueden llegar a estar conformadas por sólo dos o tres subunidades ⁵⁻⁷ (Figura 3-2). Sin embargo, en todos los casos existe un denominador común irreductible conformado por dos subunidades: una catalítica (subunidad 1) y otra que actúa de aceptor primario de electrones (subunidad 2). El resto de las subunidades cumple generalmente funciones estructurales, de anclaje a membrana, de interacción con otros agentes biológicos, etc. ⁴. Más allá de la distinta cantidad de subunidades o las diferencias en la arquitectura de sus canales protónicos, la estructura y funcionalidad de las subunidades 1 y 2 se encuentran altamente conservadas ⁴.

En la subunidad 2 se encuentra el sitio de Cu_A que actúa como aceptor primario, recibiendo un electrón del Citocromo *c* y cediéndolo vía transferencia electrónica (TE) intramolecular al hemo *a* de la subunidad 1, y de allí al sitio catalítico dinuclear hemo *a*₃/ Cu_B, donde se produce la reducción de O₂ a H₂O. Tanto el hemo *a*, como el hemo *a*₃ y el centro de cobre Cu_B se encuentran en la subunidad 1. Será particularmente importante a lo largo de esta tesis la citocromo *c* oxidasa de *Thermus thermophilus*, constituida por sólo dos subunidades, y donde el hemo *a* canónico está reemplazado por un hemo *b*, por lo que se clasifica como ba₃ ⁸ (Figura 3-3). Este sistema cuenta con la ventaja de presentar una enorme estabilidad dada la adaptación evolutiva del

organismo extremófilo a temperaturas elevadas, y el carácter altamente conservado de las subunidades enzimáticas hace posible una transferibilidad directa del conocimiento adquirido a otras CcOs (ver detalles en la sección 3.1.4).

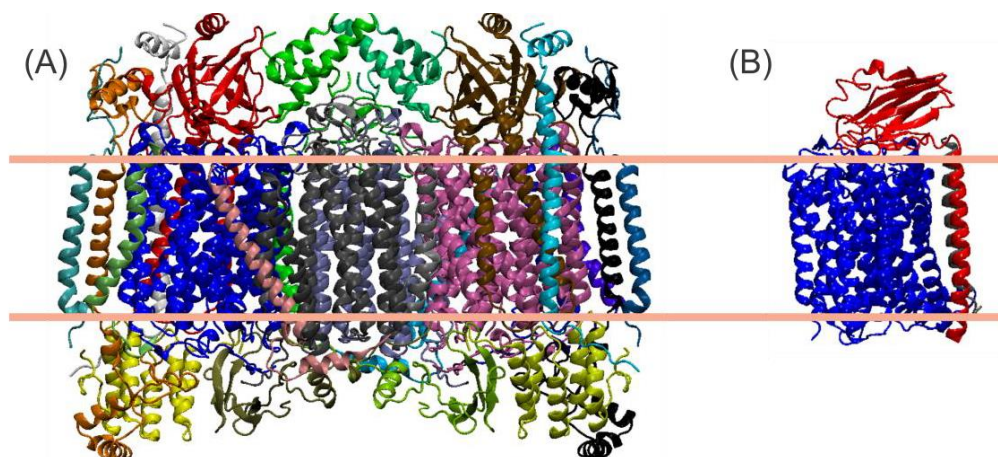


Figura 3-2. CcO de (A) *Bos Taurus* (mamífero) y (B) citocromo *c* oxidasa ba_3 de *Thermus thermophilus*, un organismo procariota. Las líneas horizontales encuadran los segmentos que forman parte de los dominios transmembrana.

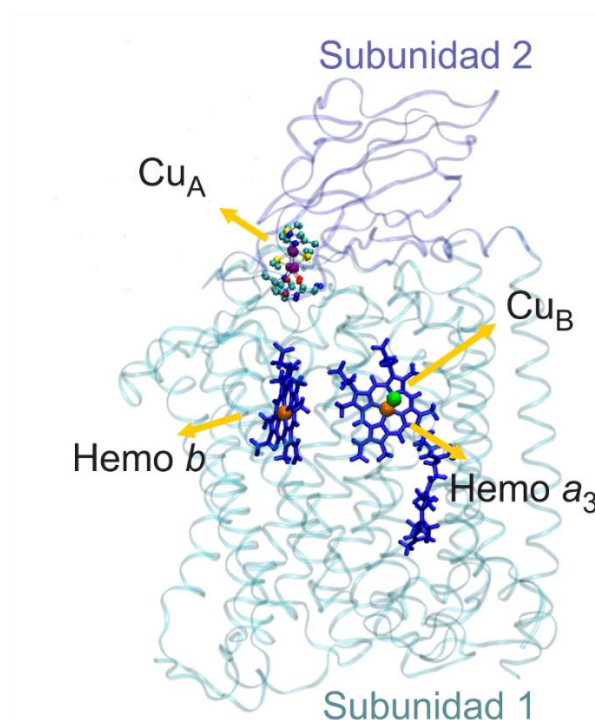


Figura 3-3. Citocromo *c* oxidasa ba_3 de *Thermus thermophilus*. En la subunidad 2 (azul) se encuentra el sitio de Cu_A y la subunidad 1 (celeste) residen los otros 3 restantes.

Por otra parte, la nitrito reductasa (N_2OR) es la enzima que cataliza el paso final del proceso de desnitrificación en una amplia variedad de bacterias desnitrificantes⁹. El N_2O se produce en el citoplasma de la bacteria como producto de la reducción de NO por la NO reductasa, y es reducido por la N_2OR produciendo agua y nitrógeno molecular. La N_2OR no presenta una variabilidad estructural tan grande como la observada en la CcO a lo largo de los organismos donde se la encuentra, sino que es en todos los casos un homo-dímero de orientación anti paralela con dos dominios principales por monómero: un dominio C-terminal donde se encuentra el sitio de Cu_A , y otro N-terminal en el que está el sitio de Cu_Z ¹⁰⁻¹³ (figura 3-4). Al igual que en la CcO , el sitio de Cu_A de las N_2OR es el aceptor primario de electrones y oxida una molécula de Cyt c cediendo luego el electrón al sitio de Cu_Z del otro monómero. Este último es el sitio catalítico de la enzima, donde se produce la activación y posterior reducción de la molécula de N_2O . Es a partir de la orientación anti paralela o “*head to tail orientation*” que ambos sitios, separados por 40 Å de distancia intra-monómero, estén a 10 Å de distancia inter-monómero, favoreciendo el acoplamiento en la reacción de TE¹⁴ (figura 3-4).

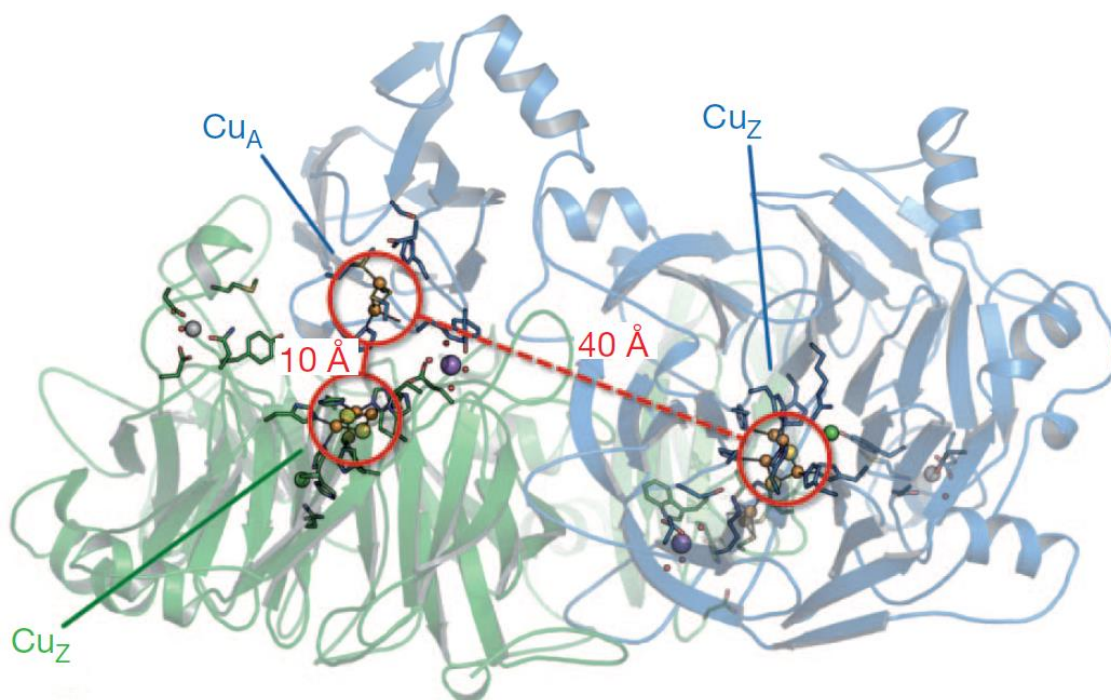


Figura 3-4. (figura adaptada de Pomowski et al. 2011¹⁴) Estructura homo-dimérica de N_2O reductasa de *Paracoccus Denitrificans*. Cada monómero está representado con un color distinto (verde y azul). Se destacan los sitios activos y las distancias que separan a un sitio de Cu_A de los sitios Cu_Z intra e inter monómero.

Como ya fue mencionado en el capítulo 1, el sitio de Cu_A es el primer ejemplo conocido de un enlace entre dos iones metálicos en la naturaleza. Los átomos de cobre

forman un enlace covalente entre sí y se encuentran coordinados ecuatorialmente por una histidina cada uno, dos cisteínas que a su vez actúan de puente entre ambos iones, formando un motivo rígido Cu_2S_2 y dos ligandos axiales débiles: una metionina y el carbonilo amídico de una glutamina ¹⁵⁻¹⁷ (Figura 3-5). Es un sitio que actúa de intermediario electrónico y es capaz de intercambiar un solo electrón en la reacción de TE, quedando con un electrón desapareado en su estado oxidado.

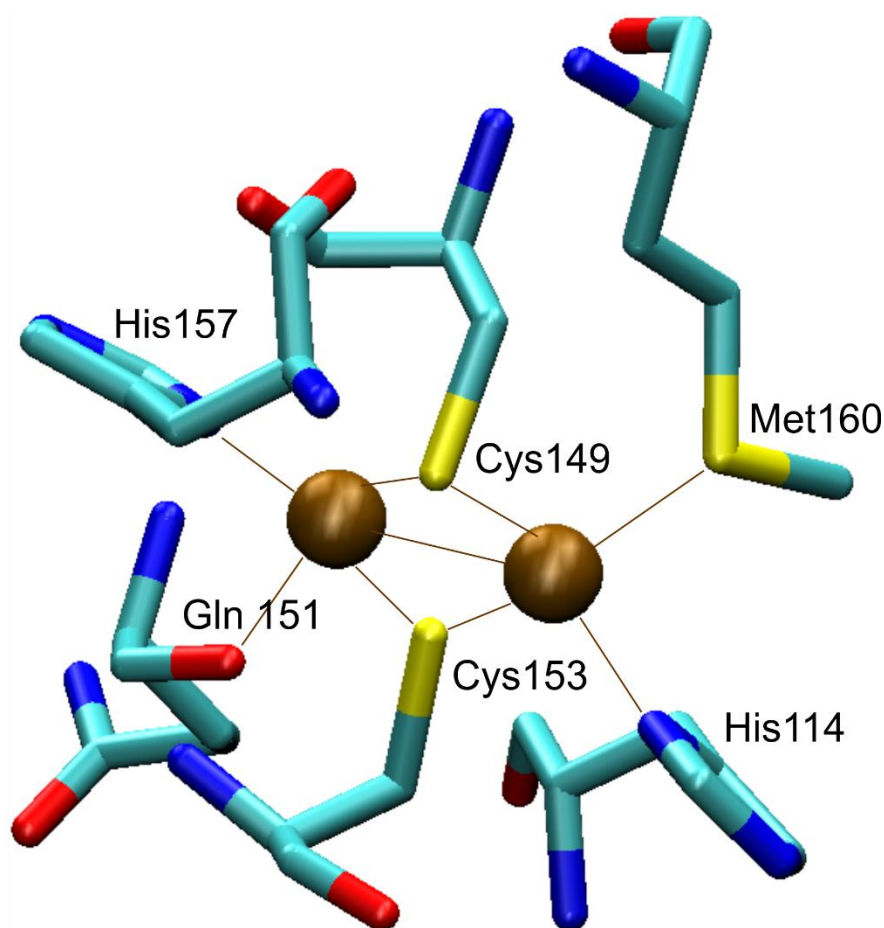


Figura 3-5. Representación gráfica del sitio de Cu_A de *T. thermophilus* (2CUA de PDB). Código de color: marrón para los cobres, amarillo para los azufres, azul para los nitrógenos, rojo para los oxígenos y blanco para los carbonos.

Por un lado las propiedades estructurales como distancias interatómicas o constante de fuerza de modos normales, y por el otro las propiedades redox como el potencial de reducción (E^0) del sitio de Cu_A , se encuentran altamente conservadas no sólo entre las distintas especies, sino entre los sitios de Cu_A conocidos de las CcO y las N_2OR ^{18,19}. Desde un punto de vista evolutivo, es esperable que a lo largo de millones de años se mantengan conservadas únicamente las características indispensables para el

desempeño de su rol biológico. El grado de conservación observado para los sitios de Cu_A es entonces indicativo de la importancia que la mayoría de sus características representa para su funcionalidad *in vivo*. A lo largo de este capítulo y del próximo se presentan diversos estudios experimentales sobre el sitio de Cu_A, presente únicamente en la CcO^{1,5,7} y en la N₂OR^{9,10}, enfocando el análisis y la discusión en torno a su rol biológico en la CcO.

3.1.2- Primeros antecedentes en el estudio del sitio de Cu_A.

Dado el hecho de que la CcO es una proteína con varios sitios metálicos y cofactores asociados, el estudio del sitio de Cu_A ha enfrentado diversos obstáculos. En particular, los grupos hemo de las distintas CcO interfieren con la medición de distintas propiedades espectroscópicas en la proteína silvestre²⁰. No es de extrañar entonces que el estudio de este sitio redox haya mostrado tantas aristas controversiales a lo largo de más de tres décadas^{21,22}.

El primer paso importante en la elucidación de la estructura del sitio de Cu_A se produjo a partir de experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR) cuyos resultados sugerían que el sitio posee un par de iones cobre que interactúan magnéticamente²³. Esto contrasta con los otros centros de cobre conocidos que, o bien poseen solo un ion cobre (T1, T2, Cu_B), o bien poseen más que no interactúan entre sí (T3, Cu_Z). Pocos años después este primer indicio fue apoyado por estudios de espectroscopia de masa, realizados sobre el fragmento soluble del sitio de Cu_A de la subunidad 2 de la CcO de *Paracoccus denitrificans* obtenido mediante técnicas de biología molecular²⁴. Estos resultados demostraron concluyentemente la existencia de dos átomos de Cu en el sitio de Cu_A.

En su estado reducido este sitio no tiene ningún electrón desapareado, siendo la carga formal sobre los iones Cu¹-Cu¹. Sin embargo, en su estado oxidado presenta un electrón desapareado, que en principio podría localizarse en uno de los dos iones metálicos, o deslocalizarse (parcial o totalmente) entre ambos. Los estudios de EPR realizados sobre la variante de *P. denitrificans* confirmaron que el estado oxidado es un estado de valencia mixta (VM) con un electrón completamente deslocalizado sobre los dos iones cobre, que puede describirse como un estado de carga formal Cu^{1.5}-Cu^{1.5}²⁵.

A partir de la estructura conservada de todos los sitios de Cu_A se concluyó que los ligandos coordinantes de los átomos de cobre son dos cisteínas y dos histidinas. Pero se plantearon dos modelos contrapuestos: uno en el que los átomos de S de las cisteínas ligantes (S_{Cys}) actúan de puente entre los iones Cu y otro donde actúan como ligandos terminales al igual que los átomos de N de los ligandos histidina (N_{His})²⁵. Si bien hubo distintos resultados que avalaban a un modelo u otro, finalmente se determinó que el modelo correcto era aquel donde los S_{Cys} actúan de puente. Esta conclusión se alcanzó

gracias a estudios realizados sobre el dominio de Cu_A de *Thermus thermophilus* que mostraron no sólo distancias ligando-metal compatibles con dicho modelo, sino además valores de la distancia entre los iones metálicos sorprendentemente bajos, entre 2.4 y 2.5 Å. Esta distancia es menor que la esperada e indica una interacción directa entre los dos iones cobre ¹⁶. Finalmente, la primera estructura de rayos X de una CcO confirmó que el modelo de los puentes tiolato es la estructura correcta del centro de Cu_A ⁷ (Figura 3-6).

Con el paso de los años fue posible el estudio del sitio de Cu_A de una mayor variedad de proteínas de distintos organismos. A través de la excitación de las dos bandas de transferencia de carga ligando metal (TCLM) S_{Cys}→Cu, que dominan el espectro UV-VIS de estos sitios ²⁶, se obtuvieron espectros Raman resonante (RR) con preponderancia de modos vibracionales del motivo Cu₂S₂, asignados mediante sustitución isotópica ²⁷. Los resultados obtenidos a partir de distintas especies mostraron una muy baja variabilidad en la frecuencia de las señales, raramente mayor a 5 cm⁻¹, prueba del carácter robusto y conservado del sitio de Cu_A ²⁷⁻²⁹. También aportaron datos que validaron la estructura de tetraedro distorsionado previamente propuesta y la corta distancia entre los iones metálicos, profundizando además en el detalle estructural de la descripción del sitio.

Si bien el carácter robusto que presenta el sitio de Cu_A resulta una característica indispensable en términos de minimizar la energía de reorganización (λ), parámetro clave en la TE (ver detalles en la sección 1.3.1), esta no es la única. Su estructura particular, un tetraedro distorsionado a mitad de camino entre la estructura trigonal del estado Cu⁺¹ y el cuadrado plano del Cu⁺², es otro factor determinante para un bajo valor de λ . Finalmente, el carácter de VM del sitio de Cu_A en su forma oxidada también contribuye a la minimización de dicho parámetro.

Una estrategia que permitió abordar con otro enfoque el estudio de los sitios de Cu_A fue la del empleo de complejos inorgánicos sintéticos, diseñados con el fin de emular sus propiedades distintivas ³⁰⁻³⁷ (figura 3-6). Si bien los resultados obtenidos a partir de estos sistemas no resultan tan fácilmente extrapolables al sistema biológico, su gran versatilidad para el trabajo experimental propició ciertos avances en el estudio del sitio de Cu_A. El [Cu₂(iPrdacoS)₂]⁺ o complejo de Tolman (Figura 3-6 E) ha sido el más popular como consecuencia de mostrar mayores similitudes que otros (hasta hace algunos años) con el sitio nativo ³⁸. En particular, es el único complejo sintético que reprodujo relativamente bien la estructura del motivo Cu₂S₂. Sin embargo, fue en el año 2011 cuando se reportó el [Cu₂^{1.5, 1.5}L']⁺, único complejo inorgánico que no sólo logra reproducir algunas de las características espectroscópicas del sitio de Cu_A sino que además es redox activo, pudiendo ser estudiado en sus dos estados de oxidación: Cu^{1.5}-Cu^{1.5} y Cu¹-Cu¹ (figura 3-6 F) ^{39,40}. Este sistema (complejo de Duboc) es hasta la actualidad el modelo inorgánico más prometedor para el estudio del sitio de Cu_A con este tipo de enfoque.

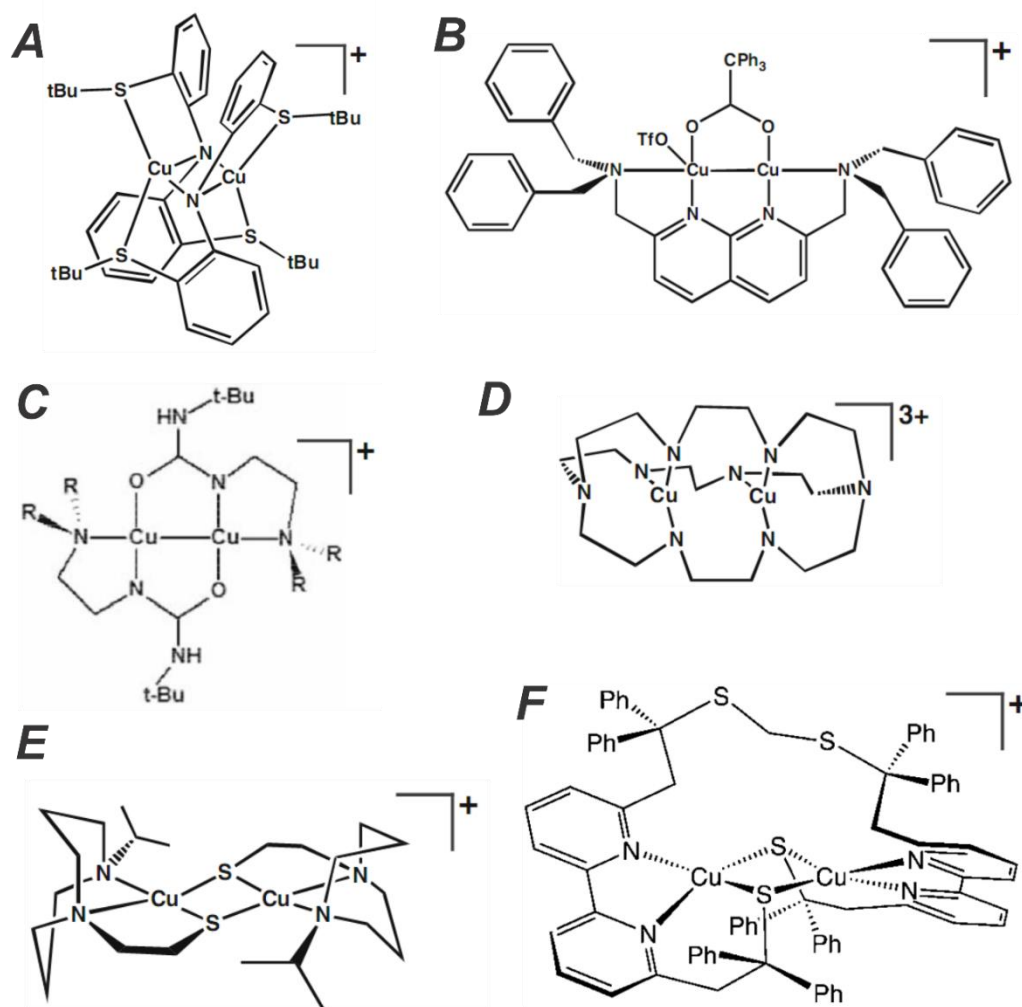


Figura 3-6. Algunos complejos inorgánicos sintéticos utilizados en el estudio del sitio de Cu_A. (A) $[\text{Cu}_2(\text{SNS})_2]^+$ ³⁰. (B) $[\text{Cu}_2(\text{BBAN})(l\text{-O}_2\text{CCPh}_3)(\text{OTf})]^+$ ³³. (C) $[\text{Cu}(\text{t-BuNHC}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)_2]^+$ y $[\text{Cu}(\text{t-BuNHC}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}]_2^+$ ³². (D) Ejemplo de complejo dinuclear azacriptano^{36,37}. (E) $[\text{Cu}_2(\text{iPrdacoS})_2]^+$ ³⁸. (F) $[\text{Cu}_2^{1.5, 1.5} \text{L}']^+$ ³⁹.

De todos los resultados obtenidos a partir de estos complejos sintéticos, los más relevantes resultan sin dudas los referidos a los determinantes estructurales del estado de VM. A través del estudio de los distintos compuestos se verificó no sólo que los puentes tiolato son prescindibles para mantener el carácter de VM del sitio, sino que tampoco es necesario que los átomos de cobre posean ligandos completamente simétricos (figura 3-6). Pero, aunque estos resultados fueron de gran importancia en la caracterización de los sitios de Cu_A, las falencias de estos modelos limitaron mayores avances. Ninguno de los centros sintéticos reportados tiene la corta distancia Cu-Cu característica de los sitios de Cu_A, ni tampoco coordinaciones que representen adecuadamente a las histidinas y los ligandos axiales. La imposibilidad de representar las características estructurales fundamentales del sitio nativo debilita la capacidad de extrapolar el conocimiento obtenido mediante el estudio de estos complejos sintéticos.

3.1.3- Un modelo biológico robusto: Cu_A-Azu.

Los distintos sistemas modelo (sintéticos y biológicos) promovieron avances sobre la caracterización estructural del sitio de Cu_A, no obstante, su estudio funcional electroquímico se mantuvo esquivo por más tiempo. Las razones principales radican en la naturaleza del sistema, ya que la CcO es una proteína transmembrana, que resulta difícil de sobreexpresar, por un lado, y poco propensa a establecer una comunicación electrónica directa con un electrodo, por el otro. Una de las estrategias de mayor éxito para eludir estos impedimentos fue la de recrear el sitio de Cu_A en otra matriz proteica mediante ingeniería genética ⁴¹⁻⁴³.

Muchas de las metaloproteínas de cobre mono y di metálicas tienen elementos conservados en su estructura tridimensional. Este denominado “plegamiento cupredoxina” consta a grandes rasgos de una estructura de barril-β en el que se mantienen una histidina y una cisteína coordinantes conservadas, presentando la mayor variabilidad en la secuencia aminoacídica del bucle que conforma el sitio redox, denominado por algunos autores como bucle ligante ⁴⁴⁻⁴⁷ (ver detalle en la sección 1.2.1). Esta característica presenta un gran atractivo para la ingeniería genética, ya a partir de reemplazar el bucle de una cupredoxina por el de otra, es posible en ciertos casos recrear artificialmente el sitio de cobre de una proteína en la matriz proteica de otra. Esta estrategia permitió la construcción de varios modelos diferentes, el más estudiado de los cuales ha sido el llamado Cu_A-Azu, construido a partir del reemplazo del bucle que conforma el sitio T1 en Azurina de *P. aeruginosa* por el bucle que forma el sitio de Cu_A en la CcO de *P. denitrificans* ^{48,49} (figura 3-7). En este caso puntual, al bucle insertado se le realizó además una mutación puntual (Y120L), dado que la inserción sin modificaciones dificulta el correcto plegamiento de la proteína por impedimentos estéricos (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Secuencia aminoacídica del bucle nativo de Azurina, el bucle insertado en Cu_A-Azu sin la mutación puntual Y120L (mal plegamiento) y el bucle de Cu_A-Azu.

Proteína	Secuencia del bucle mutado
Azurina	Cys Thr Phe Pro . . . Gly His Ser Ala Leu Met
Cu _A -Azu (mal plegada)	Cys Ser Glu Leu Cys Gly Ile Asn His . . . Ala Tyr Met
Cu _A -Azu	Cys Ser Glu Leu Cys Gly Ile Asn His . . . Ala Leu Met

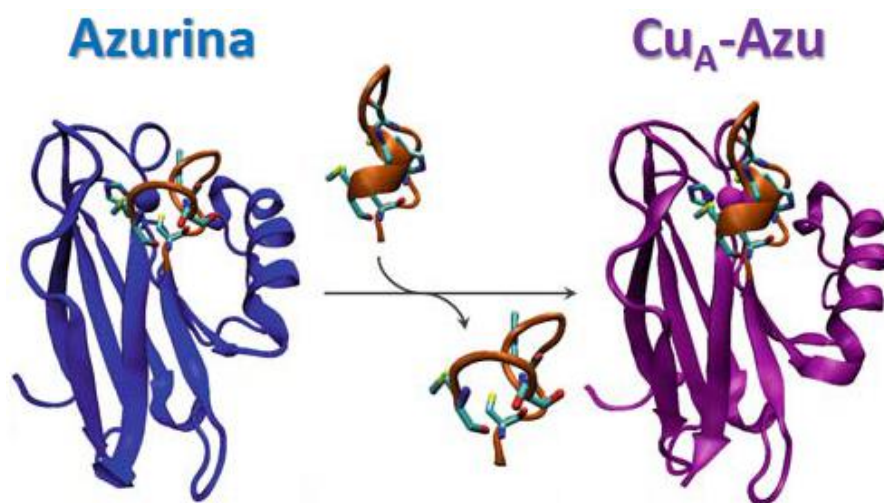


Figura 3-7. (figura adaptada de Savelieff et al. 2010 ⁴³) Esquema de la construcción de $\text{Cu}_A\text{-Azu}$ a partir de la matriz proteica de la Azurina de *P. aeruginosa* con el bucle que forma el sitio de Cu_A en la CcO de *P. denitrificans*.

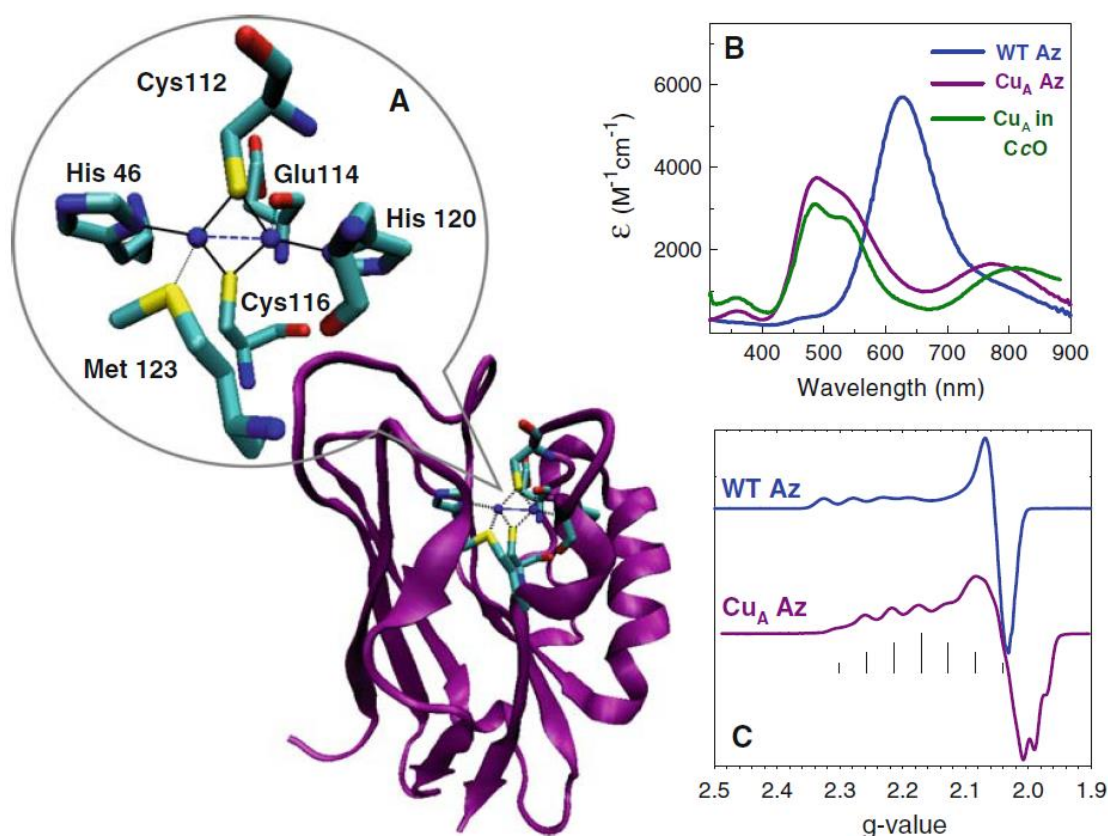


Figura 3-8. (figura adaptada de Savelieff et al. 2010 ⁴³) Representación de $\text{Cu}_A\text{-Azu}$ (PDB ID 1CC3) donde se muestra (A) el sitio redox en mayor detalle. (B) Espectros UV-Vis de (verde) un modelo nativo de Cu_A , (violeta) $\text{Cu}_A\text{-Azu}$ y (azul) azurina. (C) Espectros EPR que muestran el patrón típico (7 bandas) de sitios de VM para $\text{Cu}_A\text{-Azu}$ en contraste con el patrón típico (4 bandas) de sitios T1 para Azurina.

Cu_A-Azu es una proteína quimérica que recrea en gran medida las principales características estructurales y espectroscópicas de los sitios de Cu_A nativos (figura 3-8). Además, es un sistema de mucho menor tamaño que la CcO, es soluble, presenta una enorme estabilidad y resulta de fácil sobreexpresión y purificación, cualidades que explican por qué ha sido la mayor fuente de información acerca del sitio de Cu_A hasta la actualidad ¹⁹.

Sin lugar a dudas, uno de los resultados mas trascendentes que se obtuvieron a partir de este modelo ha sido acerca del efecto del pH sobre las propiedades estructurales y funcionales del sitio redox, y su potencial rol en la regulación *in vivo* de la TE acoplada a la translocación protónica. Específicamente, se observó que la variación del pH en un rango fisiológicamente relevante (entre 4 y 7 aproximadamente) genera un marcado corrimiento del valor del E⁰ como consecuencia de una perturbación en la estructura electrónica, provocada por la protonación y posterior desligamiento de una de las histidinas coordinantes ⁵⁰. Dicho cambio en la estructura electrónica fue inicialmente adjudicada a una transición del estado de VM en la cual el electrón desapareado se encuentra deslocalizado entre los dos átomos de cobre (Cu^{1.5}-Cu^{1.5}), a un estado de valencia localizada (VL), donde el electrón se encuentra en uno de los iones metálicos ^{50,51} (Cu¹-Cu²). Años mas tarde, a partir de nuevos estudios espectroscópicos y cálculos computacionales se determinó que la transición observada era producto de un cambio en la estructura electrónica que no involucra un estado de VL. El desligamiento de la histidina ecuatorial produce una asimetría en la contribución de los iones metálicos a la función de onda, pero manteniéndose el carácter de VM del sitio ⁵². La transición involucra entonces un estado de VM simétrico (VMs) y otro de VM asimétrico (VMa).

El consecuente corrimiento de aproximadamente 160 mV que se produce en el valor del E⁰ permitió postular que la histidina actuaría como un conmutador entre ambos estados (VMs y VMa). De este modo, dado que el medio fisiológico de la subunidad 2 de la CcO está sujeto a grandes cambios en el pH, producto de la traslocación activa de protones por bombeo en contra del gradiente y el transporte a favor a través de la ATP sintetasa (ver detalles en la sección 1.2.2), este conmutador pH-dependiente permitiría la alternancia entre un estado favorable (VMs) y otro desfavorable (VMa) para la TE *in vivo*. La evidencia presentada por estudios EPR, UV-Vis, RR y cálculos QM indica que en el estado de VMa la reacción de TE se encuentra desfavorecida. La pérdida de covalencia con los tiolatos cisteínicos y la mayor localización de espín observado sugieren que el sitio de Cu_A en el estado de VMa presentaría un valor de λ mayor que en el estado de VMs, lo que se configuraría como otro parámetro de control de la TE, además del fuerte cambio en el valor del E⁰ ^{52,53}. Este potencial rol fisiológico del pH en la regulación *in vivo* de la TE resultaba consistente con el conocimiento que hasta ese momento se tenía acerca de los sitios de Cu_A.

3.1.4- Un modelo nativo: Tt-Cu_A.

El sistema Cu_A-Azu propulsó un salto cualitativo en el entendimiento y caracterización del sitio de Cu_A gracias a la versatilidad que presenta frente a la aplicación de diversas técnicas. No sólo permitió el empleo de la batería de técnicas electroquímicas, lo cual había sido enormemente dificultoso hasta su aparición, sino que es hasta la actualidad el modelo de Cu_A más estudiado espectroscópicamente y computacionalmente¹⁹. Esto, en muchos casos, propició una extrapolación directa de la mayoría de los resultados obtenidos a los sitios nativos.

Si bien existen algunos antecedentes aislados de caracterización de sitios nativos de Cu_A⁵⁴⁻⁵⁶, fue en nuestro laboratorio donde se realizaron por primera vez estudios espectroscópicos y electroquímicos exhaustivos sobre sitios de Cu_A silvestres y distintas mutantes puntuales y de bucles¹⁷. En particular, el modelo utilizado es el fragmento soluble de la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa *ba*₃ de *T. thermophilus*^{57,58}, que a partir de aquí se denominará Tt-Cu_A (Figura 3-9). Este sistema se genera mediante la eliminación de 32 de los aminoácidos que conforman el dominio hidrofóbico transmembrana, dando como resultado una proteína pequeña y soluble que consta de 136 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kDa (ver detalles en la sección 2.1.2).

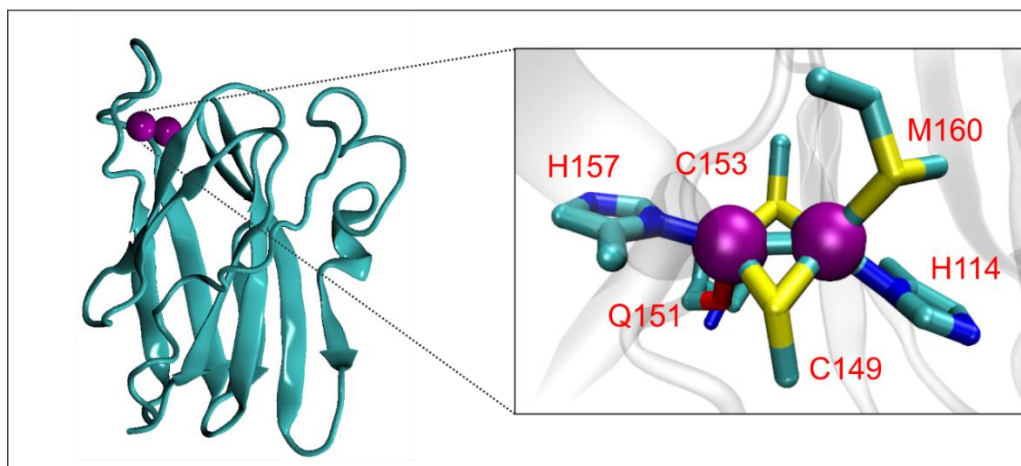


Figura 3-9. El fragmento soluble de subunidad II de la citocromo *ba*₃ oxidasa de *T. thermophilus*, denominado Tt-Cu_A. (ampliación, derecha) Representación detallada del sitio de Cu_A de Tt-Cu_A. se marcan la posición de los 6 ligandos en la secuencia aminoacídica (2CUA de PDB).

T. thermophilus es una bacteria utilizada en una gran variedad de aplicaciones en biotecnología. Es un organismo extremófilo capaz de habitar ambientes con temperaturas superiores a los 100° C, razón por la cual la mayoría de las proteínas de su

maquinaria celular está dotada de una gran estabilidad térmica. Sin ir más lejos, una de sus enzimas ADN-polimerasa es utilizada en protocolos de PCR dada su resistencia a abruptos cambios de temperatura ⁵⁹. Tt-Cu_A presenta una estructura secundaria dominada por múltiples láminas β de plegamiento muy resistente al incremento de la temperatura, convirtiéndolo en el primer fragmento soluble nativo que se ha aislado cuya estabilidad permite el empleo de diferentes técnicas electroquímicas y espectroscópicas en diferentes condiciones experimentales.

El primer resultado experimental de Tt-Cu_A que entra en clara contradicción con lo observado en el sitio artificial Cu_A-Azú surge a partir de la determinación de la influencia del ligando axial débil metionina 160 (M160) sobre el valor de E^0 . En los centros T1 de las proteínas azules de cobre, grupo al que pertenece la Azurina, el ligando débil metionina es fundamental en la determinación del valor del E^0 ^{60,61}. Sin embargo, estudios redox realizados en Cu_A-Azú mostraron que el ligando M160 no produce ningún cambio en el valor de E^0 . La conclusión inmediata fue que en centros de Cu_A, a diferencia de los centros T1, la metionina axial no es relevante en la modulación de dicho parámetro ⁶². En contraste con estos resultados, estudios en nuestro laboratorio sobre diversas mutantes puntuales del ligando M160 muestran grandes variaciones del E^0 , que alcanzan los 200 mV (figura 3-10) ^{17,63}. Este resultado no solo pone en tela de juicio la extrapolabilidad de la información obtenida a partir de sistemas no nativos de Cu_A, sino que abre el camino para indagar acerca del rol de la matriz proteica sobre las propiedades del centro redox.

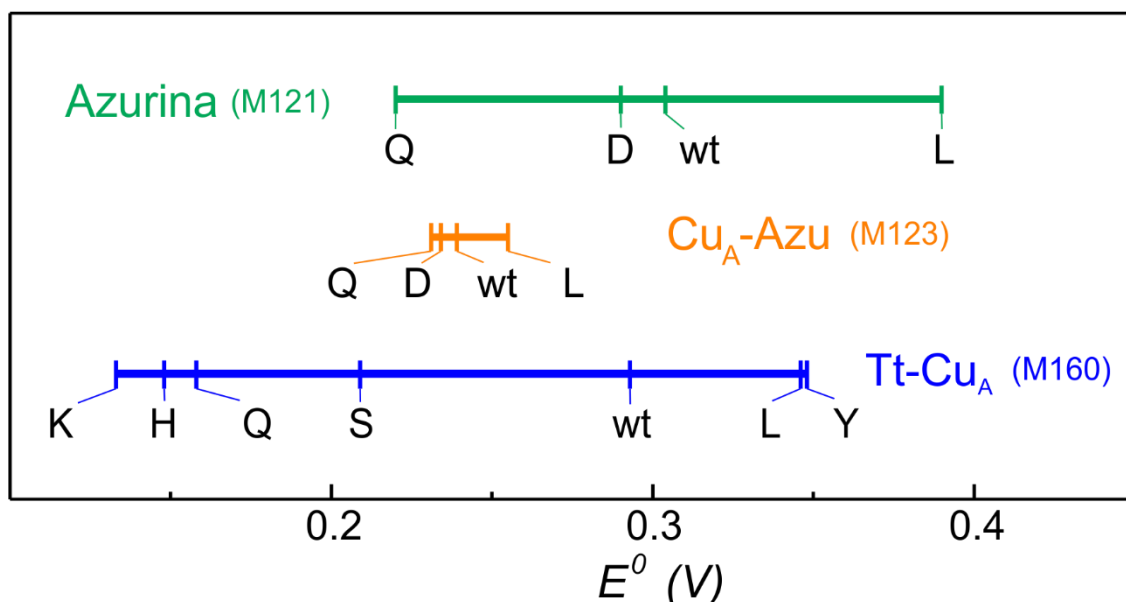


Figura 3-10. El efecto que tiene sobre los valores de E^0 (vs NHE) la mutación puntal de la metionina axial por distintos ligandos en las proteínas Azurina (verde), Cu_A-Azú (naranja) y Tt-Cu_A (azul).

Sin embargo, existe un problema que no ha sido superado a partir del modelo de Cu_A nativo y que entonces es común tanto a este sistema como al artificial: la escasa información acerca del estado reducido. Esto se debe no sólo a que en este estado la proteína pierde estabilidad, sino a impedimentos experimentales inherentes a sus características electrónicas. Si bien se han podido realizar algunos estudios de gran importancia estructural, como EXAFS en ambos estados de oxidación ^{15,16}, el estado reducido resulta invisible a la mayoría de las técnicas espectroscópicas capaces de brindar información útil. Por un lado, no absorbe luz en la región visible, dificultando no sólo el estudio mediante espectroscopia de absorción UV-Vis sino también la obtención de espectros RR. Por otra parte, el sitio de Cu_A en su estado reducido es diamagnético, impidiendo el empleo de técnicas como EPR o RMN paramagnético, de enorme importancia en el estudio de este tipo de sistemas. Estos son importantes obstáculos para la caracterización del sitio de Cu_A ya que dificultan la interpretación acabada de los datos experimentales.

3.1.5- Descripción electrónica del sitio de Cu_A.

Como fue desarrollado en la parte inicial de este capítulo, el sitio de Cu_A es un sitio redox que consta de dos átomos de cobre puenteados por dos azufres de dos cisteínas ligantes, formando una estructura de geometría romboidal cuasi plana Cu₂S₂ con una corta distancia Cu-Cu, de 2,4 Å. La primera esfera de coordinación se completa con dos histidinas ecuatoriales y dos ligandos axiales débiles: el carbonilo amídico de una glutamina y el azufre de la M160 (figura 3-5). En su descripción electrónica, cada átomo de cobre posee 5 orbitales d, que en un dímero de simetría D_{2h} se combinan para dar 10 niveles, dada la unión Cu-Cu y la interacción mediada por los azufres cisteínicos (figura 3-11). A su vez, cada tiolato posee dos orbitales 3p perpendiculares a los enlaces S-C de las cisteínas, que contribuyen a la formación de los orbitales moleculares que dan lugar a la deslocalización electrónica en el plano Cu₂S₂. El llenado del diagrama de orbitales moleculares (OM) con los 19 electrones d presentes en el sitio de Cu_A en el estado oxidado (de VM) da como resultado un orbital simplemente ocupado (HOMO o SOMO) de tipo σ_u^* .

Se determinó que para el sitio redox de Cu_A-Azu en el estado fundamental el HOMO es de tipo σ_u^* , mientras que en el primer estado excitado electrónico es de tipo π_u ^{64,65}. Si bien las expresiones σ_u^* y π_u refieren estrictamente a tipos de simetría orbital, se usarán de aquí en adelante también para nombrar de manera simplificada al estado del sitio redox, refiriendo al “estado σ_u^* ” o al “estado π_u ” en función de la simetría orbital de su HOMO. Estudios en algunos complejos sintéticos diseñados para emular las propiedades del sitio de Cu_A, como por ejemplo el complejo de Tolman (figura 3-6E), determinaron que para muchos de estos sistemas en el estado fundamental el HOMO es de tipo π_u , lo cual permitió su caracterización ^{26,30,38}. Como fue comentado, estos

centros sintéticos muestran en su forma oxidada una distancia Cu-Cu mayor que la presente en Cu_A-Azu o Tt-Cu_A: mientras que en los modelos biológicos esta distancia está en torno a 2,4 Å, los modelos sintéticos presentan típicamente distancias cercanas a 3 Å. Esto hecho resultó un indicio de que la distancia Cu-Cu era determinante para el carácter σ_u^* o π_u del estado fundamental, lo cual fue corroborado y descrito más tarde mediante cálculos DFT ⁶⁶. En estos casos, los iones metálicos interactúan más débilmente entre sí, dando como resultado un reordenamiento de OMs que genera el HOMO de tipo π_u (por encima del orbital de tipo σ_u^*). Las diferencias entre el diagrama de orbitales moleculares del centro de Cu_A y este complejo se han racionalizado en términos de efectos de campo ligando ²⁶ (figura 3-12).

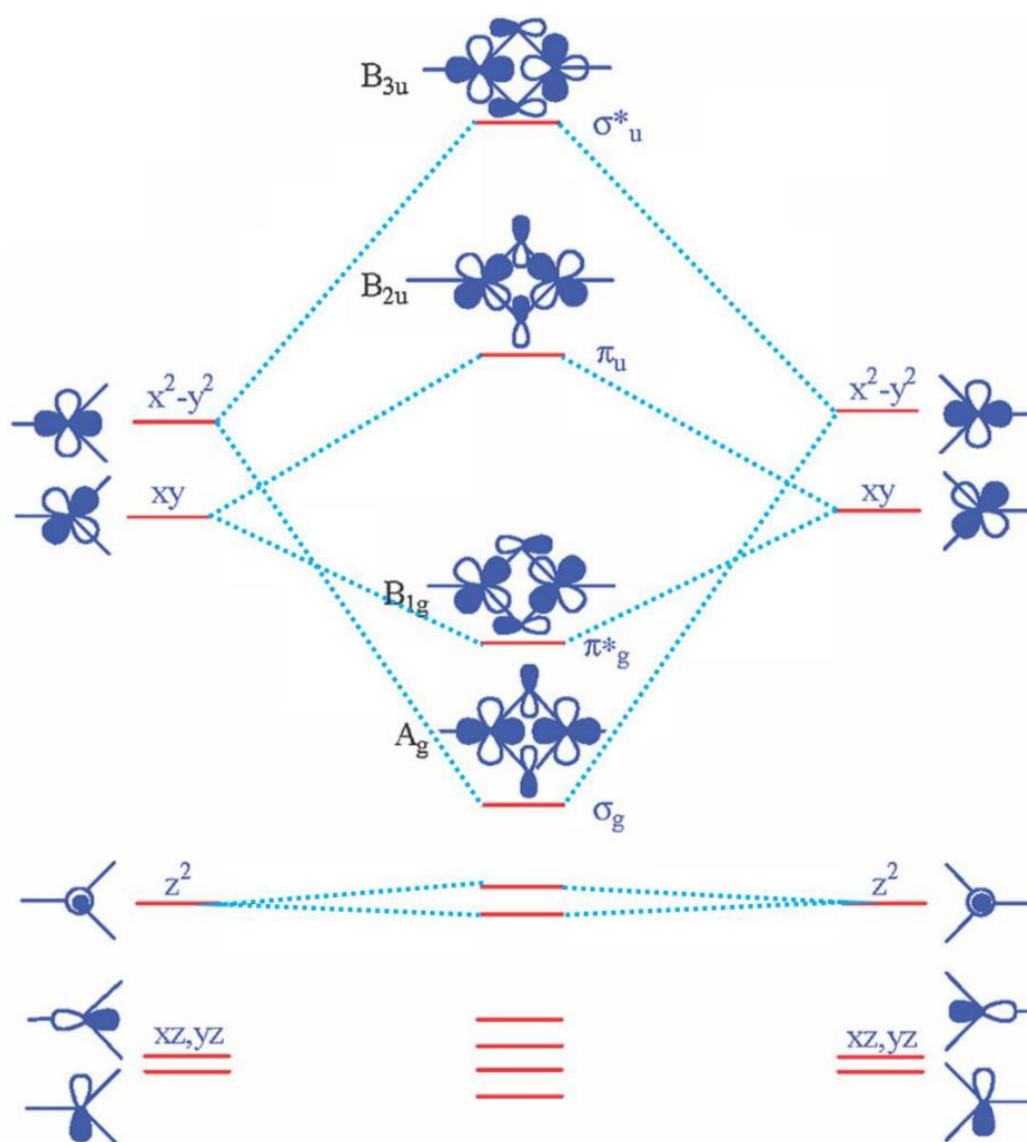


Figura 3-11. (Figura adaptada de Xie et al. 2012 ⁵²) *Diagrama de OM simplificados para un diamante Cu₂S₂ plano. Se muestra el acoplamiento entre dos monómeros NCuS₂ C_{2v} con su HOMO de simetría σ_u^* .*

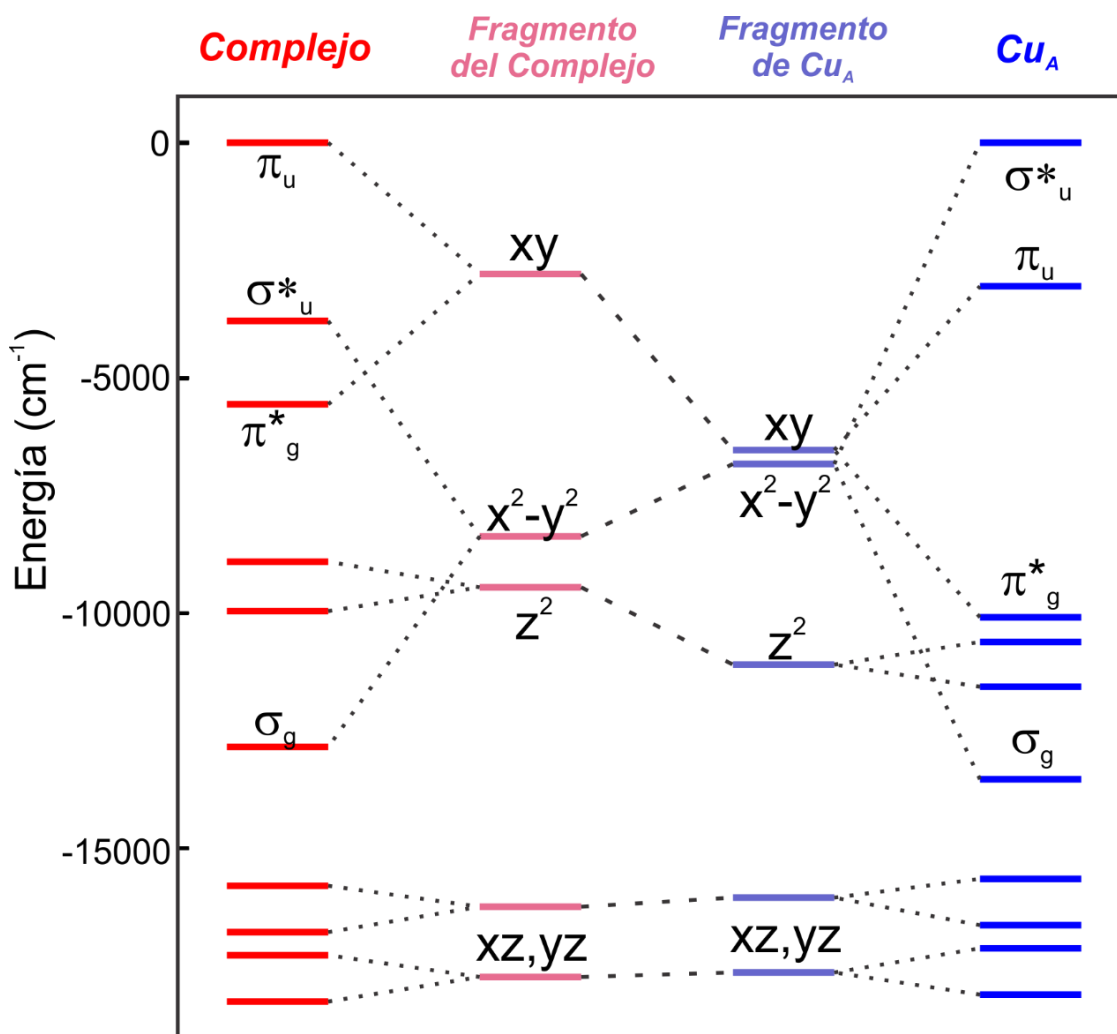


Figura 3-12. (Figura adaptada de Gamelin et al. 1998 ²⁶) *Diagrama de OM a partir de la combinación y desdoblamiento de los monómeros para (izquierda) un modelo inorgánico, con débil interacción entre los iones metálicos (ej.: complejo de Tolman, complejo de Duboc), y (derecha) un modelo biológico, con fuerte interacción entre los iones metálicos (ej.: Cu_A-Azu, Tt-Cu_A).*

Si bien hubo consenso inmediato en el carácter π_u del primer estado excitado en el sitio de Cu_A, la determinación de su energía relativa, es decir, la diferencia de energía entre el estado fundamental σ_u^* y el primer excitado π_u ($\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$), fue fuente de controversia. Mientras algunos estudios por EPR mostraban valores de entre 3000 y 5000 cm⁻¹ ^{26,67}, los resultados a partir de experimentos por RMN se encontraban entre 350 y 600 cm⁻¹ ^{68,69}. Esta ambigüedad fue resuelta a partir de cálculos TD-DFT, que permitieron caracterizar la (híper) superficie de energía potencial (SEP) de ambos estados electrónicos, apoyados por nuevos experimentos de EPR y RMN que completaron dichos estudios. Se determinó que los dos estados están fuertemente acoplados, formando una superficie adiabática con doble pozo donde la transición entre

ambos depende de la distancia Cu-Cu ⁶⁶ (figura 3-13). Los bajos valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ medidos por RMN corresponden a la diferencia de energía entre ambos estados electrónicos en sus respectivas geometrías de equilibrio. Estas distintas geometrías están caracterizadas por la distancia Cu-Cu, de 2,5 Å para σ_u^* y 3,1 Å para π_u . Por otra parte, mediante EPR se mide el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de una transición vertical hacia el estado excitado π_u con la geometría del estado σ_u^* ⁵³. Entonces, en su forma oxidada el sitio de Cu_A es un centro de VM cuya estructura electrónica puede ser descrita por una SEP en función de la distancia Cu-Cu, con dos mínimos correspondientes a estados fundamentales cuasi degenerados: un estado σ_u^* y un estado π_u (figura 3-13).

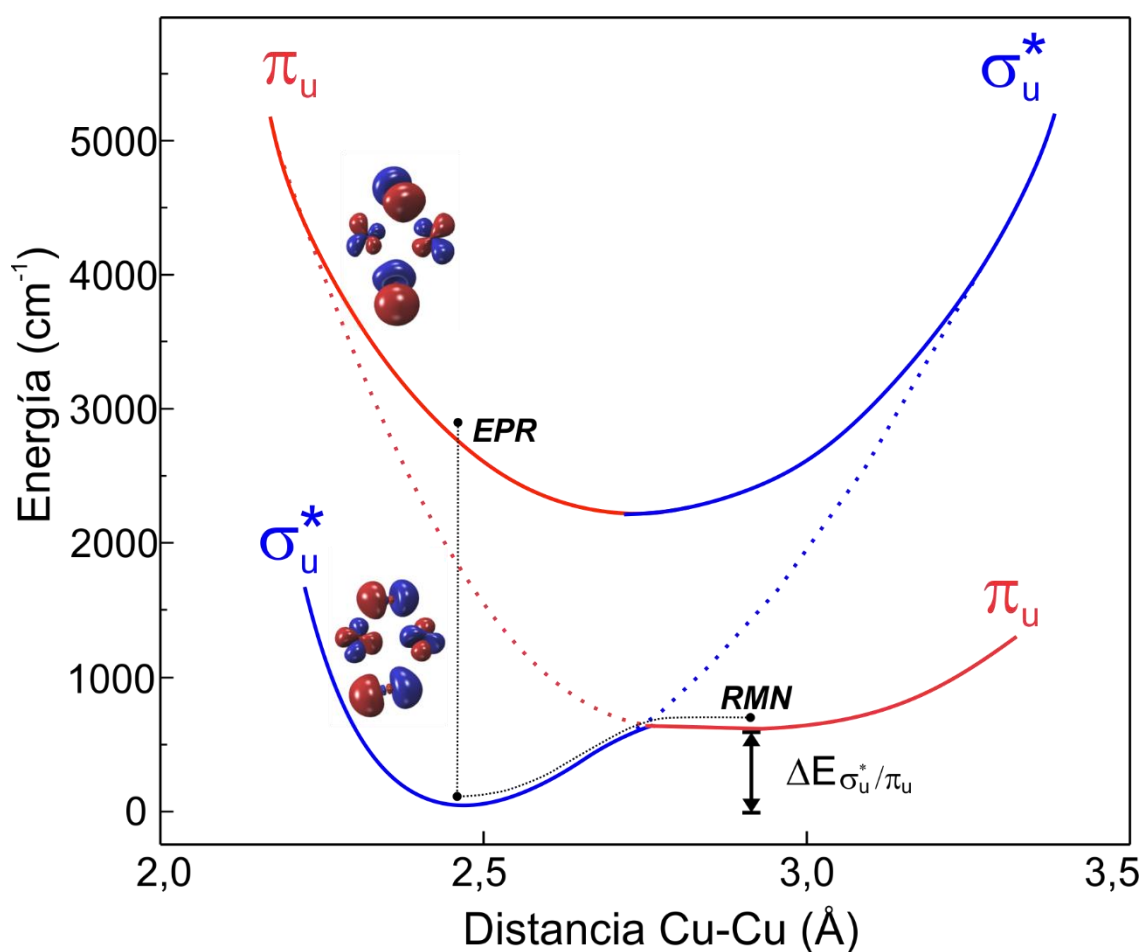


Figura 3-13. Representación esquemática de la SEP del sitio de Cu_A en función de la distancia entre los átomos de cobre para el estado fundamental y el primer estado excitado electrónico. En línea punteada fina se marcan las transiciones medidas mediante EPR (vertical) y RMN (adiabática).

Este resultado implica que el estado π_u es térmicamente accesible a temperatura ambiente, aunque la población estimada en base a la ley de Boltzman es de aproximadamente el 5% ⁶⁹. Más aún, resultados de RMN paramagnético indican que hay

una rápida interconversión entre ambos estados ⁶⁹. Sin embargo, cálculos DFT sugieren que el valor de λ del estado electrónico π_u sería aproximadamente un 50% mayor al del estado σ_u^* , en cuyo caso la eficiencia de la TE resultaría mucho menor. A raíz del presunto valor elevado de λ y de su bajo poblamiento a temperatura ambiente, se desestimó la relevancia que pudiera tener el estado π_u , asumiendo que el único orbital redox activo (RAMO) es el σ_u^* ^{53,66}. No obstante, estas conclusiones han sido y siguen siendo objeto de intenso debate. Estudios en nuestro laboratorio sugieren que el estado π_u es capaz de actuar como RAMO en ciertas condiciones, postulándose que cumple un rol fundamental en la regulación y la direccionalidad de la TE *in vivo* ^{22,63,70,71}. Acerca de este punto se profundizará y discutirá extensamente a lo largo del capítulo 4.

Si bien los avances que se han producido en el conocimiento del sitio de Cu_A en estos últimos años han sido notables, persisten aún numerosos puntos controversiales e interrogantes que no han encontrado respuesta acerca de características centrales en su función biológica. El objetivo primordial de este capítulo es profundizar en la caracterización de aspectos estructurales y termodinámicos de este sitio en el modelo nativo Tt-Cu_A a partir del estudio de distintas mutantes, utilizando conjuntamente técnicas espectroscópicas y electroquímicas. En el capítulo 4 se avanzará sobre otros aspectos del sitio de Cu_A, tales como su comportamiento en condiciones de adsorción sobre superficies biocompatibles, el efecto de distintas perturbaciones en el entorno y el estudio cinético de la TE.

3.2- Resultados.

A lo largo de este capítulo se presentarán los resultados de diversos estudios realizados sobre el sitio de Cu_A silvestre de *Thermus Thermophilus* y mutantes de primera y segunda esfera de coordinación. Los objetivos específicos de este primer capítulo experimental son caracterizar con el mayor grado de detalle posible la forma en que las distintas alteraciones de la coordinación del centro bimetalico afectan sus propiedades espectroscópicas y termodinámicas. Mediante las estrategias de mutaciones puntuales e ingeniería de bucles se pretende obtener conclusiones sobre los factores que determinan las propiedades electrónicas del sitio nativo, y que en última instancia determinarán los mecanismos regulatorios de la TE.

Producidas las muestras (ver detalles en la sección 2.1.2) se procedió a caracterizar al Cu_A nativo y las mutantes mediante diversas técnicas espectroscópicas, como RMN paramagnético, EPR, absorción UV-Vis y Raman resonante (RR), como también técnicas electroquímicas, principalmente voltametría cíclica (VC). Los experimentos de RMN paramagnético y EPR fueron realizados por el grupo colaborador del Prof. Alejandro Vila, del Instituto de Biología Molecular de Rosario y en la facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad del Litoral, respectivamente. Las muestras proteicas, fueron producidas en dicho grupo con participación activa de este tesista.

3.2.1- Efectos de mutaciones puntuales en la primera esfera de coordinación: caracterización espectroscópica.

Como se discutió en la sección introductoria, no existe un consenso establecido acerca del rol del ligando axial metionina 160 (M160) en las propiedades espectroscópicas y funcionales del sitio de Cu_A. Algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio a partir de diversas mutantes puntuales de la metionina 160 (en conjunto con otros resultados de literatura) presentan una oportunidad para el abordaje de este tema^{17,57,63,72} (ver detalles en 3.1.4). En el marco de esta tesis se estudiaron en particular las mutantes M160Q y M160H, en las cuales el ligando axial débil M160 es reemplazado por una glutamina (Q) y por una histidina (H) respectivamente (Figura 3-14).

En primer lugar, experimentos previos de EPR corroboran que en su estado oxidado el sitio de Cu_A es un centro de VM, mientras que determinaciones por RMN paramagnético indican que el centro redox mantiene la conectividad de todos sus ligandos para ambas mutantes en el estado oxidado^{23,68,69}. Además, estudios EPR sobre diversas mutantes puntuales, entre ellas M160H y M160Q, confirmaron que el carácter de VM se conserva en todos los casos^{17,57,72}. La utilización de absorción de rayos X extendida a la estructura fina (EXAFS) fue también de gran ayuda en la caracterización estructural de Tt-Cu_A y estas mutantes puntuales, no sólo por la calidad de los datos que aporta, sino porque es una de las pocas técnicas que permite interrogar experimental-

mente al Cu_A en estado reducido ⁷³. Fue a partir de esta técnica que se estableció de manera concluyente que ninguna de las mutantes puntuales presenta diferencias estructurales significativas en la geometría del sitio redox respecto de Tt-Cu_A. Además, los resultados mostraron que, en su forma reducida, el sitio mantiene también su integridad estructural, presentando variaciones geométricas mínimas, que no superan los 0,03 Å en la primera esfera de coordinación ^{16,63}.

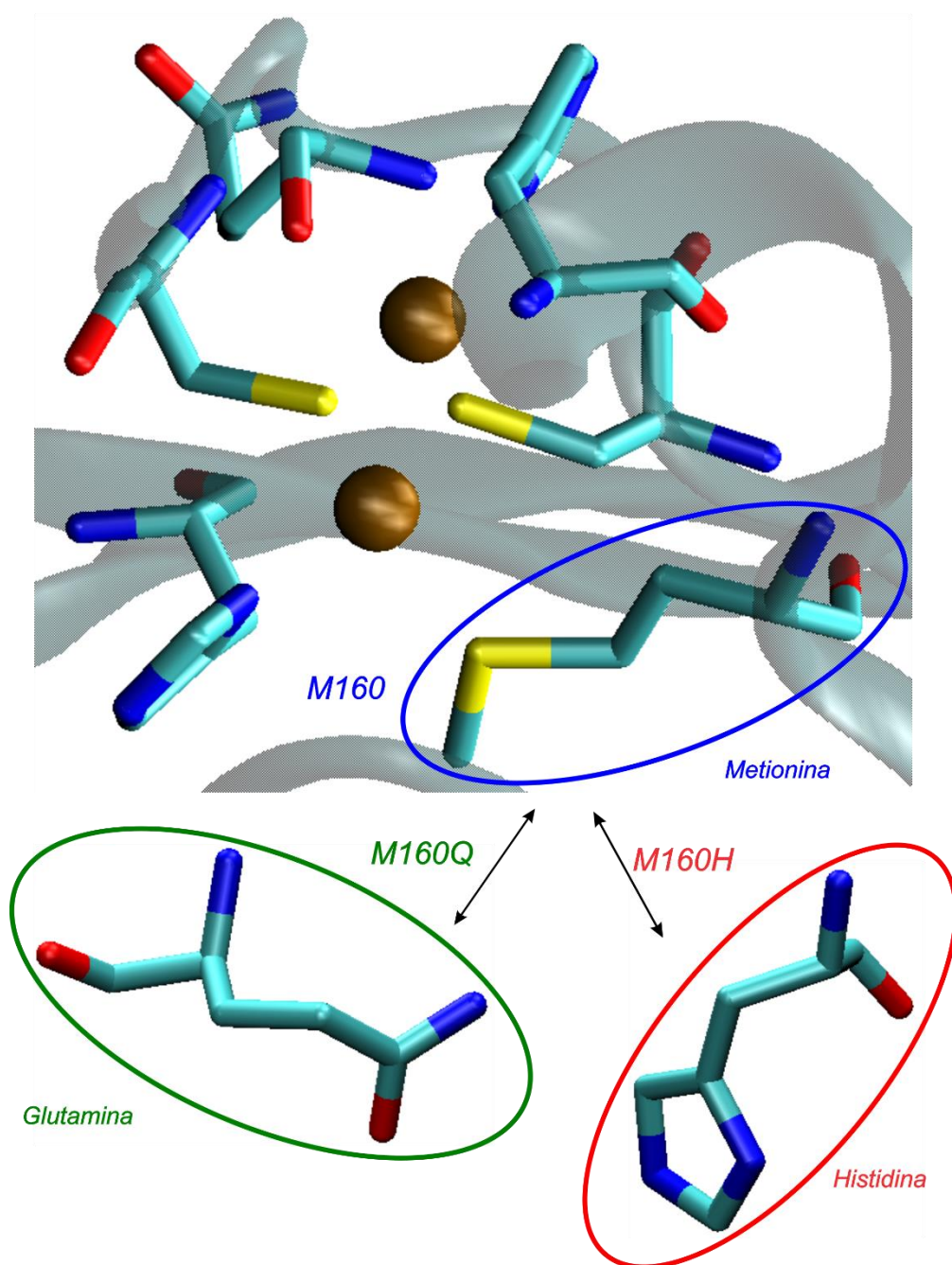


Figura 3-14. Representación de las mutaciones puntuales del ligando axial débil M160 (azul) por una glutamina, generando la mutante M160Q (verde), y por una histidina, generando la mutante M160H (rojo).

Los espectros de absorción UV-Vis de Tt-Cu_A y M160Q resultan prácticamente indistinguibles, mientras que la variante M160H muestra claras diferencias (figura 3-15 B). Estos espectros tienen el mismo tipo de forma general, dominados por dos bandas muy intensas parcialmente superpuestas alrededor de 20000 cm⁻¹ que corresponden a transiciones de transferencia de carga ligando metal (TCLM) S_{Cys}→Cu. Presentan además una banda de menor intensidad hacia los 28000 cm⁻¹ correspondiente a una transición de TCLM N_{His}→Cu y otra banda también de baja intensidad cerca de los 12000 cm⁻¹ que corresponde a la transición $\psi \rightarrow \psi^*$ (llamada también banda de intervalencia), producto de la promoción de un electrón del orbital molecular Cu-Cu ligante (totalmente ocupado) al antiligante (parcialmente ocupado).

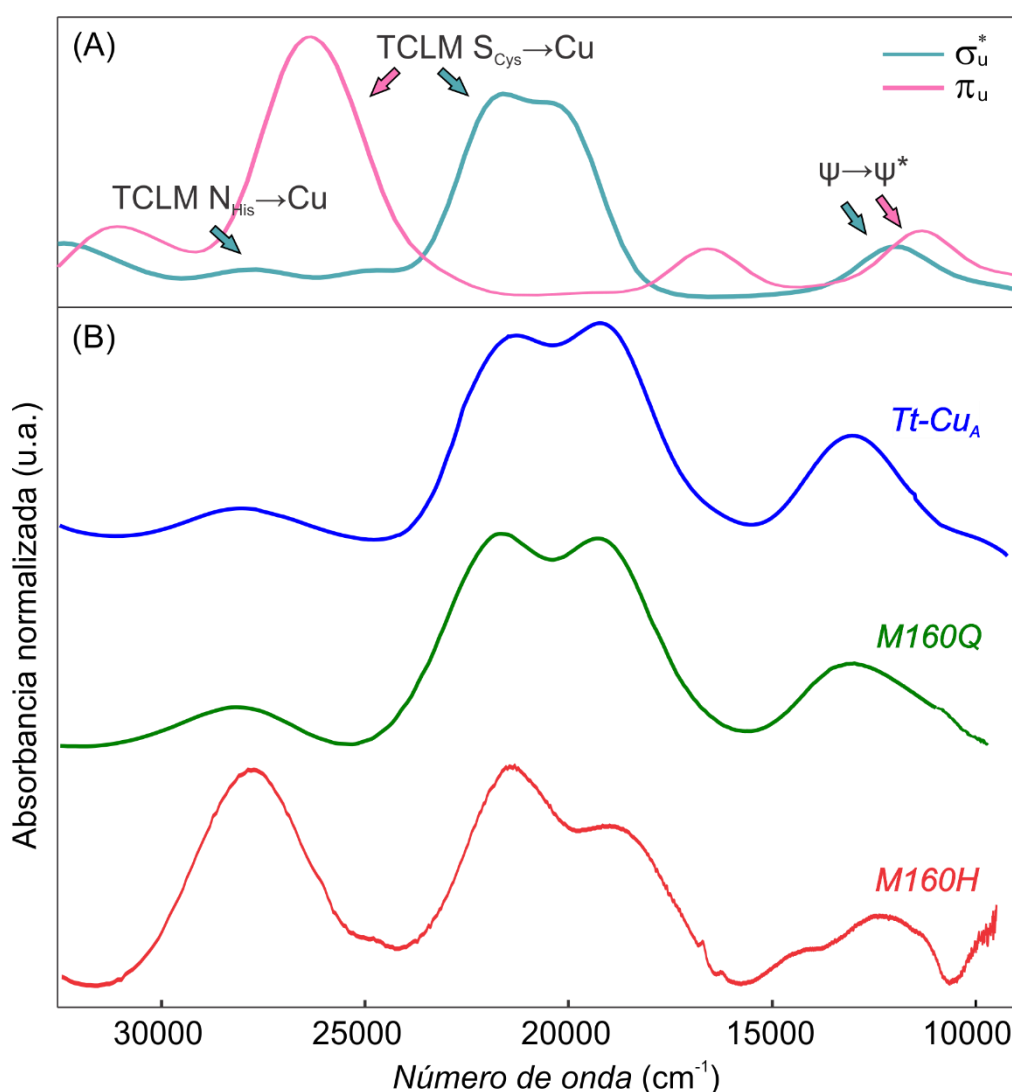


Figura 3-15. (A) Espectros UV-Vis simulados de Tt-Cu_A en sus estados fundamentales alternativos: σ_u^* (celeste) y π_u (rosa), se indican las bandas de TCLM S_{Cys}→Cu y de $\psi \rightarrow \psi^*$, importantes en los análisis de los espectros experimentales. (B) Espectros UV-Vis experimentales (normalizados) de Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde) y M160H (rojo).

Se realizaron en nuestro laboratorio cálculos TD-DFT sobre las geometrías de equilibrio para ambos estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u de Tt-Cu_A, a fin de obtener los espectros simulados para cada uno ⁶³ (figura 3-15 A). En ellos se observa un fuerte corrimiento de la banda correspondiente a la TCLM S_{Cys}→Cu, que para el estado σ_u^* se ubica en torno a los 21000 cm⁻¹ mientras que para el estado π_u está en torno a los 27000 cm⁻¹. De la comparación de estos espectros simulados con los obtenidos experimentalmente surge que estos últimos pueden interpretarse como la convolución de los espectros UV-Vis de ambos estados fundamentales. Así, Tt-Cu_A y M160Q presentan espectros dominados por la contribución del estado fundamental σ_u^* , lo cual es consistente con resultados previos que indican un poblamiento relativo del 5% del estado alternativo π_u en Tt-Cu_A ⁶⁹ (figura 3-15 B). Por su parte, un escrutinio visual del espectro UV-Vis de M160H indica, en términos de esta interpretación, una mayor contribución del estado alternativo π_u dada la mayor intensidad relativa de la correspondiente banda de TCLM S_{Cys}→Cu.

Un análisis más minucioso de los espectros simulados muestra un corrimiento hacia el rojo de la banda de intervalencia del estado alternativo π_u respecto del estado fundamental σ_u^* (figura 3-15 A). Tal desplazamiento es indicativo de una disminución de la interacción entre los iones metálicos, característica distintiva de algunos complejos inorgánicos que emulan al sitio de Cu_A, y presentan un HOMO de tipo π_u ²⁶ (ver 3.1.5). Esta diferencia es consistente con la interpretación de los espectros experimentales, ya que M160H presenta el mismo tipo de corrimiento respecto de las otras dos variantes (figura 3-15 B). Por lo tanto, los espectros UV-Vis sugieren que el ligando axial M160 del sitio de Cu_A es determinante en el equilibrio entre ambos estados fundamentales alternativos y las perturbaciones producidas por su mutación puntual son capaces de alterarlo, lo cual implicaría que el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ depende de la identidad del ligando axial.

La interpretación propuesta para los distintos espectros UV-Vis experimentales (a partir de los simulados) invoca la coexistencia de (al menos) dos especies distintas en las muestras: el sitio de Cu_A en el estado fundamental σ_u^* y en el estado alternativo π_u . Considerando al sistema en términos de la ley de distribución de Boltzman, es claro que, a temperatura más alta, mayor será la población del estado alternativo π_u . Los espectros UV-Vis de las tres variantes fueron medidos en función de la temperatura, observándose el comportamiento esperado. En todos los casos se ve un aumento relativo de la banda de TCLM S_{Cys}→Cu del estado alternativo π_u , y el correspondiente corrimiento hacia el rojo de la banda de intervalencia (figura 3-16).

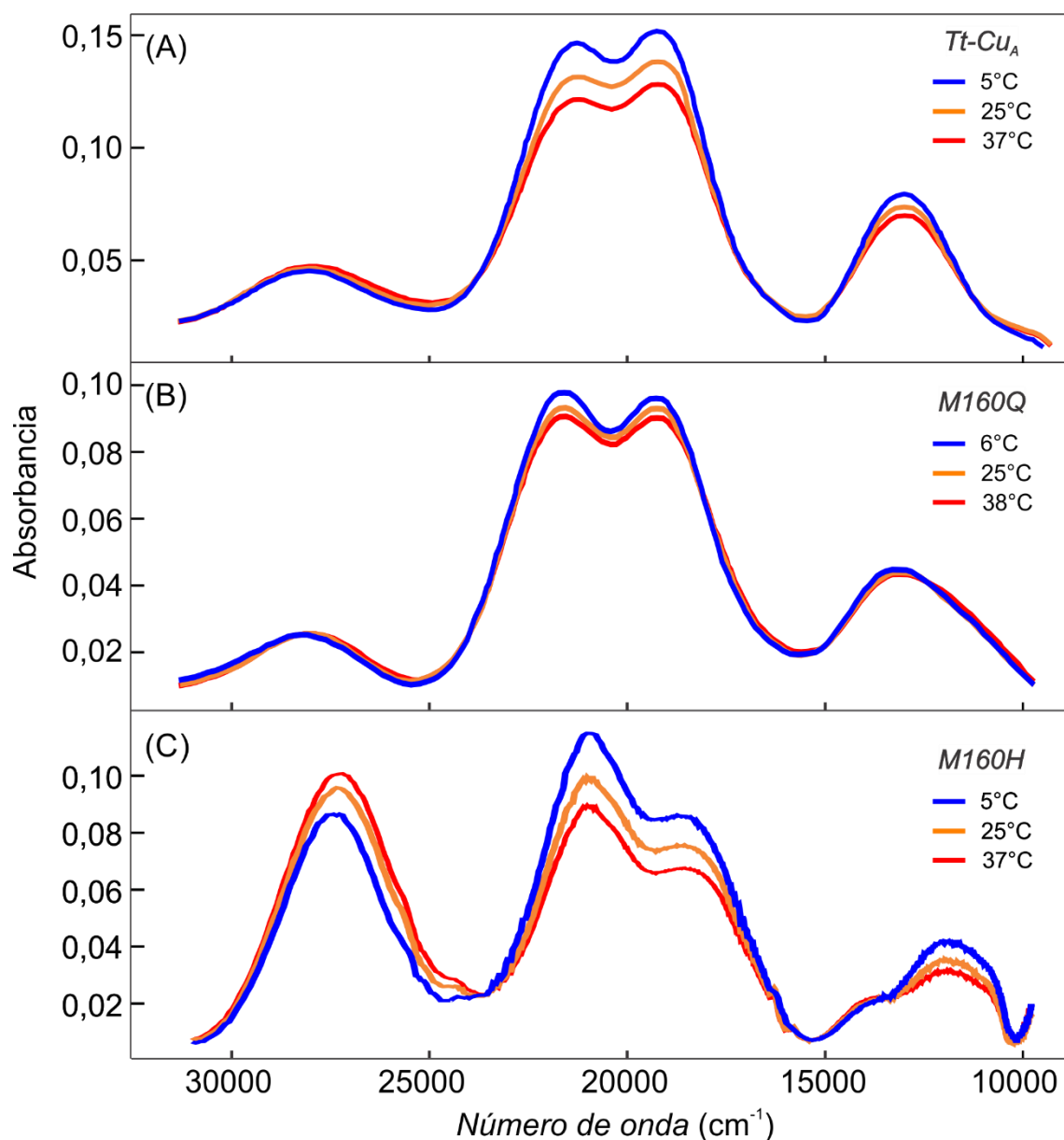


Figura 3-16. Espectros UV-Vis medidos en función de la temperatura. Se muestran como ejemplo un espectro a temperatura baja (azul), uno a temperatura media (naranja) y otro a temperatura alta (rojo) para (A) Tt-Cu_A, (B) M160Q y (C) M160H. En todos los casos, aumenta la componente atribuida al espectro del estado alternativo π_u con la temperatura, como es de esperar a partir de la ley de distribución de Boltzman.

Si bien los espectros UV-Vis, y su dependencia con la temperatura, son consistentes con la interconversión térmica entre estados fundamentales alternativos ($\sigma_u^* \leftrightarrow \pi_u$), es posible postular explicaciones alternativas, como por ejemplo que las mutaciones de ligando axial alteren la descripción electrónica del estado fundamental σ_u^* . Si este fuera el caso, se evidenciarían distorsiones en los espectros vibracionales, ya que el detalle de la estructura electrónica afecta de manera directa las energías de los diversos modos

vibracionales del sitio. La espectroscopia Raman resonante (RR) brindó la posibilidad de abordar este aspecto en las tres variantes (ver detalles en secciones 1.4.2 y 2.3.1). Se adquirieron espectros RR utilizando un láser de excitación de 514 nm (19455 cm^{-1}), en resonancia con la banda de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado fundamental σ_u^* (figura 3-15), por lo que se ven intensificados los modos en los que participa el motivo Cu_2S_2 (figura 3-17). En este experimento el estado alternativo π_u resulta invisible dado que el marcado desplazamiento hacia el violeta de banda de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ impide la resonancia con este láser de excitación, razón por la cual estas medidas permiten monitorear selectivamente al estado fundamental σ_u^* . Con el objetivo de maximizar el poblamiento de dicho estado y de optimizar la relación señal/ruido, estos espectros fueron obtenidos a temperaturas criogénicas, utilizando refrigeración por circulación de nitrógeno líquido a 77°K .

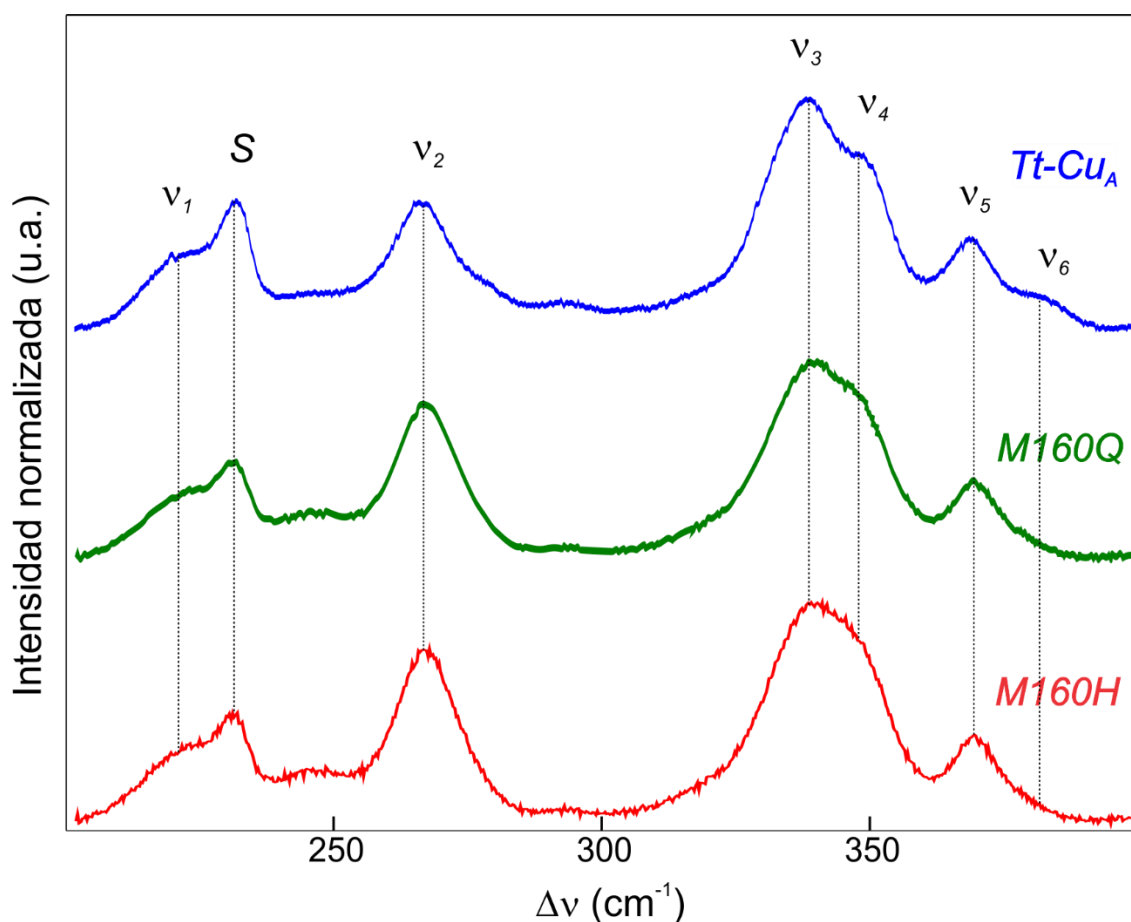


Figura 3-17. Espectros RR de $Tt\text{-Cu}_A$ (azul), M160Q (verde) y M160H (rojo) obtenidos con láser de excitación a 514 nm y a una temperatura de 77 K. Las líneas punteadas marcan la posición de las bandas observadas (S corresponde al solvente), que se mantienen inalteradas en todos los casos.

La asignación de la mayoría de las bandas de los espectros RR fue previamente realizada para el sitio de Cu_A de *P. denitrificans*, con excepción de ν_4 (348 cm⁻¹) y ν_6 (385 cm⁻¹)²⁷ (figura 3-18). La banda ν_2 (267 cm⁻¹) se corresponde con la combinación de movimientos de estiramientos Cu-N_{His} y Cu-S_{Cys}, mientras que ν_3 (338 cm⁻¹) resulta del estiramiento totalmente simétrico del rombo Cu₂S₂. Ambas son las que dominan los espectros RR de todos los centros de Cu_A. La banda ν_1 (219 cm⁻¹) viene dada por la combinación asimétrica de los estiramientos Cu-N y Cu-S y ν_5 (370 cm⁻¹) corresponde al estiramiento asimétrico del rombo Cu₂S₂ (figura 3-18). Las bandas ν_6 (385 cm⁻¹) de pequeña intensidad y ν_4 (348 cm⁻¹) de mayor intensidad, no se encuentran presentes en el sitio Cu_A de *P. denitrificans* por lo que no tienen asignación. En particular, ν_4 pudo haber resultado indetectable a causa de su proximidad (y posible superposición) con la intensa banda ν_3 , ya sea por haberse asignado en espectros de menor resolución o porque en *P. denitrificans* ν_4 y ν_3 tengan valores aún más cercanos.

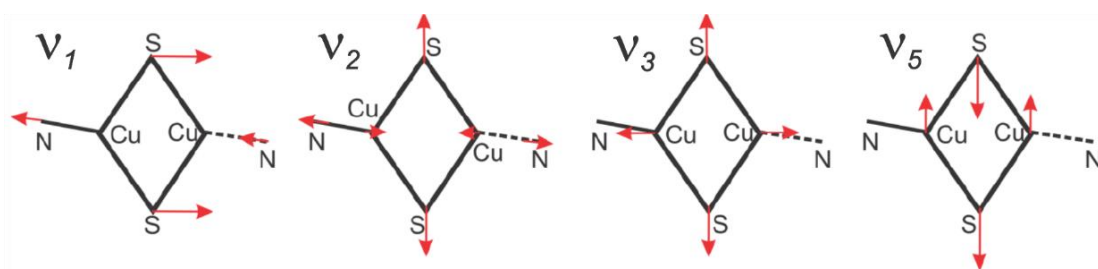


Figura 3-18. Representación esquemática de los cuatro modos normales asignados a bandas detectables mediante RR empleando excitación de 514 nm.

Los espectros RR de las tres variantes resultan prácticamente indistinguibles, indicando que la estructura electrónica del estado fundamental σ_u^* permanece inalterada, y sumando además nueva evidencia acerca del carácter robusto del sitio de Cu_A (figura 3-17). Para poder comprobar si esta conclusión es extensible al estado alternativo π_u se podrían obtener espectros RR en resonancia con la correspondiente banda de TCLM S_{Cys}→Cu, pero desafortunadamente el laboratorio no cuenta con las líneas láser necesarias para tal fin. Por otra parte, dicha medición enfrentaría problemas propios del sistema experimental, ya que para maximizar la población relativa del estado alternativo π_u es necesario aumentar la temperatura, pero sensiblemente la calidad de los espectros RR, ensanchando fuertemente las bandas medidas y disminuyendo la relación señal/ruido⁷⁴.

En suma, los resultados brindados por las espectroscopias RR y UV-Vis, en conjunto con los antecedentes brindados por EPR^{57,72,75}, sugieren que las mutaciones de ligando axial analizadas modifican el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sin producir otras alteraciones significativas. Para contrastar esta hipótesis es necesario cuantificar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$.

en las tres variantes, lo cual es posible a partir de experimentos de RMN paramagnético. La metodología implica estudiar los desplazamientos químicos (δ) corregidos (sensibles al valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$) restando la contribución diamagnética a diferentes temperaturas, determinando su dependencia con dicho parámetro (ver detalles en el sección 2.4.2). En particular, el δ de los β - ^1H de la cisteína 153 y del α - ^{13}C de la cisteína 149 (C149C α) son muy sensibles al valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ ⁶⁹. Esto es consecuencia directa de la geometría del sitio de Cu_A y de la distinta distribución de espín que presentan ambos estados fundamentales alternativos (σ_u^* y π_u). A partir de los ángulos diedros S-S-C β -H β /C α , de aproximadamente 90°, el estado fundamental σ_u^* presenta una baja densidad de spin desapareado sobre el C α 149 y los H β 153, mientras que en el estado alternativo π_u la densidad de spin desapareado sobre estos átomos es mucho mayor. De hecho, el δ del C α 149 muestra grandes diferencias entre las distintas variantes, con valores de 153,3 ppm; 249,6 ppm y 830,3 ppm para M160Q, Tt-Cu_A y M160H respectivamente⁶³ (figura 3-19).

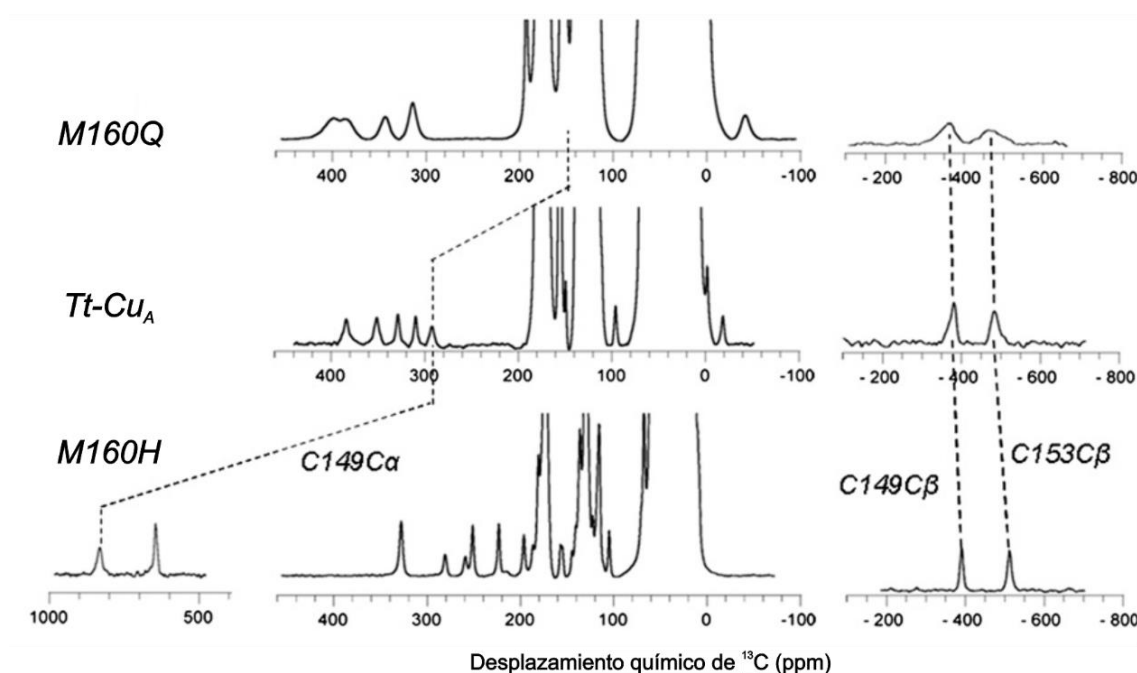


Figura 3-19. (Figura adaptada de Abriata et al. 2012⁶³) Espectros ^{13}C RMN paramagnético de M160Q (arriba), Tt-Cu_A (medio) y M160H (abajo). Se marcan con línea punteada los δ de los carbonos cisteínicos coordinantes del sitio redox. El análisis del comportamiento anti Curie de estos δ permiten determinar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$.

Evaluando la dependencia anti-Curie de los δ en base a la distribución de Boltzman para un modelo de dos estados, se determinó un valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ para M160H, Tt-Cu_A y M160Q de 200 cm⁻¹, 600 cm⁻¹ y 900 cm⁻¹ respectivamente⁶³ (Tabla 3-2). A partir de la

ley de distribución de Boltzman y del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ se puede determinar el poblamiento de ambos estados fundamentales alternativos. Para este sistema en particular, considerando ambos estados fundamentales como los únicos estados poblados a temperatura ambiente, y la diferencia de energía entre ellos, se puede expresar la población relativa del estado alternativo π_u (P_{π_u}) en función de sólo dos variables (siendo $1-P_{\pi_u}$ la población relativa del estado σ_u^*):

$$P_{\pi_u} = \frac{\exp(-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T)}{1 + \exp(-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T)} \quad (1)$$

Empleando este tratamiento para un sistema de dos estados, se puede determinar el poblamiento del estado alternativo π_u conociendo su energía (relativa al estado σ_u^*). Así, para estos valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ se estimó P_{π_u} a partir de la ecuación (1), siendo de 28 %, 5 % y 1 % a 25°C para M160H, Tt-Cu_A y M160Q respectivamente (Tabla 3-2). Estos resultados concuerdan con lo observado en los espectros UV-Vis, donde las contribuciones espectrales atribuidas al estado alternativo π_u son mayores para M160H que para las otras dos variantes (figura 3-15), y donde el aumento de temperatura trae aparejado un aumento de tales contribuciones para todas las variantes (figura 3-16).

Tabla 3-2. Valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y de la población relativa de ambos estados fundamentales alternativos para Tt-Cu_A, M160Q y M160H, obtenidos a partir del análisis de espectros RMN paramagnético en función de la temperatura y la ley de Boltzman ⁶³.

Proteína	$\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (cm ⁻¹)	Población ($\sigma_u^*:\pi_u$)
Tt-Cu _A	600	95:5
M160Q	900	99:1
M160H	200	72:28

3.2.2- Efectos de mutaciones de segunda esfera de coordinación, caracterización espectroscópica.

Las mutaciones puntuales sobre el ligando axial débil M160 ofrecen una poderosa herramienta para el estudio del sitio de Cu_A. No obstante, este sitio redox aparece altamente conservado en la naturaleza, no sólo en la identidad de los residuos de primera esfera de coordinación, sino también en el número de residuos que constituyen los tres bucles que conforman al propio sitio activo ^{4,76} (figura 3-20). La variabilidad observada se limita entonces a la identidad de algunos residuos no coordinantes en dichos bucles, lo que implica cambios sólo en interacciones de segunda (o superior) esfera de coordinación. Por otra parte, distintos resultados de medidas por RMN y

cálculos computacionales indican que la región delimitada por estos tres bucles corresponde a la zona de interacción de la CcO con su *partner* biológico, el Cyt *c*⁷⁷, y que pequeñas perturbaciones en dichos bucles pueden promover un aumento en la población del estado alternativo π_u ⁶³. Estas dos características actuaron como inspiración para la construcción de sistemas donde se alteren la identidad de residuos no coordinantes de estos tres bucles, es decir, aquellos que presentan variabilidad en la naturaleza. La estrategia elegida en el grupo de trabajo para este nuevo enfoque fue la ingeniería de bucles, a partir de la cual se buscó diseñar una proteína que permitiera estudiar este tipo de perturbaciones sobre el sitio nativo de Cu_A.

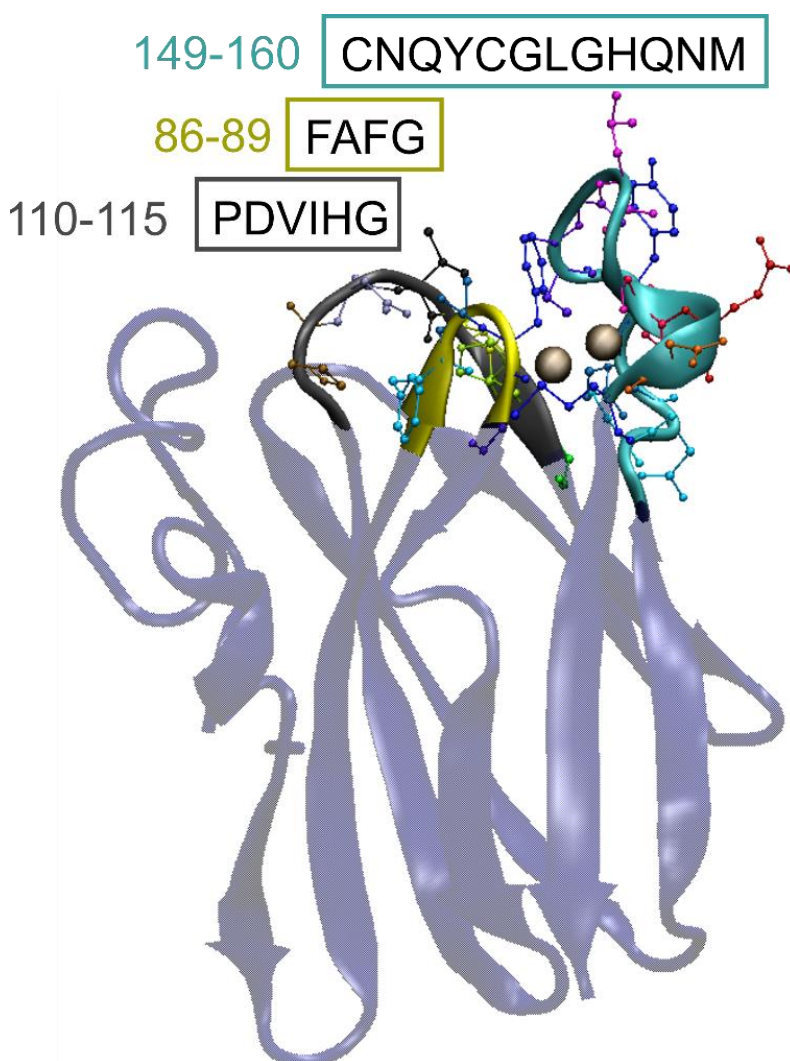


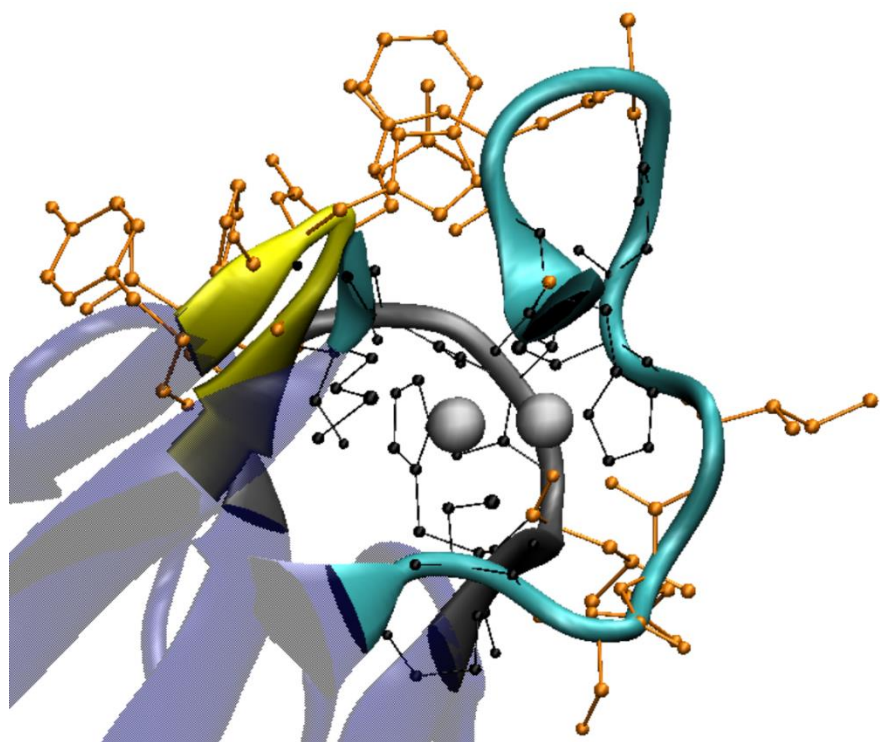
Figura 3-20. Representación esquemática de Tt-Cu_A (2CUA en PDB) donde se destacan los 3 bucles (amarillo, gris y cian) que definen el entorno de los iones metálicos (plateado) y las interacciones de segunda esfera, que son reemplazados por los de la secuencia homóloga humana en Tt-3L. Se muestran en distintos colores los aminoácidos que conforman dichos bucles, y se detallan sus secuencias aminoacídicas.

Se produjo entonces una proteína quimérica, denominada Tt-3L, a partir de reemplazar los tres bucles que definen el entorno de los iones metálicos en Tt-Cu_A por los de la secuencia homóloga humana (figuras 3-20 y 3-21). El más corto de ellos consta de 4 aminoácidos, es el único que no presenta ningún residuo coordinante y se encuentra íntegramente modificado (F86H, A87Q, F88W y G89Y). El siguiente bucle en cuanto a longitud consta de 6 aminoácidos, uno de ellos coordinante (H114), y sufre sólo dos mutaciones puntuales en Tt-3L como consecuencia del intercambio de secuencias (P110Q e I113L). El más largo de los tres bucles está constituido por 12 aminoácidos, de los cuales 5 son coordinantes (C149, Q151, C153, H157 y M160). El remplazo de este último bucle por la secuencia homóloga humana en Tt-3L da como resultado 6 mutaciones puntuales (N150S, Q151E, Y152I, L155A, G156N y Q158S). En suma, si bien estos tres bucles involucran en total 22 aminoácidos, Tt-3L presenta sólo 12 de ellos modificados respecto de Tt-Cu_A, manteniéndose inalterada tanto la primera esfera de coordinación del sitio redox como la longitud de los bucles que lo conforman ⁷¹ (figura 3-21). Cabe destacar que si bien la glutamina 151 se modifica por un ácido glutámico en Tt-3L (la mutación Q151E), no se altera la coordinación del sitio redox ya que es el carbonilo amídico el grupo químico coordinante, presente en todos los aminoácidos naturales a partir de la unión peptídica.

A los fines de completar un estudio más acabado sobre el efecto de mutaciones puntuales del ligando axial M160 y de mutaciones de segunda esfera de coordinación, fue diseñada una proteína que combina ambos tipos de perturbaciones. Sobre la mutante Tt-3L se realizó una mutación puntual del ligando axial M160 reemplazándolo por una histidina. Esto da como resultado una mutante de primera y segunda esfera de coordinación simultáneamente, denominada Tt-3L-M160H (figura 3-21). El estudio comparado del efecto de la mutación de primera esfera (a través de M160H), la de segunda esfera (a través de Tt-3L) y de la combinación de ambas (a través de Tt-3L-M160H) brindará información, entre otras cosas, de la aditividad (o no) del efecto de dos perturbaciones de distinta índole.

Se emplearon diversas técnicas espectroscópicas en la caracterización de las dos variantes novedosas con el fin de validar esta estrategia de ingeniería de bucles para el estudio del sitio de Cu_A, y en particular estos dos nuevos modelos. Una de las características fundamentales de los sitios de Cu_A en la naturaleza es el carácter de VM que presentan en su estado oxidado, lo cual puede ser determinado de manera directa y concluyente mediante espectroscopia EPR ²³. Los espectros de Cu_A presentan típicamente siete bandas en la región entre 2 y 2,3 del factor de desdoblamiento (g) debido al acoplamiento hiperfino del electrón desapareado con los núcleos de los átomos de cobres ¹⁹. Si bien para algunos modelos de Cu_A (entre ellos Tt-Cu_A) este acoplamiento no puede ser resuelto en los espectros EPR, en todos los casos se obtienen valores típicos de g en torno a 2,195 y 2,010 para g_{||} y g_⊥ respectivamente, confirmando el carácter VM en todos ellos ^{57,64,67,69,72,75,78}. Se realizaron entonces determinaciones

mediante EPR para Tt-3L y Tt-3L-M160H, obteniéndose espectros que no resuelven el acoplamiento hiperfino, al igual que Tt-Cu_A (figura 2-22). No obstante, ambas variantes presentan valores de $g_{\parallel}$ y $g_{\perp}$ que corroboran el carácter de valencia mixta en su estado oxidado (tabla 3-3). Este resultado, en conjunto con medidas preliminares de RMN paramagnético que confirman la conectividad de todos los ligandos del sitio, indican que en ambos modelos se preserva la integridad estructural y las características electrónicas fundamentales del modelo nativo.



Tt-Cu _A	F A F G	86-89
Tt-3L	H Q W Y	
Tt-Cu _A	P D V I H G	110-115
Tt-3L	Q D V L H G	
Tt-Cu _A	C N Q Y C G L G H Q N M	149-160
Tt-3L	C S E I C G A N H S N M	

Figura 3-21. Representación esquemática de Tt-3L donde se destacan los 3 bucles reemplazados (amarillo, gris y cian), distinguiendo por colores los 10 aminoácidos conservados (negro) de los 12 mutados. Abajo se compara la secuencia de los tres bucles, destacando en **negrita** los 6 ligandos de primera esfera, y marcando en **naranja** las 12 mutaciones puntuales que constituye el reemplazo de los tres bucles.

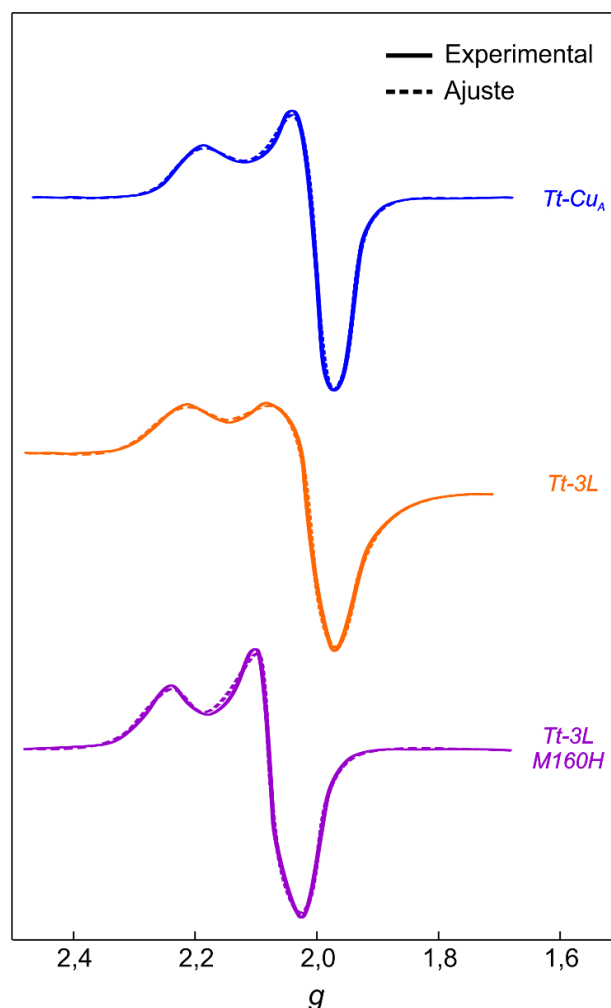


Figura 3-22. Espectros EPR (línea llena) y sus ajustes (línea punteada) de Tt-Cu_A (azul), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta). Los parámetros relevantes extraídos de los ajustes se presentan en la tabla 3-3.

Tabla 3-3. Valores de $g_{\parallel}$ y $g_{\perp}$ para Tt-Cu_A, Tt-3L y Tt-3L-M160H obtenidos a partir de los espectros EPR. La variabilidad casi nula con los valores de Tt-Cu_A corrobora el carácter de VM de ambas mutantes en su estado oxidado.

Parámetro	Tt-Cu _A	Tt-3L	Tt-3L-M160H
$g_{\perp}$	2,010	1,980	1,954
	2,010	2,010	2,020
$g_{\parallel}$	2,195	2,210	2,237

Por otra parte, tanto el espectro UV-Vis de Tt-3L como el de Tt-3L-M160H muestran claras diferencias respecto del de Tt-Cu_A, aunque mantienen sus características principales y el color púrpura típico de las proteínas de Cu_A (figura 3-23). La posición de la banda de intervalencia en el espectro de Tt-3L (en torno a los 12500 cm⁻¹) es indicativo

del acoplamiento entre ambos iones metálicos. El hecho de que el corrimiento observado sea menor a los 100 cm^{-1} da cuenta de una distancia Cu-Cu muy conservada. Además, la relación de intensidades entre ambas bandas de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado fundamental σ_u^* en torno a 20000 cm^{-1} presenta sólo cambios leves. La diferencia más destacada se observa en el marcado aumento de la intensidad relativa en la zona que se encuentra entre 27000 cm^{-1} y 28000 cm^{-1} , donde se superponen la banda de TCLM $N_{\text{His}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado fundamental σ_u^* , con la banda de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado alternativo π_u . Esta característica en el espectro de Tt-3L recuerda a lo observado en el caso de M160H (figura 3-15).

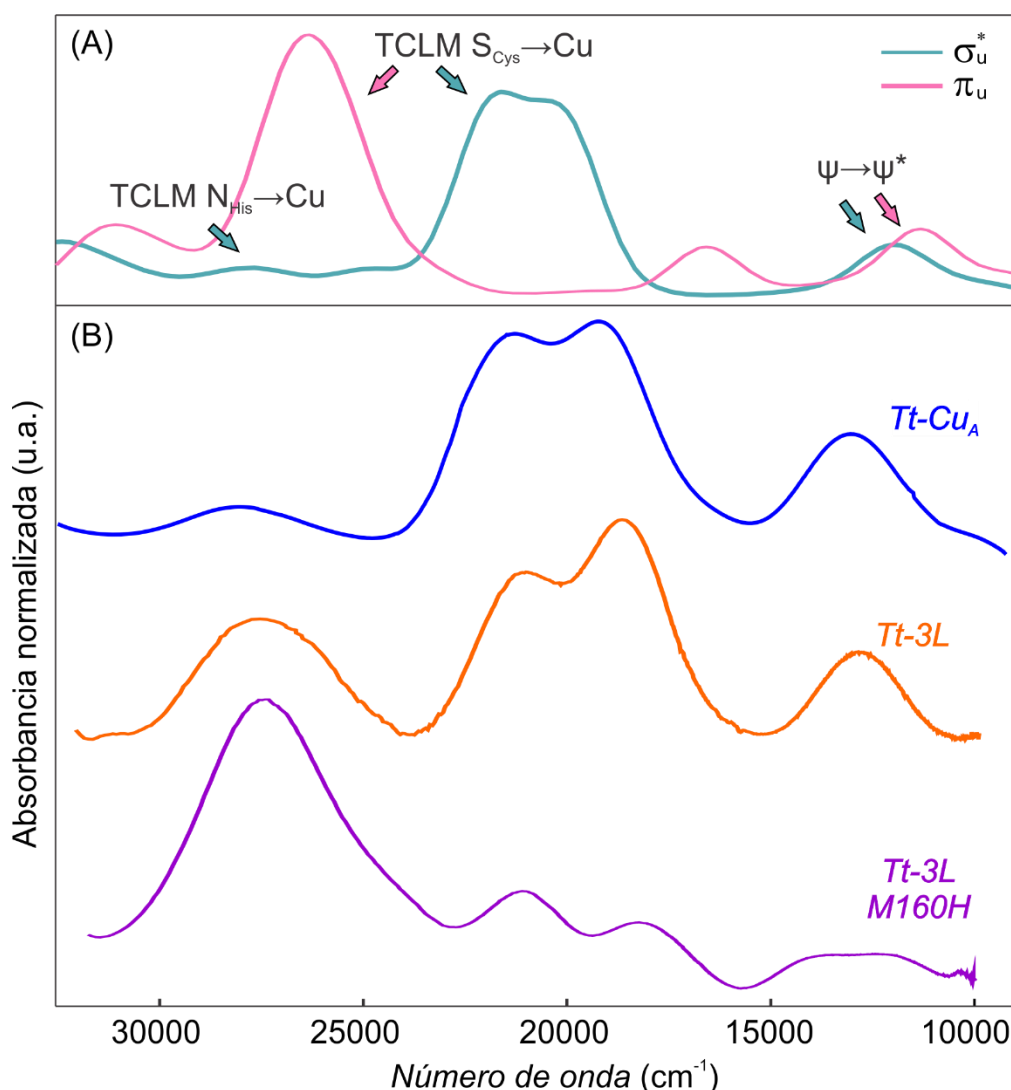


Figura 3-23. (A) Espectros UV-Vis simulados de Tt-Cu_A en sus estados fundamentales alternativos: σ_u^* (celeste) y π_u (rosa), se indican las bandas de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ y de $\psi \rightarrow \psi^*$, importantes en los análisis de los espectros experimentales. (B) Espectros UV-Vis experimentales de Tt-Cu_A (azul), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta).

Empleando el mismo análisis desarrollado en la sección anterior a partir de los espectros simulados para el sitio de Cu_A en ambos estados fundamentales alternativos, el espectro de Tt-3L indica un mayor poblamiento del estado alternativo π_u (figura 3-23). Este resultado sugiere que las mutaciones de segunda esfera perpetradas en Tt-3L promueven el poblamiento del estado alternativo π_u , pero sin alterar la coordinación del sitio redox, a diferencia de lo que ocurre en M160H, donde se observa un efecto similar a partir de una perturbación directa en la primera esfera de coordinación. Por su parte, el espectro de Tt-3L-M160H muestra mayores distorsiones respecto de Tt-Cu_A, en particular la intensificación relativa observada en la banda de TCLM S_{Cys}→Cu del estado alternativo π_u (cercana a 28000 cm⁻¹) es mucho más pronunciada, indicando una población relativa aún mayor (figura 3-23).

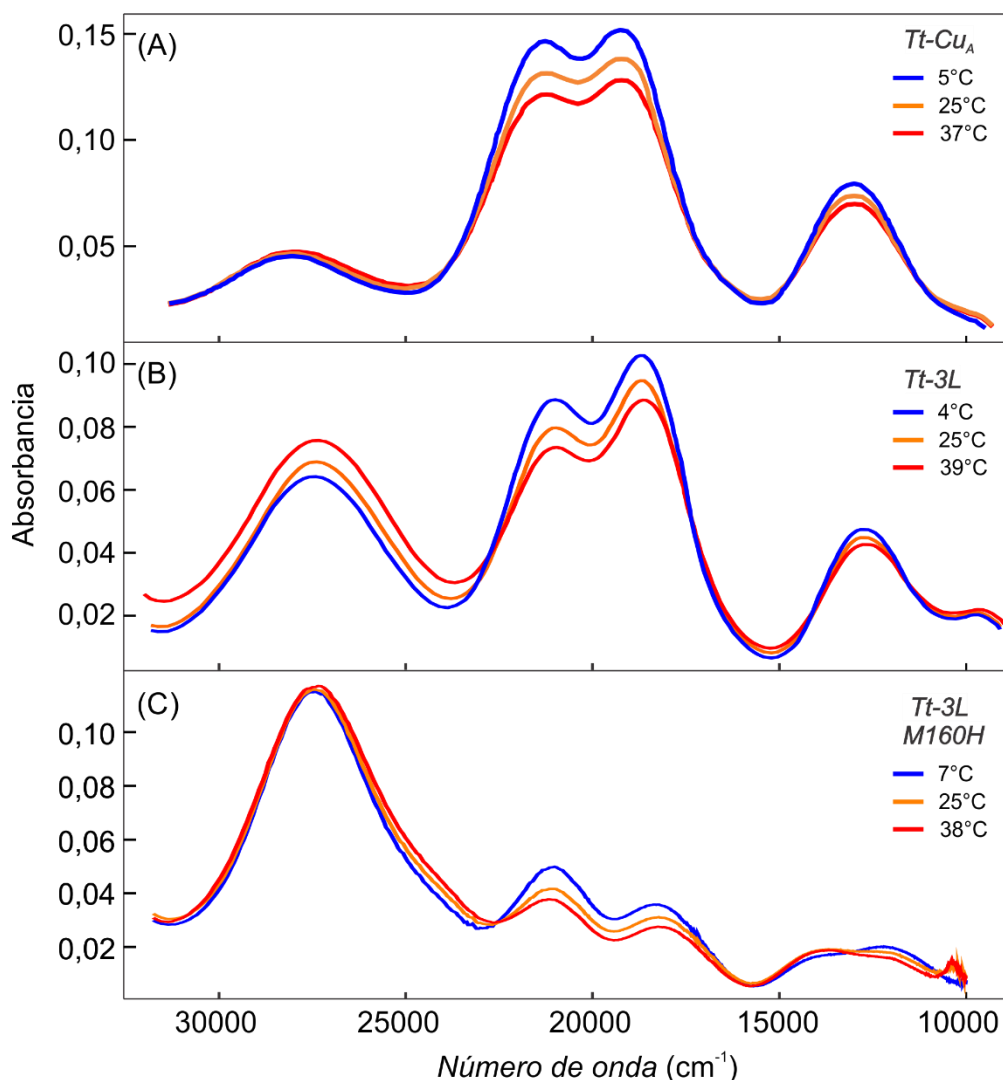


Figura 3-24. Espectros UV-Vis medidos en función de la temperatura. Se muestran como ejemplo un espectro a temperatura baja (azul), uno a temperatura media (naranja) y otro a temperatura alta (rojo) para (A) Tt-Cu_A, (B) Tt-3L y (C) Tt-3L-M160H.

Al igual que para las mutantes puntuales y teniendo en cuenta la ecuación (3), esto es, ley de distribución de Boltzman, es esperable que a temperatura más alta sea mayor la población del estado alternativo π_u . Medidas de los espectros de absorción UV-Vis de las dos variantes en función de la temperatura apoyan esta interpretación (figura 3-24). En ambos casos se observa que a mayor temperatura se incrementa la intensidad de las bandas que corresponden a la contribución del estado alternativo π_u y baja la intensidad de las bandas correspondientes a la contribución del estado fundamental σ_u^* . Dado que a mayor temperatura aumenta el poblamiento del estado π_u , se puede observar que si bien en Tt-3L-M160H ambos estados fundamentales parecen estar prácticamente degenerados, sigue siendo el estado σ_u^* el de menor energía (figura 3-24 C).

También para este caso la espectroscopia RR representa una herramienta muy útil a la hora de evaluar el impacto de las mutaciones introducidas en Tt-3L y Tt-3L-M160H sobre la descripción electrónica del estado fundamental σ_u^* . Se adquirieron entonces espectros RR en idénticas condiciones que los presentados en la sección anterior: empleando un láser de excitación de 514 nm (en resonancia con la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ del estado σ_u^* , viéndose intensificados los modos donde participa el motivo Cu_2S_2), y trabajando a pH7 y a 77 K (figura 3-25). Como ya fue comentado, la asignación de la mayoría de las bandas fue reportada previamente para el sitio de Cu_A de *P. denitrificans*, a excepción de ν_4 y ν_6 ²⁷ (figura 3-18).

Los espectros RR de las tres variantes resultan muy similares, aunque presentan algunas diferencias sutiles. La posición de la banda ν_1 (219 cm^{-1}) se muestra inalterada en ambas mutantes respecto de Tt- Cu_A , mientras que las bandas ν_2 (267 cm^{-1}), ν_3 (338 cm^{-1}) y ν_5 (370 cm^{-1}) muestran leves corrimientos de -2 cm^{-1} (265 cm^{-1}), 1 cm^{-1} (339 cm^{-1}) y 3 cm^{-1} (373 cm^{-1}), respectiva-mente, en ambas variantes. La banda ν_4 (348 cm^{-1}) se muestra inalterada en Tt-3L-M160H mientras que en Tt-3L se encuentra a energías ligeramente superiores, en 351 cm^{-1} . Por último, la banda ν_6 , que aparece como un hombro débil a 385 cm^{-1} en Tt- Cu_A , mantiene la misma posición en Tt-3L aunque con menor intensidad y se torna imperceptible en Tt-3L-M160H. Diferencias tan pequeñas no pueden atribuirse a un cambio significativo en la estructura electrónica del estado fundamental σ_u^* . Xie y colaboradores determinaron, a partir de estudios sobre Cu_A -Azu y una mutante puntual (H120A), que cambios significativos en la descripción electrónica del estado fundamental modifican sensiblemente la interacción entre los átomos del sitio de cobre, especialmente de ambos átomos metálicos^{54,60}. En consecuencia, los espectros RR del sitio de Cu_A “perturbado” (la mutante H120A de Cu_A -Azu) presenta un corrimiento positivo de 10 cm^{-1} en modos normales que involucran la vibración Cu-Cu, entre otras variaciones. Los espectros RR de las variantes mutagénicas de Tt- Cu_A presentadas en esta sección no muestran cambios de este tipo y, en conjunto con los resultados de EPR y UV-Vis, sugieren que la mutación de segunda (y su combinación con la mutación de ligando axial) permite modular el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sin producir otros cambios relevantes.

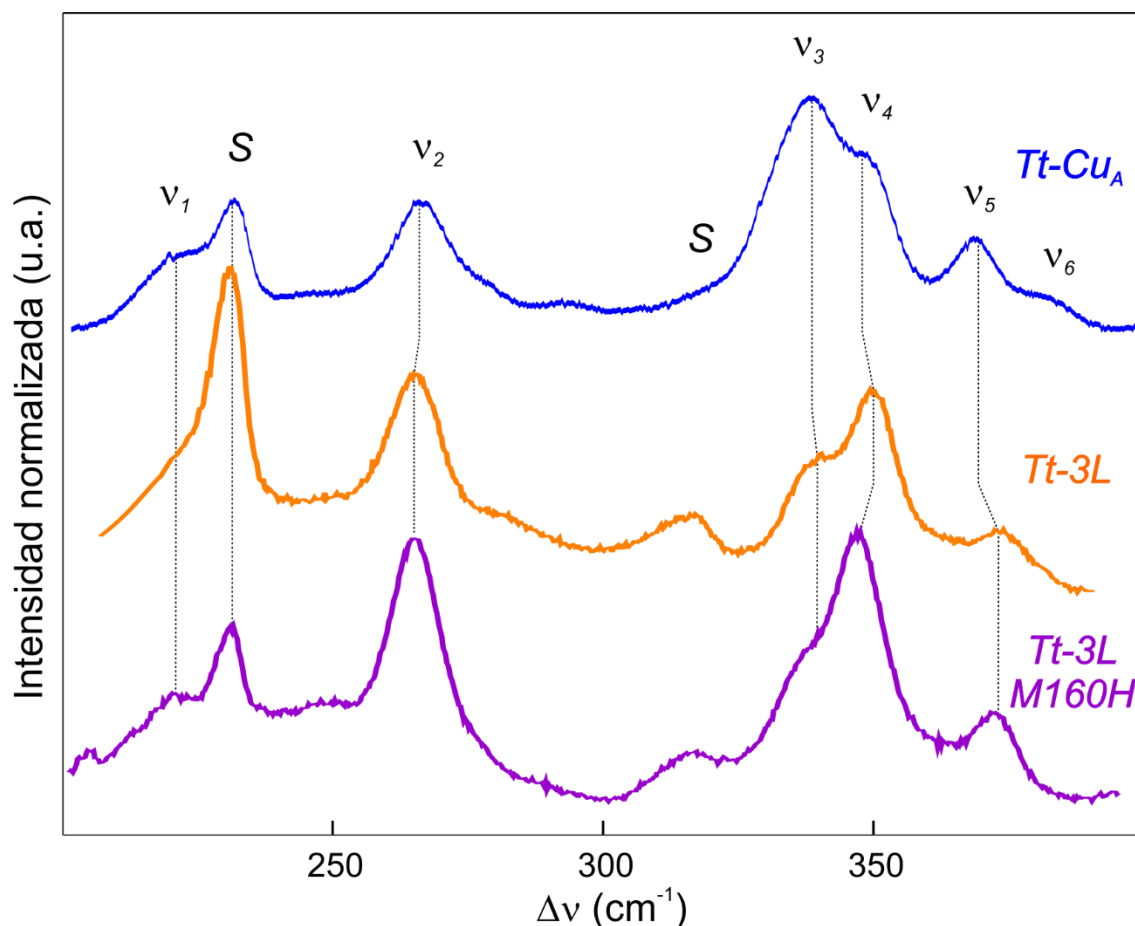


Figura 3-25. Espectros RR obtenidos con láser de excitación a 514 nm y a una temperatura de 77 K de Tt-Cu_A (azul), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta). Las líneas punteadas marcan la posición de las bandas observadas, que se mantiene inalterada en todos los casos.

Se determinó también el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de Tt-3L y Tt-3L-M160H mediante mediciones de RMN paramagnético en función de la temperatura. El método es el mismo que el desarrollado en la sección anterior, por lo que la determinación se realiza a partir del análisis del comportamiento anti Curie de los δ de los β - ^1H de la cisteína 153 y del α - ^{13}C de la cisteína 149. La particular geometría del sitio y la distinta distribución de espín que presentan ambos estados fundamentales otorgan a estos δ una alta sensibilidad al valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y, al igual que en los casos de las mutantes puntuales del ligando axial débil, el δ del C α 149 muestra grandes diferencias entre las distintas variantes, con valores de 249,6 ppm; 539,4 ppm y 969,4 ppm para Tt-Cu_A, Tt-3L y Tt-3L-M160H respectivamente (figura 3-26).

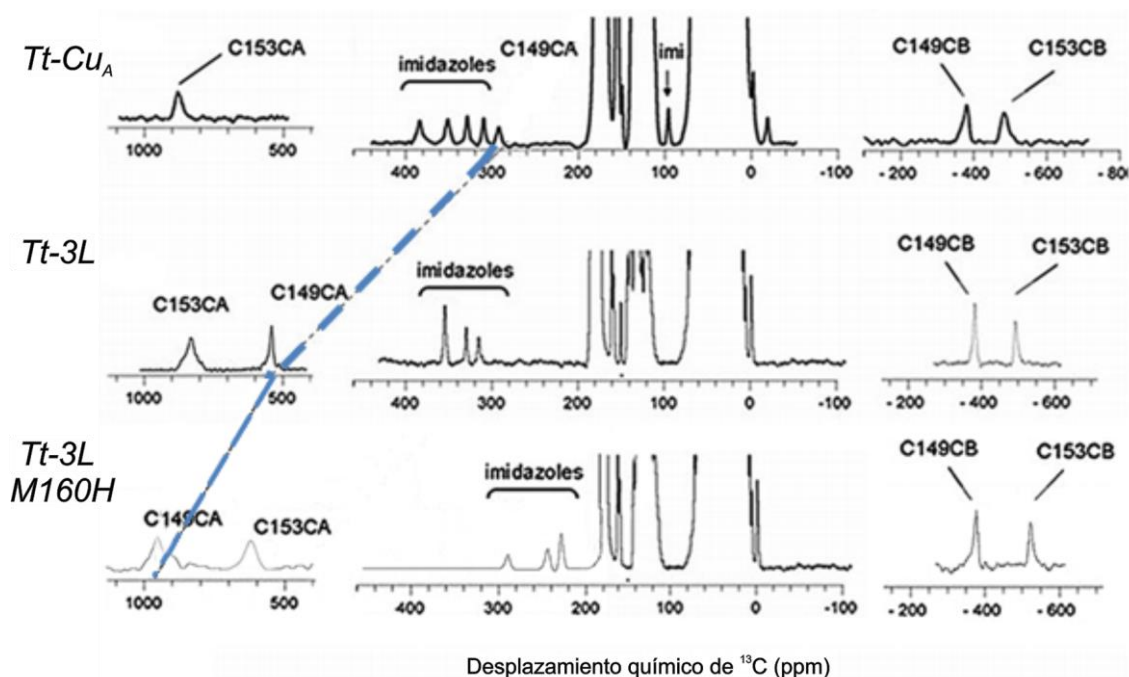


Figura 3-26. Espectros ^{13}C RMN paramagnético de Tt-Cu_A (arriba), Tt-3L (medio) y Tt-3L-M160H (abajo). Se marcan con línea punteada los δ de los carbonos cisteínicos coordinantes del sitio redox. El análisis del comportamiento anti Curie de estos δ permiten determinar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$.

Evaluando entonces la dependencia anti-Curie de estos δ en base a la distribución de Boltzman para un modelo de dos estados (como se hizo en la sección anterior), se determinó un valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ para Tt-3L y Tt-3L-M160H de 240 cm^{-1} y 50 cm^{-1} , respectivamente (Tabla 3-4). A partir de la ecuación (3) para estos valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ se estimó el P_{π_u} , obteniéndose poblaciones del estado alternativo π_u de 24 % y 44% a 25°C para Tt-3L y Tt-3L-M160H, respectivamente (Tabla 3-4). Estos resultados concuerdan con lo observado en los espectros UV-Vis, donde las contribuciones espectrales atribuidas al estado π_u son mayores para Tt-3L-M160H que para Tt-3L, y a su vez mayores para esta que para Tt-Cu_A (figura 3-23). También son consistentes con el comportamiento de los espectros UV-Vis ante el aumento de la temperatura, que trae aparejado un aumento de las contribuciones del estado alternativo π_u para las dos variantes (figura 3-16).

Los resultados experimentales hasta aquí presentados demuestran que a partir de distintas estrategias mutagénicas, a saber, mutaciones puntuales del ligando axial débil M160 o mutaciones en la segunda esfera de coordinación, es posible modificar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. La comparación de los resultados de Tt-3L y M160H resultan interesantes, ya que las dos variantes muestran valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ muy similares (y significativamente por debajo del valor de Tt-Cu_A) como resultado de ambas estrategias mutagénicas por

separado. Las perturbaciones generadas por las mutaciones en Tt-3L y en M160H producen en similar medida un aumento relativo de la intensidad de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado π_u respecto de la del estado σ_u^* en el espectro de absorción UV-Vis, un desplazamiento de la señal $^{13}\text{C}149\alpha$ hacia mayores valores de δ en el espectro de RMN y una disminución del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ al tercio (figura 3-27). Todos estos efectos se ven intensificados en la proteína que combina ambas mutaciones (Tt-3L-M160H), sugiriendo que los efectos producidos por ambos tipos de mutaciones serían aditivos (figura 3-27).

Tabla 3-4. Valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y del poblamiento relativo de ambos estados fundamentales alternativos para Tt-Cu_A, Tt-3L y Tt-3L-M160H. Los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ fueron obtenidos a partir del análisis de espectros RMN paramagnético en función de la temperatura y los poblamientos relativos a partir de dichos valores según la ley de Boltzman.

Proteína	$\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (cm ⁻¹)	Población ($\sigma_u^*:\pi_u$)
Tt-Cu _A	600	95:5
Tt-3L	240	76:24
Tt-3L-M160H	50	56:44

Esto indica que las perturbaciones producidas a nivel de la segunda esfera de coordinación pueden propagarse al sitio redox modificando la relación del poblamiento de ambos estados fundamentales alternativos. Como fue comentado previamente, los tres bucles modificados en estas mutantes cumplen un rol fundamental en la interacción con el Cyt *c*₅₅₂ (*partner* biológico de la CcO de *T. Thermophilus*)⁷⁷. Las perturbaciones generadas por la formación del complejo transiente CcO/ Cyt *c* sobre estos tres bucles podrían modificar el valor $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, ergo el poblamiento relativo de ambos estados fundamentales alternativos, configurándose como un mecanismo regulatorio de la TE *in vivo*. Esta hipótesis se ve reforzada por cálculos computacionales realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, los cuales descartan que la distancia entre los iones metálicos del sitio redox sea la única coordenada relevante para el equilibrio entre ambos estados fundamentales alternativos. Estos estudios sugieren en cambio la existencia de múltiples perturbaciones geométricas pequeñas capaces de alterar tal equilibrio⁶³ (este punto se continuará en el capítulo 4).

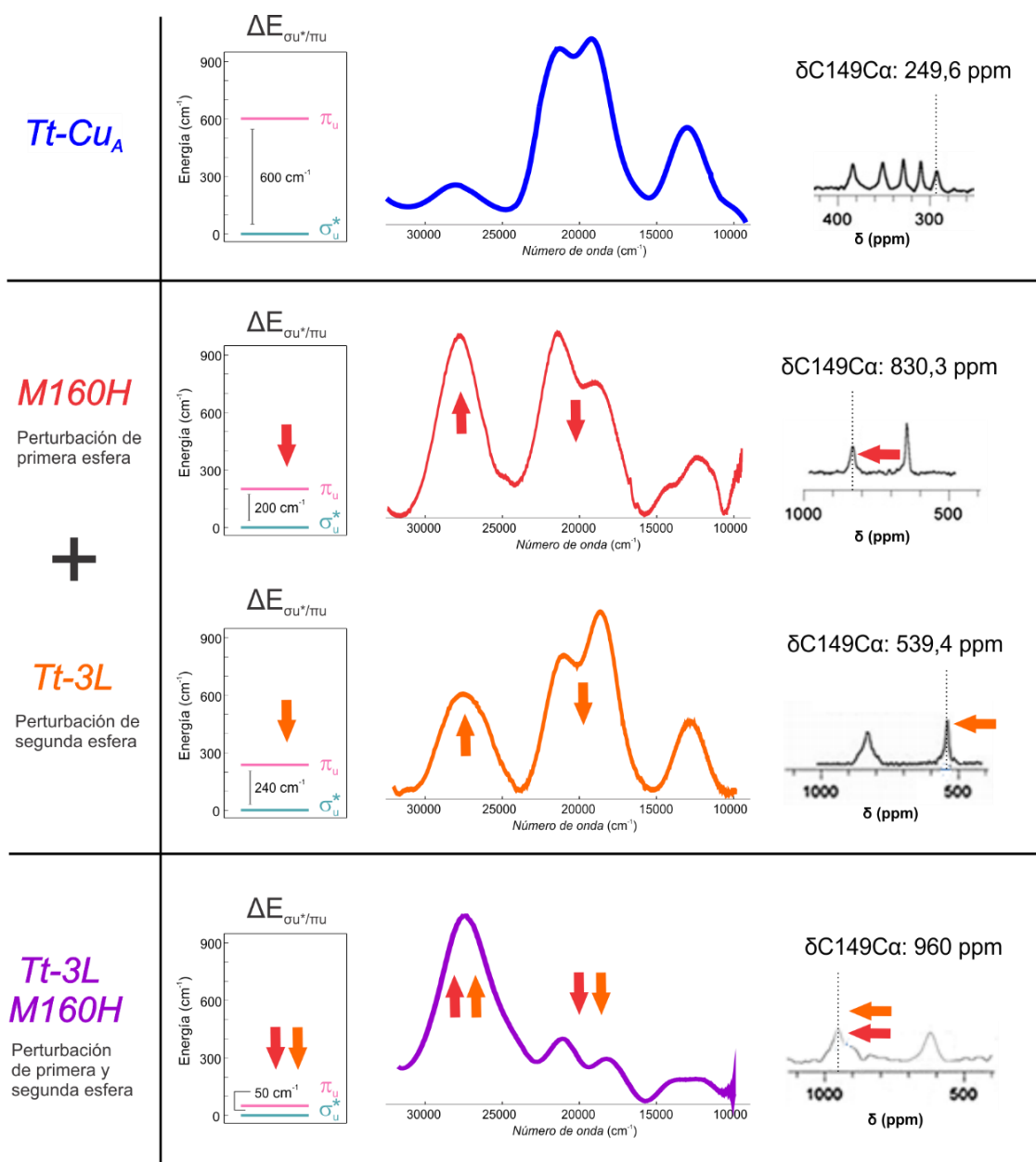


Figura 3-27. Figura ilustrativa de la aditividad de los efectos generados por las perturbaciones a nivel de primera y segunda esfera de coordinación. En el panel superior se muestran el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de *Tt-Cu_A* (azul), su espectro UV-Vis a pH 7 y 298 K y el pico del Ca149 en el espectro RMN paramagnético. En el panel central se muestran las mismas propiedades para *M160H* (rojo) y *Tt-3L* (naranja), marcando con flechas los cambios más destacados respecto de *Tt-Cu_A*, vinculados con el cambio de poblamiento relativo del estado alternativo π_u . En el panel inferior se muestran estas propiedades en *Tt-3L-M160H*, y se marcan con flechas el efecto aditivo de ambas mutaciones.

3.2.3- Estudio electroquímico de la reacción de TE del sitio de Cu_A

Si bien las técnicas espectroscópicas hasta aquí utilizadas ofrecen una gran cantidad de información acerca de las propiedades estructurales y la descripción electrónica del sitio de Cu_A, ninguna de ellas permite la medición directa de la reacción de TE, que configura la función biológica de todas las variantes conocidas de este sitio en la naturaleza. Por lo tanto, para la elucidación de los mecanismos que regulan su función redox se encaró el estudio de la TE mediante técnicas electroquímicas. La elegida para este menester es la voltametría cíclica (VC) en solución, para lo cual se utilizaron electrodos de oro policristalino recubiertos por monocapas autoensambladas (SAMs) de alcanotioles ω -sustituidos con grupos hidroxilo, que impiden la adsorción proteica garantizando el estudio de especies en solución ⁷⁹ (ver detalles en las secciones 1.3.2 y 2.2.3).

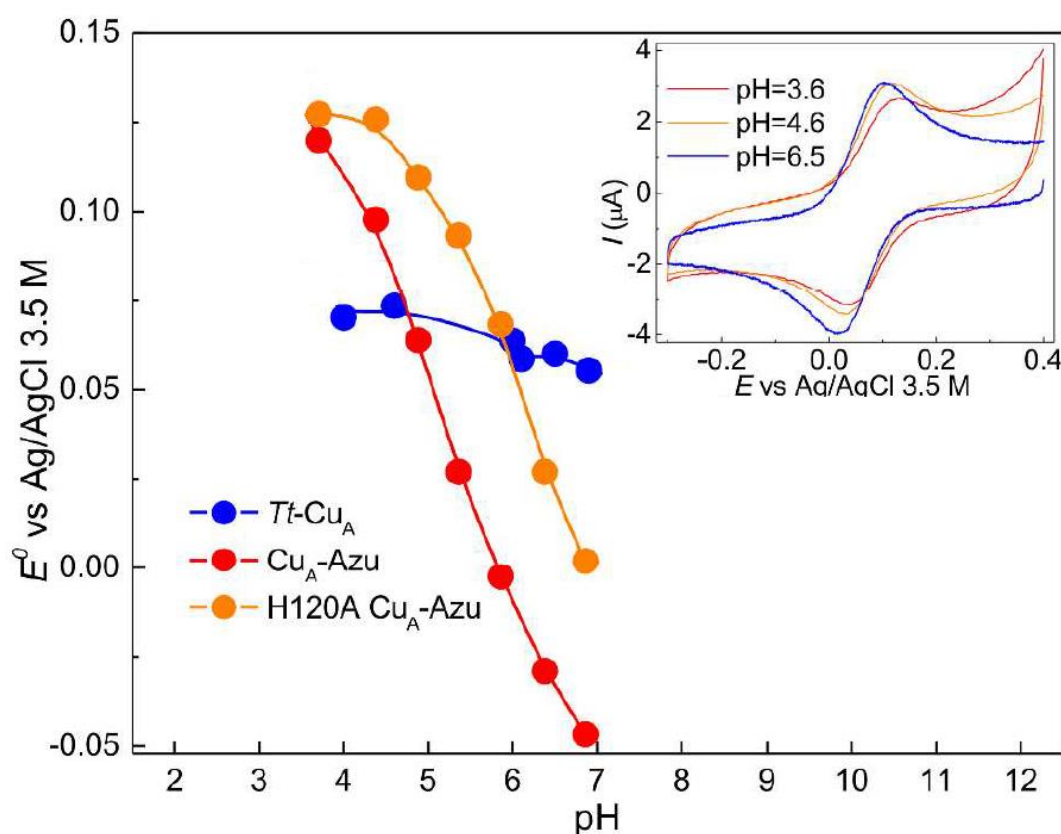


Figura 3-28. (Figura adaptada de Álvarez-Paggi et al. 2013 ⁸⁰) E^0 vs pH para $Tt-Cu_A$ (azul), Cu_A-Azu (rojo) y $H120A Cu_A-Azu$ (naranja). Inset: voltagramas a modo de ejemplo de $Tt-Cu_A$ a pH 6,5 (azul); 4,6 (naranja) y 3,6 (rojo).

Estudios espectroscópicos y electroquímicos previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que en el sitio de Cu_A nativo no tiene lugar ni una transición VM $\rightarrow$ VL como se interpretó inicialmente en Cu_A-Azu, ni una transición VMs $\rightarrow$ VMa como se

reinterpretó más tarde por los mismos autores ^{50,52}. El valor del E^0 de Tt-Cu_A muestra una pequeña y continua dependencia, de una amplitud de 15 mV, en respuesta a la variación del pH entre los valores de 4,6 y 7 ⁸⁰. En este rango de pH se observa una variación diez veces mayor en el valor de E^0 de Cu_A-Azu ⁵⁰ (figura 3-28). La sutil variación observada en Tt-Cu_A sería entonces consecuencia del equilibrio ácido-base de residuos protonables de la matriz proteica expuestos al solvente, que producen un bajo impacto en la estructura electrónica del sitio redox, ejerciendo un suave y continuo efecto electrostático sobre el valor del E^0 ⁸⁰.

El rango de valores de pH entre 4,6 y 7 resulta no solo fisiológicamente relevante, sino apto para distinguir la existencia o no de la transición VMs→VMa observada en Cu_A-Azu (figura 3-28), y al mismo tiempo “amigable” para realizar experimentos prolongados con estos sistemas ⁵⁰. Se ensayaron entonces VCs en solución tanto de Tt-Cu_A como de las cuatro mutantes presentadas en las dos secciones anteriores para los valores extremos de dicho rango de pH: 4,6 y 7 (figura 3-29). En un primer ensayo y a fin igualar las condiciones para comparar las distintas respuestas electroquímicas, los voltagramas se midieron todos a igual velocidad de barrido y temperatura: 100 mV/s y 298 K.

Se obtuvieron en todos los casos voltagramas con las características típicas de una respuesta electroquímica reversible en solución ⁸¹⁻⁸³ (ver detalles en la sección 1.3.2). La forma de los picos tanto anódicos como catódicos muestran que, tras alcanzarse el máximo de corriente faradaica, esta nunca se extingue completamente a causa del proceso difusional que constantemente renueva la cantidad de moléculas que reaccionan en el plano del electrodo. La intensidad de corriente en el máximo y el área de los picos anódico y catódico (I_{pa} , I_{pc} , A_{pa} y A_{pc} respectivamente) resultan simétricas dentro del error en todos los casos, indicativo de la reversibilidad del proceso. El valor de la distancia entre los picos de corriente anódica y catódica (ΔE_p) mostrados en la figura se encuentra entre 70 mV y 90 mV, mayor que los 57 mV esperables para una reacción ideal y totalmente reversible. Sin embargo, estos voltagramas fueron medidos a una velocidad de barrido (v) de 100 mV/s, mientras que ensayos hechos a velocidades menores (10 mV/s y 5 mV/s) presentan valores de ΔE_p en torno a 60 mV. Lo mismo ocurre con el ancho a la altura media del pico (FWHM), que se encuentra en torno a los 180 mV en los voltagramas de la figura 3-29, pero que a velocidades de barrido más bajas se aproxima al valor ideal de 90,6 mV. Como se ha desarrollado en el capítulo 1, tanto el ΔE_p como el FWHM (y también las I_p) aumentan con v , por lo tanto, sus valores ideales se alcanzan (o aproximan) a valores bajos de este parámetro, en el régimen totalmente reversible de medición.

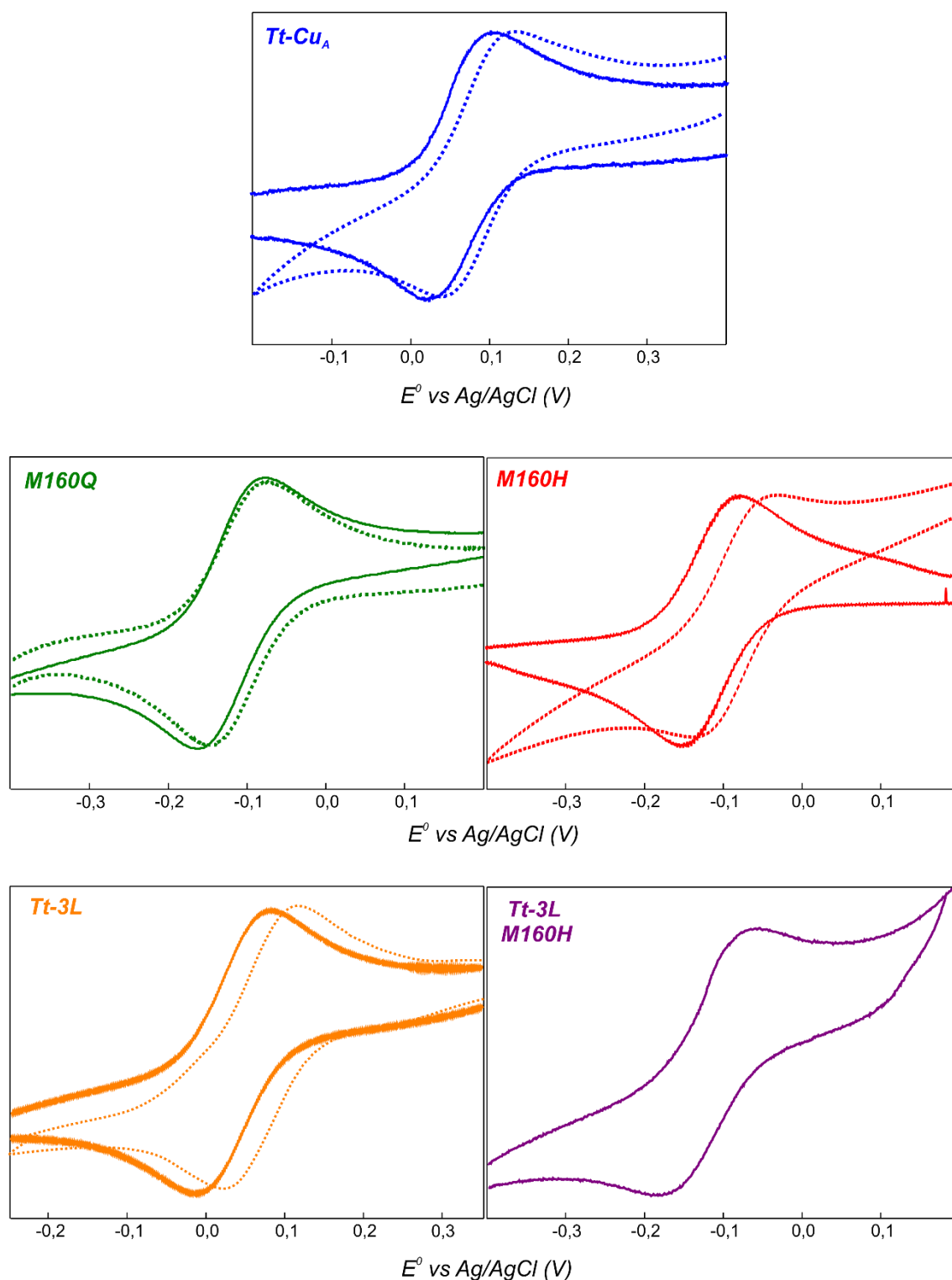


Figura 3-29. Voltagramas medidos (normalizados) a 0,1 V/s de Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo), M160Q (verde), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) en buffer 10 mM fosfato a pH 7,0 (línea llena) y HAc/AcNH₄ a pH 4,6 (línea punteada). En ambos casos, la solución contiene 500 mM de KNO₃ como electrolito soporte. Dada su reducida estabilidad fuera de valores neutros de pH, Tt-3L-M160H fue medido únicamente a pH 7.

El análisis de los voltogramas obtenidos muestra que las cinco variantes son sistemas con respuesta electroquímica robusta y cuasirreversible, pudiendo obtenerse información relevante de la reacción de TE mediante esta técnica. La única excepción a esta conclusión la configura el caso de Tt-3L-M160H, cuyo ΔE_p y FWHM no tienden nunca a los valores ideales, marcando cierto grado de irreversibilidad en su reacción de TE. Además, sólo es posible adquirir voltogramas de buena calidad en torno a valores neutros de pH (entre 6 y 7), fuera de los cuales presentan anomalías, además de observarse precipitados a simple vista en la solución de medida. Por otra parte, los valores de E^0 fueron aproximados a partir del promedio de los potenciales de los picos anódico y catódico (E_{pa} y E_{pc} respectivamente) de cada voltograma (tabla 3-5). En todos los casos las variaciones del E^0 entre ambos valores de pH resultan similares y pequeñas, apoyando las conclusiones previamente alcanzadas a partir del estudio de Tt-Cu_A⁸⁰ (figura 3-28). Por lo tanto, este primer resultado electroquímico contribuye a descartar un mecanismo de modulación del E^0 en sitios de Cu_A nativos mediado por protonación de sus ligandos, del tipo que se había propuesto a partir del efecto del pH sobre el sistema Cu_A-Azul^{50,52,53}.

Tabla 3-5. Valores E^0 estimado como el promedio de ambos picos. Los distintos valores fueron obtenidos a partir de los voltogramas preliminares de las cinco variantes (figura 3-29).

Proteína	E^0 vs Ag/AgCl (mV)	
	pH 7	pH 4,6
Tt-Cu _A	0,072	0,089
M160Q	-0,133	-0,109
M160H	-0,108	-0,061
Tt-3L	0,054	0,088
Tt-3L-M160H	-0,128	-

Con el objetivo de analizar en mayor detalle el efecto de las mutaciones sobre las propiedades funcionales del sitio de Cu_A y mejorar la caracterización termodinámica de la reacción de TE, se realizaron ensayos electroquímicos en función de la temperatura para así poder discriminar entre las contribuciones entálpicas y entrópicas de la reacción (ΔH^0 y ΔS^0 respectivamente). Se llevaron adelante entonces VCs a distintas u en cada valor de temperatura ensayado, para así obtener valores promediados de E^0 . Estos experimentos se realizaron en un rango de temperaturas entre 5°C y 40°C por duplicado y triplicado (figura 3-30). Si bien tanto los espectros UV-Vis y RMN paramagnético indican un cambio poblacional entre ambos estados fundamentales alternativos con la temperatura, también muestran que, en el rango de medidas, las distintas variantes se

mantienen estables, descartándose cualquier transición estructural o desnaturalización. Para evitar la posible contribución del electrodo de referencia a la dependencia con la temperatura se utilizó una celda no isotérmica ideal (ver detalles en la sección 2.2.1). En todos los casos se verificó la reversibilidad térmica de los voltagramas obtenidos, descartando cualquier fenómeno de histéresis, así como también de degradación de las muestras o deterioro del electrodo de trabajo (figura 3-30).

Para acceder a las variables termodinámicas deseadas, a saber, ΔH^0 y ΔS^0 a partir de estos experimentos, es necesario un tratamiento formal de los datos obtenidos. Considerado las siguientes relaciones termodinámicas:

$$G = H - TS \quad (2)$$

$$\Delta G = -nFE \quad (3)$$

y las condiciones experimentales mencionadas, puede expresarse la variación entrópica de la reacción de TE como:

$$\Delta S^0 = nF \left(\frac{\partial E^0}{\partial T} \right) \quad (4)$$

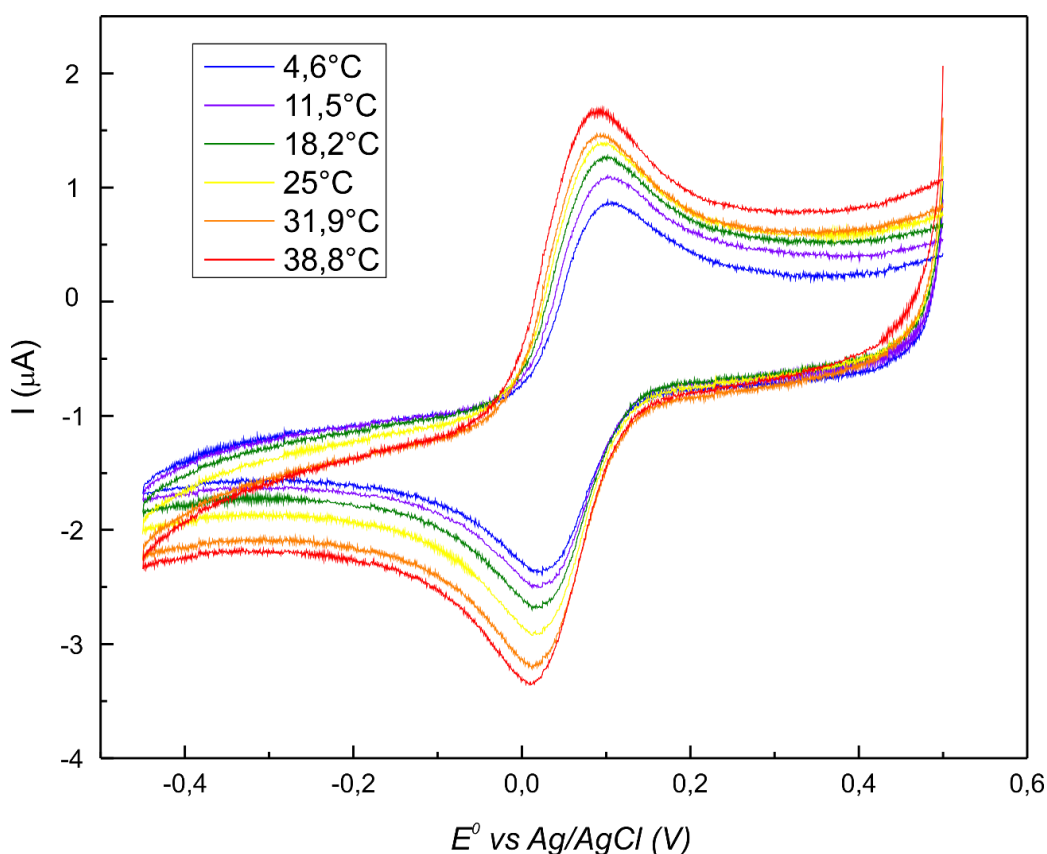


Figura 3-30. Voltagramas (a modo de ejemplo) medidos a 100 mV/s a partir de Tt-CuA en buffer fosfato 10 mM (con 500 mM de KNO₃ como electrolito soporte) a pH 7,0 para temperaturas entre 278 K y 312 K. El orden de las medidas fue aleatorio, descartándose así cualquier fenómeno de histéresis térmica.

Por otra parte, combinando la ecuación de Gibbs-Helmholtz con (3), es posible acceder al cambio de entalpía asociado a la reacción con los mismos datos experimentales:

$$\frac{\partial(E^{\circ}/T)}{\partial(1/T)} = -\frac{\Delta H^{\circ}}{nF} \quad (5)$$

De esta manera, a partir del ajuste de medidas directas de la variación del E° con la temperatura y utilizando las ecuaciones (4) y (5) es posible acceder al cambio entálpico y al cambio entrópico asociados a la reacción de TE. Además, conociendo estos parámetros se puede obtener un valor confiable de E° a 298 K a partir de combinar las expresiones (4) y (5), es decir, utilizando la definición de energía libre de Gibbs (figura 3-31, figura 3-32 y tabla 3-6).

Cambios estructurales dependientes de la temperatura en el rango explorado (entre 278 K y 313 K) que afectaran las propiedades funcionales del sitio de Cu_A se harían evidentes por la manifestación de cambios abruptos en la dependencia térmica de E° . La ausencia de quiebres en las tendencias observadas permite descartar tales transiciones en el rango de temperaturas utilizado, validando la estrategia empleada para el acceso a los parámetros termodinámicos de la reacción de TE y corroborando las conclusiones antes comentadas de las medidas espectroscópicas en función de la temperatura (figura 3-31, figura 3-32). Además, las variaciones del valor del E° con la temperatura son reproducibles, continuas y lineales, lo cual permite ajustes de buena calidad a las ecuaciones (4) y (5) en todos los casos.

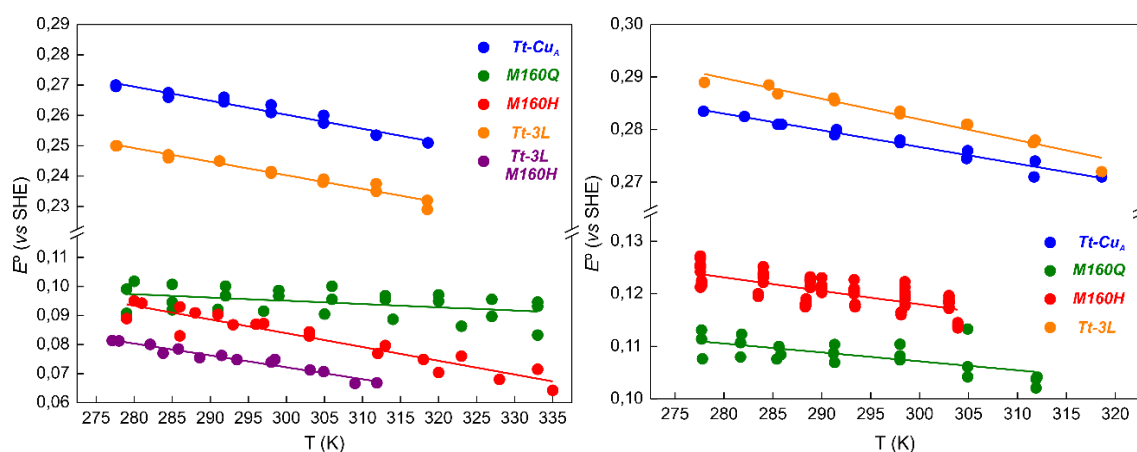


Figura 3-31. E° en función de la temperatura para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo), M160Q (verde), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) a pH 7,0 (izquierda) y 4,6 (derecha). El valor de las pendientes de los ajustes lineales corresponde a la entropía de la reacción de TE según la ecuación (4). Se utilizaron los mismos buffers que en la figura 3-29.

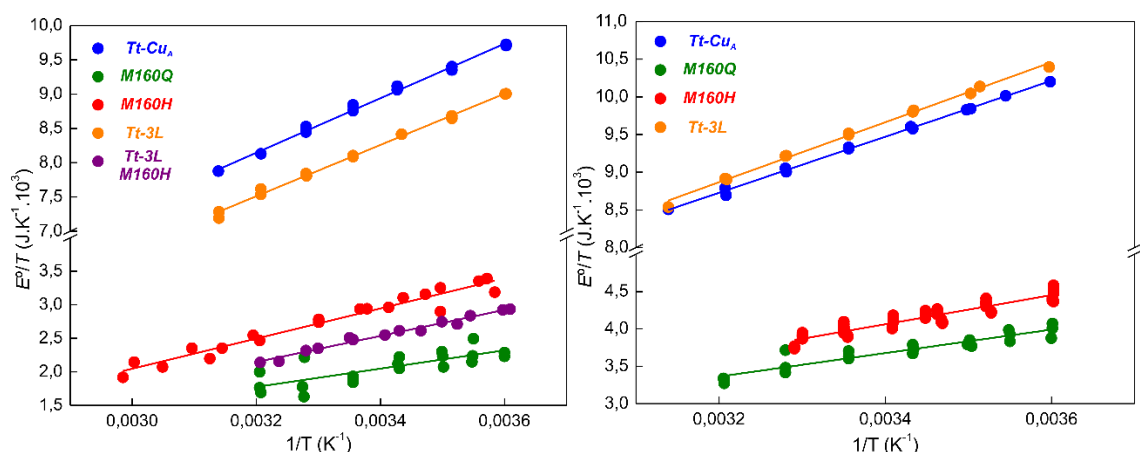


Figura 3-32. E^0/T en función de la inversa de la temperatura para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo), M160Q (verde), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) a pH 7,0 (izquierda) y 4,6 (derecha). El valor de las pendientes de los ajustes lineales corresponde a la entalpía (cambiada de signo) de la reacción de TE según la ecuación (5). Se utilizaron los mismos buffers que en la figura 3-29.

Tabla 3-6. Valores de ΔS° , ΔH° y E^0 (a 298 K) de Tt-Cu_A y las cuatro mutantes a pH 7 y pH 4,6 obtenidos de los ajustes mostrados en las figuras 3-31 y 3-32.

Proteína	ΔS° (J/Kmol)		ΔH° (kJ/mol)		E^0 (mV) vs Ag/AgCl	
	pH 7	pH 4,6	pH 7	pH 4,6	pH 7	pH 4,6
Tt-Cu _A	-45 (± 2)	-31 (± 2)	-40 (± 1)	-37 (± 1)	69 (± 7)	85 (± 8)
M160Q	-23 (± 2)	-16 (± 2)	-13 (± 1)	-16 (± 1)	-139 (± 8)	-94 (± 8)
M160H	-51 (± 3)	-24 (± 3)	-24 (± 1)	-22 (± 1)	-111 (± 9)	-56 (± 10)
Tt-3L	-43 (± 2)	-38 (± 3)	-37 (± 1)	-40 (± 1)	50 (± 7)	90 (± 9)
Tt-3L-M160H	-39 (± 3)	-	-18 (± 1)	-	-132 (± 9)	-

Un aspecto interesante de estos resultados es el concerniente a la aditividad de los efectos que producen las mutaciones de primera y segunda esfera. Como se discutió hacia el final de la sección anterior, las mutaciones en Tt-3L y M160H producen efectos similares sobre las propiedades espectroscópicas el sitio de Cu_A, todos ellos vinculados con la disminución del valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (figura 3-26). Los resultados electroquímicos también muestran que ambas mutaciones producen el mismo efecto: la disminución del valor de E^0 . Dada la naturaleza de ambas mutaciones, es esperable que el impacto de aquella que afecte directamente la coordinación de los átomos de cobre (M160H) sea mayor que el impacto de la que no lo hace (Tt-3L). Los resultados corroboran este

comportamiento, ya que M160H presenta una fuerte caída de 180 mV (respecto de Tt-Cu_A) mientras que para Tt-3L se observa una leve disminución de 19 mV (tabla 3-4). Además, del mismo modo que con las características espectroscópicas, se observa un fenómeno de aditividad, ya que la combinación de ambas mutaciones (la mutante Tt-3L-M160H) produce una caída del valor de E⁰ de 201 mV. Si bien existen en la literatura reportes acerca de aditividad del efecto de distintas mutaciones sobre el E⁰ de sitios de cobre, ningún ejemplo concerniente a sitios de Cu_A ha sido reportado ⁸⁴. Esta combinación aditiva de perturbaciones a distintos niveles de la coordinación del sitio puede ser una característica clave para la confluencia simultánea de diversos factores que permitan la regulación fina de la actividad biológica de sitio de Cu_A.

En cuanto a las entalpías de reducción, estas generalmente representan el componente mayoritario del valor del E⁰ de metaloproteínas redox, como se ha visto en numerosas proteínas de cobre y hemo-proteínas, y se encuentran controladas por las características de las uniones ligando-metal y las interacciones electrostáticas entre el sitio metálico y su entorno, a saber, la matriz proteica y el solvente ⁸⁴⁻⁸⁸. Los resultados aquí desarrollados muestran que las cinco variantes medidas no son la excepción a esta tendencia ya que, al igual que en la gran mayoría de cupredoxinas, la componente entálpica del valor del E⁰ es mayoritaria (tabla 3-6). No obstante, en todos los casos la contribución entrópica resulta significativa. Además, si bien las cuatro mutantes presentan corrimientos del valor de ΔH^0 , estos son más pronunciados en M160Q, M160H y Tt-3L-M160H, lo que sugiere que la primera esfera de coordinación tiene un peso mayor en la determinación del valor de ΔH^0 . Esta evidencia indica también que las mutaciones tanto por histidina como por glutamina producen una desestabilización relativa de la forma reducida respecto de la oxidada, ya que en los tres casos la entalpía de reducción aumenta (lo cual se discutirá en la siguiente sección).

No obstante, estas diferencias no pueden ser racionalizadas fácilmente a partir de cambios geométricos del sitio de Cu_A, especialmente si se tiene en cuenta que la información estructural y espectroscópica disponible indica que no existen cambios apreciables en las distancias de equilibrio de los diversos enlaces, como se discutió a partir de los resultados de EXAFS, UV-Vis y RMN; ni se ven alteradas significativamente las energías de los modos normales de vibración del sitio redox en su forma oxidada, como se puede observar en los espectros RR ^{63,71} (ver detalles en las secciones 3.2.1 y 3.2.2). Por otra parte, las contribuciones a los cambios entrópicos suelen estar relacionadas con efectos de reorganización del solvente y cambios en la flexibilidad de la cadena polipeptídica ^{85-87,89-92}. Los valores de ΔS^0 observados resultan relativamente pequeños en comparación a otras proteínas de cobre como Azurinas, que pueden llegar a valores de 68 J·mol⁻¹·K⁻¹ ^{85,87} (Tabla 3-4). Este resultado es consistente con el sitio robusto, rígido y de poca variación estructural entre su forma reducida y oxidada que la evidencia espectroscópica señala.

Cambios estructurales entre ambas formas redox se verían reflejadas en cambios significativos de las componentes vibracional, rotacional y/o conformacional de la función de partición (Q) que define el valor de ΔS^0 (ver detalles en la siguiente sección). Además, un sitio de mayor flexibilidad o mayor accesibilidad al solvente favorecería estas diferencias entre las formas reducida y oxidada ^{85,93}. En particular, esta observación es compatible con la poca diferencia entre las estructuras geométricas de ambos estados redox como fue previamente determinado por EXAFS para Tt-Cu_A y las mutantes puntuales (menor a los 0,03 Å en las distancias ligando-Cu) ⁶³.

Si bien los resultados desarrollados en esta sección aportan elementos importantes para la caracterización termodinámica de la actividad redox del sitio de Cu_A, se requiere un análisis más profundo de los datos termodinámicos electroquímicos para desentrañar cuáles son y cómo influyen los factores que determinan las distintas contribuciones al valor del E^0 .

3.2.4- Control entrópico y control entálpico de la reacción de TE

Un camino para mejorar el detalle del estudio sobre los parámetros termodinámicos de la TE es el de discriminar entre los factores que afectan diferencialmente a la componente entálpica y a la componente entrópica de dicha reacción. Para poder hacer esta distinción es necesario un análisis que supere la visión estática de este tipo de modelos. Las proteínas son sistemas extremadamente complejos capaces de explorar en mayor o menor medida una extensa superficie hiper-dimensional de energía potencial dependiendo de su energía térmica. Desde este punto de vista, una proteína no puede definirse a partir de una única conformación estática, sino de una extensísima colección de conformaciones posibles o ensamble. Este ensamble constituye la función de partición Q , la cual define los niveles energéticos accesibles del sistema.

Sin embargo, dado que las características de las uniones ligando-metal y las interacciones electrostáticas entre el sitio metálico y su entorno inmediato conforman las principales contribuciones a la componente entálpica del E^0 , su análisis puede abordarse en términos de una conformación preferencial, es decir, de una visión cuasi-estática del sistema ^{85,87,94,95}. A partir de esta concepción es posible estudiar el efecto de variables como la constante dieléctrica del entorno del sitio redox, la naturaleza de los ligandos coordinantes o las interacciones electrostáticas presentes. Por otra parte, resulta indispensable tomar en consideración el ensamble del sistema para el estudio de las contribuciones entrópicas, ya que están íntimamente vinculadas con la multiplicidad de estados, reflejada directamente en Q . Existen ejemplos en la literatura donde se apelan a diversos factores para explicar las magnitudes de las contribuciones entrópicas, como la profundidad del sitio redox en la matriz proteica, la reorganización de moléculas de solvente, interacciones de tipo no covalentes o cambios en la

flexibilidad de la cadena polipeptídica, entre otras ^{85–87,92,96–99}. No obstante, en ninguno de los casos se ha elaborado un marco teórico robusto capaz de comprender los resultados experimentales de una manera sistemática. A continuación, se buscará presentar un modelo formal que permita una interpretación satisfactoria de los datos experimentales.

Como se desarrolló previamente, la estructura electrónica del sitio de Cu_A puede ser descrita mediante una superficie de energía potencial con dos mínimos (los estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u) en función de una coordenada arbitraria tal como la distancia Cu-Cu ⁶³ (ver sección 3.1.5). Se ha presentado abundante evidencia a lo largo del capítulo acerca de que, a partir de las perturbaciones ejercidas sobre el sitio redox con distintas mutaciones perpetradas en Tt-Cu_A, es posible modificar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sin alterar sensiblemente la naturaleza de cada estado fundamental alternativo. La poca variabilidad mostrada en los espectros EPR, RMN y RR de todas las mutantes, así como los datos EXAFS de Tt-Cu_A y las mutantes de ligando axial, son consistentes con una configuración nuclear conservada entre las cinco variantes ^{63,71}. Por otra parte, los resultados de las medidas de absorción UV-Vis registradas a distintas temperaturas apoyan la interpretación del poblamiento térmico de un mínimo alternativo en la superficie de energía potencial (figuras 3-16 y 3-23).

Este fenómeno representa una valiosa herramienta para el estudio de las propiedades termodinámicas del sistema. Es esperable que el aumento de la accesibilidad al estado alternativo π_u tenga un impacto directo en el valor de ΔS^0 , dado que implica estados adicionales en la función de partición Q del sistema. La función de partición puede separarse en términos a partir de considerar las distintas contribuciones: electrónica, vibracional, rotacional y conformacional. A los fines del tratamiento que se desarrolla a continuación, aquí se hará una distinción binaria, entre la componente electrónica y el conjunto de componentes no electrónicas, Q_{El} y Q_{NoEl} , respectivamente:

$$Q = Q_{El}Q_{NoEl} \quad (6)$$

A su vez, la función de partición Q se vincula con la energía libre de Helmholtz del sistema (A) a través de:

$$A = -k_B T \ln Q \quad (7)$$

donde k_B es la constante de Boltzman. La variación de A para una reacción química (ΔA), en este caso la reducción del sitio de Cu_A, puede expresarse como:

$$\Delta A = -k_B T \ln \left(\frac{Q_{Red}}{Q_{Ox}} \right) \quad (8)$$

donde Q_{Red} y Q_{Ox} son las funciones de partición del estado reducido y oxidado, respectivamente. A su vez, se debe considerar la definición de ΔA de una reacción:

$$\Delta A = \Delta U - T\Delta S \quad (9)$$

donde ΔU es el cambio de energía interna y ΔS el cambio de entropía. Combinando con las ecuaciones (7), (8) y (9), y reordenando convenientemente se puede expresar:

$$\Delta S = k_B \ln \left(\frac{Q_{EL,Red} Q_{NoEL,Red}}{Q_{EL,Ox} Q_{NoEL,Ox}} \right) + \frac{\Delta U}{T} \quad (10)$$

El sitio de Cu_A es un singulete (capa cerrada) en su forma reducida, mientras que es un doblete (capa abierta) en su forma oxidada, para cualquiera de los dos estados fundamentales alternativos (σ_u^* y π_u). Resultados previos obtenidos mediante cálculos computacionales sugieren que, en su forma reducida, el sitio de Cu_A no presenta un mínimo alternativo térmicamente accesible ⁶⁶. Por otra parte, cálculos realizados en nuestro laboratorio presentaron resultados compatibles, donde se observa que para el sitio reducido es posible obtener un HOMO de simetría π_u a partir de restricciones geométricas, pero en ningún caso conforma un mínimo de energía, lo cual sugiere que, para dicho estado redox, sólo se encontraría poblado el estado fundamental σ_u^* . Esto implica que el sitio de Cu_A en su forma reducida no es degenerado (es decir, su degeneración es 1), mientras que en su forma oxidada la degeneración es 2 para cada uno de los estados fundamentales.

Refiriendo los niveles de energía del sistema al estado oxidado σ_u^* , las energías relativas del estado oxidado π_u y del estado reducido (siempre σ_u^*) pueden expresarse en términos de ΔU y del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Así, los términos $Q_{EL,Red}$ y $Q_{EL,Ox}$ definidos para Q en la ecuación (6) pueden expresarse como:

$$Q_{EL,Red} = e^{-\frac{\Delta U}{RT}} \quad (11)$$

$$Q_{EL,Ox} = 2 \left(1 + e^{-\frac{\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}}{RT}} \right) \quad (12)$$

e introduciendo las ecuaciones (11) y (12) en la ecuación (10), esta se puede reexpresar de la siguiente manera:

$$\Delta S = k_B \ln \left(\frac{e^{-\frac{\Delta U}{RT}} Q_{NoEL,Red}}{2 + 2e^{-\frac{\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}}{RT}} Q_{NoEL,Ox}} \right) + \frac{\Delta U}{T} \quad (13)$$

Y reordenando los términos convenientemente:

$$\Delta S = -k_B \ln \left(2 + 2e^{-\frac{\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}}{RT}} \right) + k_B \ln \left(\frac{Q_{NoEL,Red}}{Q_{NoEL,Ox}} \right) \quad (14)$$

Finalmente, la variación entrópica del proceso puede expresarse simplifícadamente a partir de los dos términos de la ecuación (14) como:

$$\Delta S^\circ = \Delta S_{El}^0 + \Delta S_{NoEl}^0 \quad (15)$$

Este sencillo modelo indica que la componente electrónica del valor de ΔS° para la reacción de TE es negativa, ya que se alcanza un estado no degenerado (el reducido) a partir de uno degenerado (el oxidado), lo cual se verifica en los resultados experimentales mostrados en la sección anterior (Tabla 3-6). Como ya fue comentado, la descripción electrónica del sitio reducido es un singulete (no degenerado) y no presenta ningún estado alternativo térmicamente accesible, mientras que en la forma oxidada es doblemente degenerado, y además posee un estado alternativo π_u térmicamente accesible ⁶⁶. Si dicho estado no estuviera poblado la degeneración del sitio de Cu_A en su forma oxidada sería de 2, mientras que si ambos estados fundamentales alternativos estuvieran igualmente poblados la degeneración sería de 4, dado que cada uno es un doblete. La población de ambos estados fundamentales está determinada por el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, por lo tanto, la degeneración del sitio de Cu_A en su forma oxidada puede adoptar un número entre 2 y 4, dependiendo justamente del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y de la temperatura.

El modelo propuesto no brinda herramientas para estimar de una manera sencilla la componente no electrónica de la entropía de reacción, no obstante, las características de algunas variantes presentadas permiten eludir parcialmente este inconveniente. Tt-Cu_A y las mutantes puntuales de ligando axial débil M160 son, desde el punto de vista del esqueleto proteico, casi idénticas entre sí. Se ha mostrado abundante evidencia espectroscópica a lo largo del capítulo acerca del bajo impacto de ambas mutaciones en las propiedades estructurales de la proteína, en contraste con el sensible efecto que ejercen sobre el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (EPR, RMN, RR, EXAFS, UV-Vis). Por lo tanto, puede postularse que el efecto dominante de ambas mutaciones sobre la entropía de la reacción de TE sea la modulación de su componente electrónica (ΔS_{El}^0), sin que se modifiquen significativamente las otras (ΔS_{NoEl}^0). Los datos experimentales concuerdan con esta interpretación, observándose una correlación en la cual aumenta en módulo el valor de ΔS° a medida que baja el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (figura 3-32). Pero tal correlación entre ΔS° y el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ no se cumple para las mutantes de segunda esfera (Tt-3L y Tt-3L-M160H). En estos casos no sólo se modifica ΔS_{El}^0 como consecuencia de las distintas poblaciones del estado alternativo π_u , sino también ΔS_{NoEl}^0 a raíz de los cambios que estas mutaciones implican en el esqueleto proteico y por lo tanto en las contribuciones vibracionales, rotacionales y conformacionales a Q (figura 3-32).

Por otra parte, estudios previos de RMN paramagnético realizados en nuestro grupo muestran en Tt-Cu_A una transición pH-dependiente atribuida a un cambio en la accesibilidad del solvente al sitio redox ⁸⁰. Este fenómeno será largamente desarrollado y discutido en el capítulo 4, pero aquí se adelantan parcialmente algunos resultados para utilizarlos como herramientas en el estudio termodinámico de Tt-Cu_A. Lo relevante a los fines buscados en esta sección es que dicha transición pH-dependiente ejerce un

sensible efecto sobre el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, aumentando su valor a medida que se acidifica el medio ⁷⁰. Por lo tanto, es de esperar que la componente electrónica de la entropía de reacción disminuya en módulo hacia valores ácidos de pH, pero no en igual medida para las distintas variantes. Evaluando la ecuación (12) se puede predecir que serán mayores los cambios en ΔS_{El}^0 para variantes cuyo valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sea menor, ya que disminuciones de similar magnitud provocarán un aumento más pronunciado en la población relativa del estado alternativo π_u , y por lo tanto del valor de $Q_{El,ox}$. Definiendo la variación en el valor de la entropía de reacción entre ambos valores de pH medidos (7 y 4,6) como $\Delta\Delta S^0 = \Delta S_{pH7}^0 - \Delta S_{pH4,6}^0$, es esperable entonces que el valor de $\Delta\Delta S^0$ sea menor en variantes de menor $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, usando como referencia el valor a pH 7 (tablas 3-2 y 3-4). Los resultados experimentales son consistentes con esta predicción: no sólo se observa en todos los casos que ΔS^0 disminuye en módulo a pH ácido (tabla 3-6), sino también una mayor variación de la entropía ($\Delta\Delta S^0$) a medida que el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ decrece (figura 3-33).

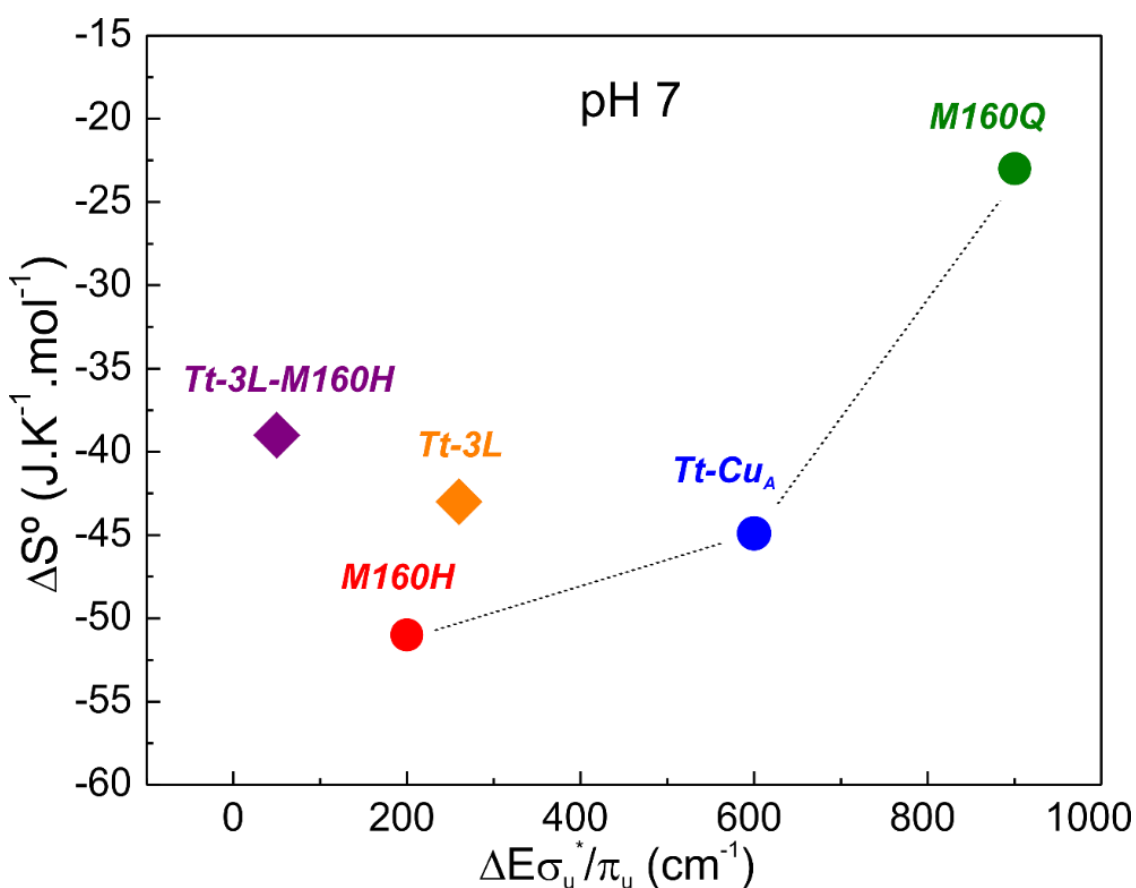


Figura 3-32. ΔS^0 vs $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) a pH7. La línea punteada es una guía visual para las variantes cuyo distinto ΔS^0 se atribuiría principalmente a la componente electrónica.

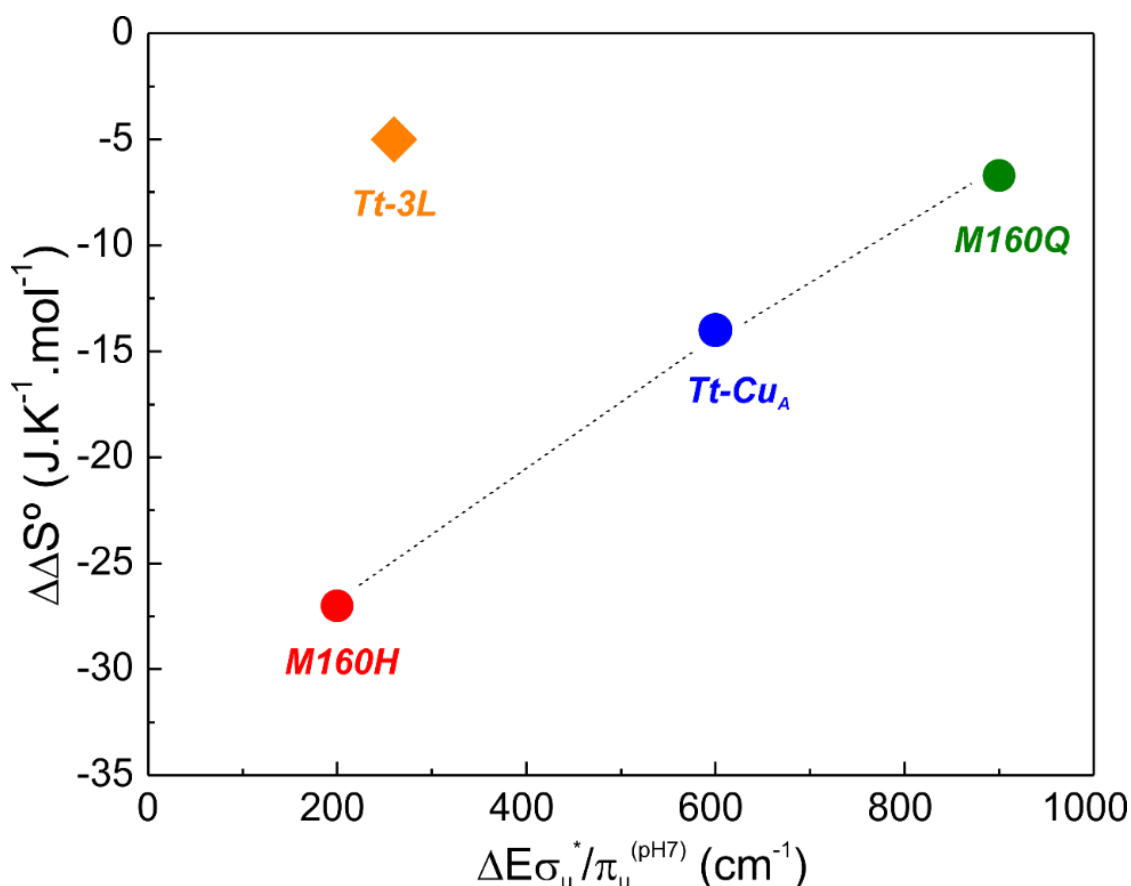


Figura 3-33. $\Delta\Delta S^\circ$ vs $\Delta E_{\sigma_u^*}/\pi_u$ (medido a pH 7 por RMN) para Tt-Cu_A (círculo azul), M160Q (círculo verde), M160H (círculo rojo) y Tt-3L (rombo naranja). La línea punteada es simplemente una guía visual para las variantes cuyo $\Delta E_{\sigma_u^*}/\pi_u$ es sensible al pH, y por lo tanto presentan valores de $\Delta\Delta S^\circ$ mayores (en módulo).

Es interesante destacar que las características estructurales que promueven la transición pH-dependiente en el sitio de Cu_A se encuentran ausentes en Tt-3L como resultado de las mutaciones que la conforman^{70,71} (ver detalles en las secciones 4.2.5 y 4.2.6). Así, Tt-3L se presenta como un control en este experimento, dado que el pH no afecta el valor de su $\Delta E_{\sigma_u^*}/\pi_u$, por lo que se espera que no presente cambios en el ΔS_{El}^0 . Consistentemente, lo que se observa para esta variante es que el cambio en el ΔS° asociado a la disminución del pH es muy bajo. De hecho, este cambio es menor que para las demás variantes estudiadas y, dado que el pH no afecta el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*}/\pi_u$, se le debe atribuir exclusivamente a cambios en ΔS_{NoEl}^0 (figura 3-33).

Los resultados hasta aquí mostrados satisfacen las tendencias que se desprenden del modelo planteado para la interpretación de las contribuciones electrónicas a la entropía de la reacción de TE. Sin embargo, las diferencias de entropía predichas por este modelo para las distintas variantes son menores a las observadas en los datos experimentales. Según la ecuación (14), la componente electrónica de ΔS° puede tomar

valores entre -5,8 y -11,5 J·K⁻¹·mol⁻¹, lo cual implica una diferencia máxima de 18 mV en su contribución al valor del E⁰. Los datos experimentales muestran diferencias mayores en la mayoría de los casos (tabla 3-6), sugiriendo que no es sólo la componente electrónica de la entropía la que cambia con las mutaciones puntuales de ligando axial. Distintos trabajos sugieren que para proteínas redox la oxidación trae aparejada un modesto cambio en la flexibilidad de la cadena polipeptídica, circunscripto a la región superficial más próxima al sitio activo^{100–104}. Este tipo de efectos, contenidos en ΔS_{NoEI}^0 , podrían no ser idénticos entre Tt-Cu_A, M160Q y M160H, generando diferencias de ΔS^0 mayores a las que se esperan por la exclusiva contribución electrónica (ver más adelante).

En cuanto a la racionalización de la componente entálpica del E⁰, no es necesario apelar al análisis del ensamble. Como fue adelantado al inicio de esta sección, las características de las uniones ligando-metal y el entorno inmediato de los átomos metálicos conforman las principales contribuciones a la determinación del valor de ΔH^0 , y estas pueden analizarse a partir de una conformación preferencial de la proteína^{76,105,106}. Existen en la literatura ejemplos de correlación entre la hidrofobicidad de uno o más ligandos axiales de un sitio redox y el valor de su E⁰^{84,88,107}. En los distintos estudios se apela tanto al uso de mutantes puntuales de ligando axial (con aminoácidos naturales y artificiales) como variantes proteicas de distintas especies, minimizando las perturbaciones en la coordinación y la geometría del sitio redox. Existe un razonable consenso en la interpretación de tales correlaciones, apelando a la estabilización relativa de alguno de los estados redox del sitio (reducido u oxidado) respecto del otro. No obstante, estos argumentos están íntimamente vinculados con la componente entálpica del E⁰, y en la mayoría de los ejemplos citados, es ésta la componente dominante^{85,99}.

Los resultados obtenidos a partir de las distintas variantes del sitio de Cu_A muestran que la naturaleza química del ligando axial 160 impacta sobre el valor del E⁰, pero aparentemente lo hace a través de su componente dominante: el ΔH^0 . La correlación de la entalpía de la reacción de TE con la hidrofobicidad del ligando axial 160 (utilizando la escala de hidrofobicidad de “Hopp & Woods”¹⁰⁸) es notable (figura 3-34). Además, las mutaciones de segunda esfera presentes en Tt-3L y Tt-3L-M160H no alteran de manera significativa la coordinación del sitio, por lo tanto es esperable que el efecto sobre el valor del ΔH^0 sea menor. Por su parte, el pH no produce cambios significativos en las propiedades espectroscópicas y estructurales del sitio de Cu_A, más allá de aquellos asociados al efecto sobre el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ ^{70,80} (ver detalles en las secciones 4.2.5 y 4.2.6). Entonces, los valores de ΔH^0 determinados a pH 4,6 y a pH 7 deberían presentar sólo variaciones leves, asociados a cambios en la protonación de residuos superficiales con impacto leve sobre la primera esfera de coordinación del sitio activo. Los resultados experimentales verifican ambas predicciones, dado que ni las mutaciones de segunda esfera ni el cambio de pH producen desviaciones significativas en la tendencia observada (figura 3-34).

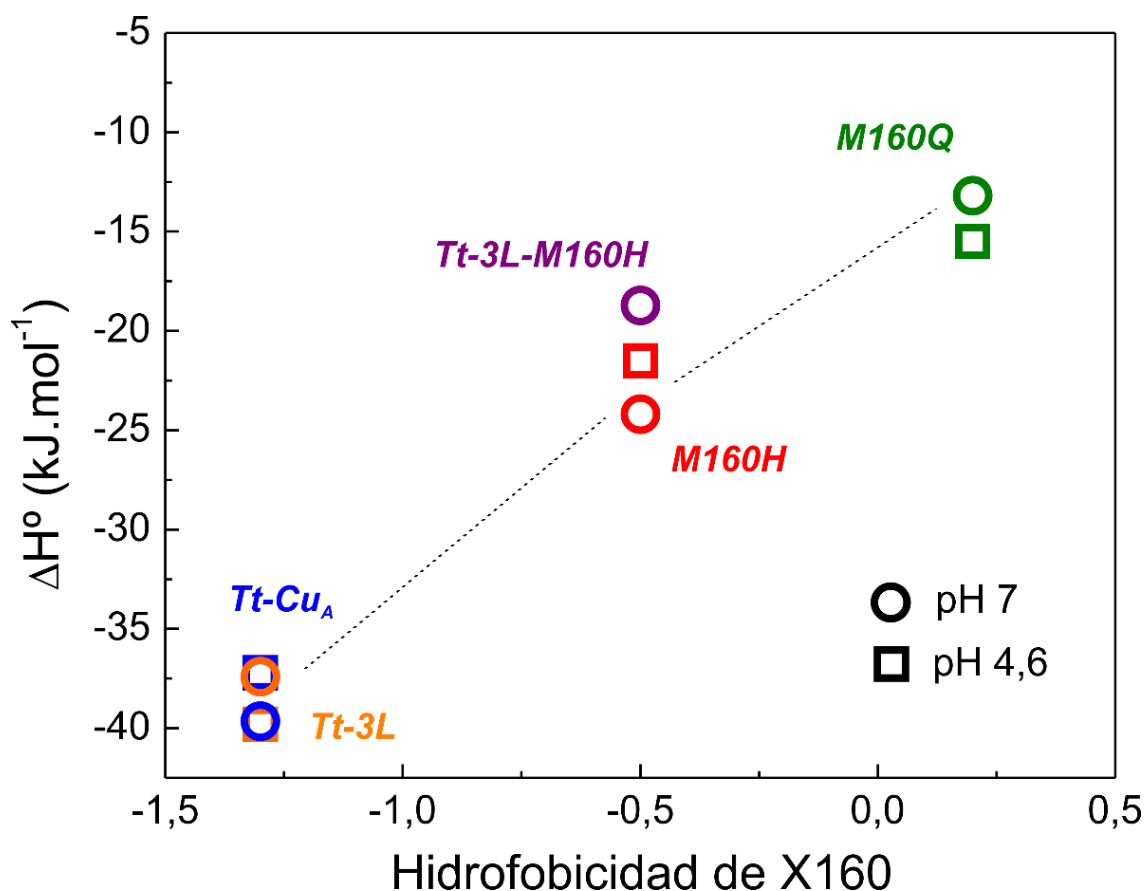


Figura 3-34. ΔH° vs Hidrofobicidad¹⁰⁸ del ligando axial 160 para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) a pH 7 (círculo) y 4,6 (cuadrado). La línea punteada es una guía visual para la tendencia observada.

Es destacable que los valores de E^0 de M160H y M160Q son muy similares, y no discriminar las contribuciones entálpica y entrópica podría llevar a concluir que ambas mutaciones producen una desestabilización relativa similar de la forma reducida respecto a la oxidada. Por el contrario, estos resultados indican que la reducción del sitio de Cu_A se ve entálpicamente favorecida por el carácter hidrofóbico del ligando axial 160, dado que a mayores valores de hidrofobicidad, de -1,3; -0,5 y 0,2 para los residuos metionina, histidina y glutamina respectivamente, ΔH° se vuelve menos negativo. Ambas mutantes puntuales exhiben valores de E^0 similares como resultado de un fenómeno de compensación de los cambios entálpicos y entrópicos (Tabla 3-6). Este tipo de fenómenos de compensación se han observado ya en otras proteínas redox, como citocromos o proteínas azules de cobre (este último caso será discutido en el capítulo 5)^{87,91,92,98,99}. Se ha interpretado para la mayoría de estos casos que la reorganización que sufre la esfera de solvatación de la proteína ante la reacción de TE cumple un rol fundamental en el fenómeno de compensación^{87,96,109}. Según esta interpretación,

cuanto mayor sea el impacto de esta reorganización de moléculas de solvente sobre los valores de ΔH° y ΔS° , mayor será la compensación entálpico entrópica. Es esperable que este tipo de fenómenos afecten el valor de ΔS_{NoEI}^0 y podría ser el responsable (o uno de ellos) de medir diferencias de ΔS° mayores a las esperadas entre Tt-Cu_A, M160H y M160Q (ver más arriba).

Esta última observación deja en evidencia el hecho de que el efecto de diversos factores sobre las contribuciones entálpica y entrópica no son completamente escindibles. La distinción entre el efecto de distintos factores sobre ambas contribuciones puede resultar muy dificultoso en algunos casos. No obstante, los resultados aquí presentados señalan la posibilidad de racionalizar algunos de los distintos efectos de una manera semicuantitativa. Esto permite no sólo mejorar el entendimiento la termodinámica de la reacción de TE en sitios de Cu_A, sino también las capacidades de manipulación de los parámetros que la controlan. Cuanto más selectiva pueda ser la manipulación ejercida sobre este tipo de sistemas, mejores serán las posibilidades para el diseño de, por un lado, modelos de estudio que permitan seguir profundizando las investigaciones, y por otro, distintos tipos de dispositivos bio-electrónicos.

3.3- Conclusiones

Este primer capítulo experimental expone cinco variantes del modelo nativo Tt-Cu_A (incluido el silvestre) desarrollados a partir de dos estrategias mutagénicas distintas: mutaciones puntuales del ligando axial débil M160 e ingeniería de bucles. A lo largo de las primeras dos secciones se despliega una variada evidencia espectroscópica acerca de la validez de estos modelos en cuanto al estudio del sitio de Cu_A. Los resultados obtenidos de UV-Vis, RR, EPR, EXAFS y RMN paramagnético, tanto los obtenidos en esta tesis como los de literatura, muestran que estos modelos conservan las características estructurales y espectroscópicas distintivas de los sitios binucleares de Cu_A de VM. Por lo tanto, se validan ambas estrategias mutagénicas como herramientas para la perturbación moderada del sitio redox, permitiendo así estudiar el impacto sobre sus propiedades espectroscópicas y funcionales. Esta es una conclusión no menor teniendo en cuenta que, como fue comentado en la sección introductoria, la mayor parte del conocimiento hoy establecido acerca del sitio de Cu_A ha sido desarrollado a partir del modelo quimérico Cu_A-Azu¹⁹. Este modelo artificial, si bien captura algunas de las características distintivas de los sitios nativos, ha mostrado también resultados claramente contradictorios con ellos.

Además, los resultados espectroscópicos aquí desarrollados demuestran que empleando ambas estrategias mutagénicas por separado y de manera combinada es posible modular el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ entre (al menos) valores que van desde los 50 cm⁻¹ hasta los 900 cm⁻¹. Esto destaca la sensibilidad estructural de este parámetro, ya que perturbaciones que representan alteraciones mínimas en la geometría de la primera esfera de coordinación del sitio activo, repercuten en cambios que abarcan más de un orden de magnitud del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Resulta entonces evidente la importancia fisiológica de factores que tengan un impacto, aunque sea leve, sobre las propiedades estructurales del sitio, como las interacciones proteína-proteína entre *partners* biológicos, cambios de los campos eléctricos locales en las interfaces biológicas, la atmosfera iónica, el pH, el *crowding* molecular, etc. La modulación del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ es cuantificable no sólo mediante experimentos relativamente complejos de RMN paramagnético, sino también mediante otros más simples de espectroscopia UV-Vis, analizando la relación de intensidades de la banda de TCLM S_{Cys}→Cu de ambos estados fundamentales alternativos. Este hallazgo motorizó en gran medida los estudios desarrollados a lo largo del siguiente capítulo.

Una conclusión destacable acerca del efecto de ambos tipos de mutaciones es su carácter en apariencia aditivo, esquematizado en la figura 3-27. Tanto la mutante puntual de primera esfera M160H como la mutante de segunda esfera Tt-3L presentan un valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ disminuido (respecto al modelo silvestre Tt-Cu_A), con el consecuente efecto en sus características espectroscópicas. Por otra parte, la variante combinada Tt-3L-M160H presenta perturbaciones espectroscópicas que pueden interpretarse como la

suma de las observadas para M160H y Tt-3L. Más aún, el corrimiento en el valor del E^0 de Tt-3L-M160H equivale a la suma de los correspondientes corrimientos para las mutantes M160H y Tt-3L (dentro del error experimental). Esto sugiere que tanto la mutación de primera esfera en M160H como la mutación de segunda esfera en Tt-3L ejercerían un efecto similar sobre el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, pero a través de perturbaciones distintas sobre el sitio de Cu_A . Como se desarrolló en la sección 3.1.5, cálculos computacionales previos señalan la posible variedad de distorsiones geométricas leves capaces de alterar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Este antecedente es compatible con los resultados mencionados, ya que ambas mutaciones podrían alterar preferencialmente distintos parámetros geométricos, y converger así en un mismo efecto sobre el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Tal aditividad de efectos resulta de gran valor para el estudio de ambos estados fundamentales alternativos, ya que ofrece una herramienta que permite aumentar significativamente la población del estado alternativo π_u .

Las dos últimas secciones de resultados están íntegramente abocadas al aspecto funcional de las cinco variantes mediante el estudio de su respuesta electroquímica, donde se confirma el importante rol del ligando axial metionina 160 en la determinación del valor de E^0 , en contraste con el pequeño efecto ejercido por las mutaciones de segunda esfera. La discriminación entre la componente entálpica y la componente entrópica del valor de E^0 permite mejorar el entendimiento sobre el efecto de las distintas mutaciones. Por un lado, la identidad química, y en particular la hidrofobicidad, del ligando axial 160 modula la entalpía de la reacción de TE, parámetro que resulta poco sensible a mutaciones de segunda esfera. Por otro lado, la entropía de reacción se ve también modulada por las distintas mutaciones, y fue presentado un modelo estadístico sencillo que permite racionalizar parcialmente estos cambios. Distintas perturbaciones ejercidas sobre el sitio de Cu_A , tales como mutaciones o cambios de pH, afectan entre otras cosas el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, que a su vez modifica la degeneración del estado oxidado, y así la componente electrónica de su entropía. El modelo propuesto en la sección 3.2.4 permite predecir semicuantitativamente los resultados experimentales, vinculando la variación entrópica con la componente electrónica de la función de partición. Así, cuando el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ es mayor, la degeneración del sitio de Cu_A en su forma oxidada es menor, y más favorecida entrópicamente resultará su reducción.

Estos resultados destacan tanto el valor predictivo del modelo planteado como también las bondades de este sistema para ponerlo a prueba, dada la relativa facilidad para alterar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sin afectar sensiblemente otras características asociadas a los parámetros termodinámicos de la reacción de TE. Sin embargo, las predicciones no gozan de valor cuantitativo, ya que las variaciones observadas en el valor del ΔS^0 son superiores a las esperadas por cambios exclusivamente asociados al ΔS_{EL}^0 . Esto marca dos desafíos en el futuro inmediato: por un lado, refinar el modelo tratando de vincular el término ΔS_{NoEL}^0 con alguna/s propiedad/es medible/es y, por otro lado, validar el modelo planteado a partir de medidas directas del término ΔS_{NoEL}^0 . En la actualidad este

es un tema de intensa investigación en el grupo de trabajo, donde se están incorporando nuevos datos experimentales para extender el análisis desarrollado, mientras se evalúan técnicas alternativas para la determinación de parámetros termodinámicos, como por ejemplo la utilización de micro-calorimetría diferencial de barrido ¹¹⁰.

Finalmente, el estudio de las propiedades funcionales del sitio de Cu_A resulta insuficiente si no se incluye el aspecto cinético de la reacción de TE. El marco teórico propuesto por Marcus (y posteriormente extendido y refinado) predice que la constante cinética de la reacción de TE (k_{TE}) depende de tres variables: la fuerza impulsora (ΔG^0), el acoplamiento electrónico ($|H_{DA}|$), y la energía de reorganización (λ), esta última vinculada íntimamente a la energía libre de activación (ver detalles en la sección 1.3.1). Si bien la fuerza impulsora de la reacción ha sido analizada y discutida a lo largo del capítulo, prácticamente nada se ha analizado acerca del resto de los parámetros. Si bien es posible acceder a la cinética de la reacción de TE a partir de técnicas electroquímicas sobre especies en solución, la presencia de la componente difusional representa un obstáculo ineludible en estas condiciones. El siguiente capítulo está enfocado al estudio de los parámetros cinéticos de la reacción de TE en el sitio de Cu_A a partir de la adsorción de Tt-Cu_A y las distintas variantes sobre electrodos biocompatibilizados, completando algunos aspectos discutidos en este capítulo y abordando otros.

3.4- Referencias

- (1) Babcock, G. T.; Wikström, M. Oxygen Activation and the Conservation of Energy in Cell Respiration. *Nature* **1992**, 356 (6367), 301–309.
- (2) Pereira, M. M.; Santana, M.; Teixeira, M. A Novel Scenario for the Evolution of Haem–copper Oxygen Reductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2001**, 1505 (2–3), 185–208.
- (3) Pereira, M. M.; Teixeira, M. Proton Pathways, Ligand Binding and Dynamics of the Catalytic Site in Haem-Copper Oxygen Reductases: A Comparison between the Three Families. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2004**, 1655, 340–346.
- (4) Sousa, F. L.; Alves, R. J.; Ribeiro, M. A.; Pereira-Leal, J. B.; Teixeira, M.; Pereira, M. M. The Superfamily of Heme–copper Oxygen Reductases: Types and Evolutionary Considerations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2012**, 1817 (4), 629–637.
- (5) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science* **1995**, 269 (5227), 1069–1074.
- (6) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science* **1996**, 272 (5265), 1136–1144.
- (7) Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. Structure at 2.8 Å Resolution of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus Denitrificans*. *Nature* **1995**, 376 (6542), 660–669.
- (8) Tiefenbrunn, T.; Liu, W.; Chen, Y.; Katritch, V.; Stout, C. D.; Fee, J. A.; Cherezov, V. High Resolution Structure of the *ba₃* Cytochrome c Oxidase from *Thermus Thermophilus* in a Lipidic Environment. *PLoS ONE* **2011**, 6 (7), e22348.
- (9) Berks, B. C.; Ferguson, S. J.; Moir, J. W. B.; Richardson, D. J. Enzymes and Associated Electron Transport Systems That Catalyse the Respiratory Reduction of Nitrogen Oxides and Oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1995**, 1232 (3), 97–173.
- (10) Haltia, T.; Brown, K.; Tegoni, M.; Cambillau, C.; Saraste, M.; Mattila, K.; Djinojic-Carugo, K. Crystal Structure of Nitrous Oxide Reductase from *Paracoccus Denitrificans* at 1.6 Å Resolution. *Biochem. J.* **2003**, 369 (1), 77–88.
- (11) Schneider, L. K.; Einsle, O. Role of Calcium in Secondary Structure Stabilization during Maturation of Nitrous Oxide Reductase. *Biochemistry (Mosc.)* **2016**, 55 (10), 1433–1440.
- (12) Brown, K.; Tegoni, M.; Prudêncio, M.; Pereira, A. S.; Besson, S.; Moura, J. J.; Moura, I.; Cambillau, C. A Novel Type of Catalytic Copper Cluster in Nitrous Oxide Reductase. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7 (3), 191–195.
- (13) Kroneck, P. M. H.; Riester, J.; Zumft, W. G.; Antholine, W. E. The Copper Site in Nitrous Oxide Reductase. *Biol. Met.* **1990**, 3 (2), 103–109.
- (14) Pomowski, A.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H.; Einsle, O. N₂O Binding at a [4Cu:2S] Copper–sulphur Cluster in Nitrous Oxide Reductase. *Nature* **2011**, 477 (7363), 234–237.

- (15) Blackburn, N. J.; de Vries, S.; Barr, M. E.; Houser, R. P.; Tolman, W. B.; Sanders, D.; Fee, J. A. X-Ray Absorption Studies on the Mixed-Valence and Fully Reduced Forms of the Soluble Cu_A Domains of Cytochrome c Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (26), 6135–6143.
- (16) Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodruff, W. H.; van der Oost, J.; de Vries, S. Metal-Metal Bonding in Biology: EXAFS Evidence for a 2.5 Å Copper-Copper Bond in the Cu_A Center of Cytochrome Oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33* (34), 10401–10407.
- (17) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 11884–11885.
- (18) Andrew, C. R.; Han, J.; de Vries, S.; van der Oost, J.; Averill, B. A.; Loehr, T. M.; Sanders-Loehr, J. Cu_A of Cytochrome c Oxidase and the A Site of N₂O Reductase Are Tetrahedrally Distorted Type 1 Cu Cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (23), 10805–10806.
- (19) Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4366–4469.
- (20) Ramirez, B. E.; Malmstrom, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. The Currents of Life: The Terminal Electron-Transfer Complex of Respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (26), 11949–11951.
- (21) Beinert, H. Copper A of Cytochrome c Oxidase, A Novel, Long-Embattled, Biological Electron-Transfer Site. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245* (3), 521–532.
- (22) Alvarez-Paggi, D.; Zitare, U.; Murgida, D. H. The Role of Protein Dynamics and Thermal Fluctuations in Regulating Cytochrome C/cytochrome c Oxidase Electron Transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1196–1207.
- (23) Kroneck, P. M. H.; Antholine, W. E.; Kastrau, D. H. W.; Buse, G.; Steffens, G. C. M.; Zumft, W. G. Multifrequency EPR Evidence for a Bimetallic Center at the Cu_A Site in Cytochrome c Oxidase. *FEBS Lett.* **1990**, *268* (1), 274–276.
- (24) Lappalainen, P.; Aasa, R.; Malmström, B. G.; Saraste, M. Soluble Cu_A-Binding Domain from the Paracoccus Cytochrome c Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (35), 26416–26421.
- (25) Farrar, J. A.; Lappalainen, P.; Zumft, W. G.; Saraste, M.; Thomson, A. J. Spectroscopic and Mutagenesis Studies on the Cu_A Centre from the Cytochrome-c Oxidase Complex of Paracoccus Denitrificans. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1995**, *232* (1), 294–303.
- (26) Gamelin, D. R.; Randall, D. W.; Hay, M. T.; Houser, R. P.; Mulder, T. C.; Canters, G. W.; de Vries, S.; Tolman, W. B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Spectroscopy of Mixed-Valence Cu_A-Type Centers: Ligand-Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (21), 5246–5263.
- (27) Andrew, C. R.; Fraczkiewicz, R.; Czernuszewicz, R. S.; Lappalainen, P.; Saraste, M.; Sanders-Loehr, J. Identification and Description of Copper-Thiolate Vibrations in the Dinuclear Cu_A Site of Cytochrome c Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (43), 10436–10445.

- (28) Andrew, C. R.; Sanders-Loehr, J. Copper–Sulfur Proteins: Using Raman Spectroscopy To Predict Coordination Geometry. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29* (8), 365–372.
- (29) Andrew, C. R.; Lappalainen, P.; Saraste, M.; Hay, M. T.; Lu, Y.; Dennison, C.; Canters, G. W.; Fee, J. A.; Nakamura, N.; Sanders-Loehr, J. Engineered Cupredoxins and Bacterial Cytochrome c Oxidases Have Similar Cu_A Sites: Evidence from Resonance Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (43), 10759–10760.
- (30) Harkins, S. B.; Peters, J. C. Amido-Bridged Cu₂N₂ Diamond Cores That Minimize Structural Reorganization and Facilitate Reversible Redox Behavior between a Cu^I Cu^I and a Class III Delocalized Cu^{1.5} Cu^{1.5} Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (9), 2885–2893.
- (31) Mankad, N. P.; Rivard, E.; Harkins, S. B.; Peters, J. C. Structural Snapshots of a Flexible Cu₂P₂ Core That Accommodates the Oxidation States Cu^I Cu^I, Cu^{1.5} Cu^{1.5}, and Cu^{II} Cu^{II}. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 16032–16033.
- (32) Gupta, R.; Zhang, Z. H.; Powell, D.; Hendrich, M. P.; Borovik, A. S. Synthesis and Characterization of Completely Delocalized Mixed-Valent Dicopper Complexes. *Inorg. Chem.* **2002**, *41* (20), 5100–5106.
- (33) He, C.; Lippard, S. J. Synthesis and Characterization of Several Dicopper(I) Complexes and a Spin-Delocalized Dicopper(I,II) Mixed-Valence Complex Using a 1,8-Naphthyridine-Based Dinucleating Ligand. *Inorg. Chem.* **2000**, *39* (23), 5225–5231.
- (34) Barr, M. E.; Smith, P. H.; Antholine, W. E.; Spencer, B. Crystallographic, Spectroscopic and Theoretical Studies of an Electron-Deiocalized Cu(1.5)–Cu(1.5) Complex. *J Chem Soc Chem Commun* **1993**, No. 21, 1649–1652.
- (35) Lu, Y. Biosynthetic Inorganic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (34), 5588–5601.
- (36) Harding, C.; McKee, V.; Nelson, J. Highly Delocalized Cu(I)/Cu(II); a Copper-Copper Bond? *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (25), 9684–9685.
- (37) Coyle, J. L.; Elias, H.; Herlinger, E.; Lange, J.; Nelson, J. Electron Self-Exchange Kinetics in Two Average-Valence Dicopper Cryptates. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6* (3), 285–291.
- (38) Houser, R. P.; Young, V. G.; Tolman, W. B. A Thiolate-Bridged, Fully Delocalized Mixed-Valence Dicopper(I,II) Complex That Models the Cu_A Biological Electron-Transfer Site. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (8), 2101–2102.
- (39) Gennari, M.; Pécaut, J.; DeBeer, S.; Neese, F.; Collomb, M.-N.; Duboc, C. A Fully Delocalized Mixed-Valence Bis-μ(Thiolato) Dicopper Complex: A Structural and Functional Model of the Biological Cu_A Center. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (25), 5662–5666.
- (40) Gennari, M.; Pécaut, J.; Collomb, M.-N.; Duboc, C. A Copper Thiolate Centre for Electron Transfer: Mononuclear vs. Dinuclear Complexes. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (11), 3130.
- (41) van der Oost, J.; Lappalainen, P.; Musacchio, A.; Warne, A.; Lemieux, L.; Rumbley, J.; Gennis, R. B.; Aasa, R.; Pascher, T.; Malmström, B. G. Restoration of a Lost Metal-Binding Site: Construction of Two Different Copper Sites into a Subunit of the E. Coli Cytochrome O Quinol Oxidase Complex. *EMBO J.* **1992**, *11* (9), 3209–3217.

- (42) Kelly, M.; Lappalainen, P.; Talbo, G.; Haltia, T.; van der Oost, J.; Saraste, M. Two Cysteines, Two Histidines, and One Methionine Are Ligands of a Binuclear Purple Copper Center. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (22), 16781–16787.
- (43) Savelieff, M. G.; Lu, Y. Cu_A Centers and Their Biosynthetic Models in Azurin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (4), 461–483.
- (44) Steffens, G. J.; Buse, G. Studies on Cytochrome *c* Oxidase, IV[1–3]. Primary Structure and Function of Subunit II. *Hoppe-Seylers Z. Für Physiol. Chem.* **1979**, *360* (4), 613–619.
- (45) Abriata, L. A.; Vila, A. J.; Dal Peraro, M. Molecular Dynamics Simulations of Apocupredoxins: Insights into the Formation and Stabilization of Copper Sites under Entatic Control. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19* (4–5), 565–575.
- (46) Zaballa, M.-E.; Abriata, L. A.; Donaire, A.; Vila, A. J. Flexibility of the Metal-Binding Region in Apo-Cupredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (24), 9254–9259.
- (47) Wittung, P.; Källebring, B.; Malmström, B. G. The Cupredoxin Fold Is Found in the Soluble Cu_A and CyoA Domains of Two Terminal Oxidases. *FEBS Lett.* **1994**, *349* (2), 286–288.
- (48) Hay, M.; Richards, J. H.; Lu, Y. Construction and Characterization of an Azurin Analog for the Purple Copper Site in Cytochrome *c* Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (1), 461–464.
- (49) Hay, M. T.; Ang, M. C.; Gamelin, D. R.; Solomon, E. I.; Antholine, W. E.; Ralle, M.; Blackburn, N. J.; Massey, P. D.; Wang, X.; Kwon, A. H.; Lu, Y. Spectroscopic Characterization of an Engineered Purple Cu_A Center in Azurin. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (2), 191–198.
- (50) Hwang, H. J.; Lu, Y. pH-Dependent Transition between Delocalized and Trapped Valence States of a Cu_A Center and Its Possible Role in Proton-Coupled Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (35), 12842–12847.
- (51) Lukoyanov, D.; Berry, S. M.; Lu, Y.; Antholine, W. E.; Scholes, C. P. Role of the Coordinating Histidine in Altering the Mixed Valency of Cu_A: An Electron Nuclear Double Resonance-Electron Paramagnetic Resonance Investigation. *Biophys. J.* **2002**, *82* (5), 2758–2766.
- (52) Xie, X.; Gorelsky, S. I.; Sarangi, R.; Garner, D. K.; Hwang, H. J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Perturbations to the Geometric and Electronic Structure of the Cu_A Site: Factors That Influence Delocalization and Their Contributions to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5194–5205.
- (53) Gorelsky, S. I.; Xie, X.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Solomon, E. I. The Two-State Issue in the Mixed-Valence Binuclear Cu_A Center in Cytochrome *c* Oxidase and N₂O Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (51), 16452–16453.
- (54) Wang, K.; Geren, L.; Zhen, Y.; Ma, L.; Ferguson-Miller, S.; Durham, B.; Millett, F. Mutants of the Cu_A Site in Cytochrome *c* Oxidase of Rhodobacter Sphaeroides: II. Rapid Kinetic Analysis of Electron Transfer. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (7), 2298–2304.
- (55) Zickermann, V.; Verkhovsky, M.; Morgan, J.; Wikstrom, M.; Anemuller, S.; Bill, E.; Steffens, G. C. M.; Ludwig, B. Perturbation of the Cu_A Site in Cytochrome-*c* Oxidase of Paracoccus Denitrificans by Replacement of Met227 with Isoleucine. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234* (2), 686–693.

- (56) Wang, K.; Zhen, Y.; Sadoski, R.; Grinnell, S.; Geren, L.; Ferguson-Miller, S.; Durham, B.; Millett, F. Definition of the Interaction Domain for Cytochrome Con Cytochrome c Oxidase: II. Rapid kinetic analysis of electron transfer from Cytochrome c to *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome oxidase surface mutants. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (53), 38042–38050.
- (57) Slutter, C. E.; Sanders, D.; Wittung, P.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Fee, J. A. Water-Soluble, Recombinant Cu_A-Domain of the Cytochrome *Ba*₃ Subunit II from *Thermus Thermophilus*. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35* (11), 3387–3395.
- (58) Williams, P. A.; Blackburn, N. J.; Sanders, D.; Bellamy, H.; Stura, E. A.; Fee, J. A.; McRee, D. E. The Cu_A Domain of *Thermus Thermophilus ba*₃-Type Cytochrome c Oxidase at 1.6 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6* (6), 509–516.
- (59) Myers, T. W.; Gelfand, D. H. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus Thermophilus* DNA Polymerase. *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, *30* (31), 7661–7666.
- (60) Hall, J. F.; Kanbi, L. D.; Strange, R. W.; Hasnain, S. S. Role of the Axial Ligand in Type 1 Cu Centers Studied by Point Mutations of Met148 in Rusticyanin. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38* (39), 12675–12680.
- (61) Li, H.; Webb, S. P.; Ivanic, J.; Jensen, J. H. Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 8010–8019.
- (62) Hwang, H. J.; Berry, S. M.; Nilges, M. J.; Lu, Y. Axial Methionine Has Much Less Influence on Reduction Potentials in a Cu_A Center than in a Blue Copper Center. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7274–7275.
- (63) Abriata, L. A.; Alvarez-Paggi, D.; Ledesma, G. N.; Blackburn, N. J.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Alternative Ground States Enable Pathway Switching in Biological Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (43), 17348–17353.
- (64) Farrar, J. A.; Neese, F.; Lappalainen, P.; Kroneck, P. M. H.; Saraste, M.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. The Electronic Structure of Cu_A: A Novel Mixed-Valence Dinuclear Copper Electron-Transfer Center. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (46), 11501–11514.
- (65) Neese, F.; Kappl, R.; Hüttermann, J.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H. Probing the Ground State of the Purple Mixed Valence Cu_A Center in Nitrous Oxide Reductase: A CW ENDOR (X-Band) Study of the ⁶⁵Cu, ¹⁵N-Histidine Labeled Enzyme and Interpretation of Hyperfine Couplings by Molecular Orbital Calculations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3* (1), 53–67.
- (66) Olsson, M. H. M.; Ryde, U. Geometry, Reduction Potential, and Reorganization Energy of the Binuclear Cu_A Site, Studied by Density Functional Theory. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (32), 7866–7876.
- (67) Neese, F.; Zumft, W. G.; Antholine, W. E.; Kroneck, P. M. H. The Purple Mixed-Valence Cu_A Center in Nitrous-Oxide Reductase: EPR of the Copper-63-, Copper-65-, and Both Copper-65- and [¹⁵N]Histidine-Enriched Enzyme and a Molecular Orbital Interpretation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (36), 8692–8699.
- (68) Salgado, J.; Warmerdam, G.; Bubacco, L.; Canters, G. W. Understanding the Electronic Properties of the Cu_A Site from the Soluble Domain of Cytochrome c Oxidase through Paramagnetic ¹H NMR. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37* (20), 7378–7389.

- (69) Abriata, L. A.; Ledesma, G. N.; Pierattelli, R.; Vila, A. J. Electronic Structure of the Ground and Excited States of the Cu_A Site by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 1939–1946.
- (70) Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in Cu_A Sites of Cytochrome c Oxidase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (33), 9555–9559.
- (71) Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (24), 6302–6306.
- (72) Slutter, C. E.; Gromov, I.; Richards, J. H.; Pecht, I.; Goldfarb, D. Mutations of the Weak Axial Ligand in the *Thermus* Cu_A Center Modulates Its Electronic Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (21), 5077–5078.
- (73) Aksenov, V. L.; Koval'chuk, M. V.; Kuz'min, A. Y.; Purans, Y.; Tyutyunnikov, S. I. Development of Methods of EXAFS Spectroscopy on Synchrotron Radiation Beams: Review. *Crystallogr. Rep.* **2006**, *51* (6), 908–935.
- (74) Efremov, E. V.; Ariese, F.; Gooijer, C. Achievements in Resonance Raman Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *606* (2), 119–134.
- (75) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 11884–11885.
- (76) Gray, H. B.; Malmström, B. G.; Williams, R. J. P. Copper Coordination in Blue Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5* (5), 551–559.
- (77) Muresanu, L.; Pristovsek, P.; Lohr, F.; Maneg, O.; Mukrasch, M. D.; Ruterjans, H.; Ludwig, B.; Lucke, C. The Electron Transfer Complex between Cytochrome c₅₅₂ and the Cu_A Domain of the *Thermus Thermophilus* ba₃ Oxidase: a combined NMR and computational approach. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (20), 14503–14513.
- (78) Kroneck, P. M. H.; Antholine, W. A.; Riester, J.; Zumft, W. G. The Nature of the Cupric Site in Nitrous Oxide Reductase and of Cu_A in Cytochrome c Oxidase. *FEBS Lett.* **1989**, *248* (1–2), 212–213.
- (79) Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. Mimicking Protein–Protein Electron Transfer: Voltammetry of *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin and the *Thermus Thermophilus* Cu_A Domain at ω-Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (43), 13954–13961.
- (80) Alvarez-Paggi, D.; Abriata, L. A.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Native Cu(A) Redox Sites Are Largely Resilient to pH Variations within a Physiological Range. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49* (47), 5381–5383.
- (81) Mabbott, G. A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (9), 697.
- (82) Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (9), 702.
- (83) Heinze, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. New Analytical Methods(25). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23* (11), 831–847.
- (84) Marshall, N. M.; Garner, D. K.; Wilson, T. D.; Gao, Y.-G.; Robinson, H.; Nilges, M. J.; Lu, Y. Rationally Tuning the Reduction Potential of a Single Cupredoxin beyond the Natural Range. *Nature* **2009**, *462* (7269), 113–116.

- (85) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Eicken, C.; Loschi, L.; Sola, M. Redox Chemistry and Acid–Base Equilibria of Mitochondrial Plant Cytochromes *c*. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38* (17), 5553–5562.
- (86) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E.; Loschi, L.; Warmerdam, G.; Sola, M. Enthalpic and Entropic Contributions to the Mutational Changes in the Reduction Potential of Azurin. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (23), 6707–6712.
- (87) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Di Rocco, G.; Ranieri, A.; Sola, M. Enthalpy/entropy Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Electron Transport Metalloproteins. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9* (1), 23–26.
- (88) Garner, D. K.; Vaughan, M. D.; Hwang, H. J.; Savelieff, M. G.; Berry, S. M.; Honek, J. F.; Lu, Y. Reduction Potential Tuning of the Blue Copper Center in *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin by the Axial Methionine as Probed by Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15608–15617.
- (89) Bertrand, P.; Mbarki, O.; Asso, M.; Blanchard, L.; Guerlesquin, F.; Tegoni, M. Control of the Redox Potential in c-Type Cytochromes: Importance of the Entropic Contribution. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (35), 11071–11079.
- (90) Cohen, D. S.; Pielak, G. J. Entropic Stabilization of Cytochrome *c* upon Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (6), 1675–1677.
- (91) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Ranieri, A.; Sola, M. Control of Cytochrome *c* Redox Potential: Axial Ligation and Protein Environment Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (19), 5315–5324.
- (92) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Menziani, M. C.; De Rienzo, F.; Sola, M. Control of Metalloprotein Reduction Potential: The Role of Electrostatic and Solvation Effects Probed on Plastocyanin Mutants. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (21), 6422–6430.
- (93) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Sola, M. Redox Thermodynamics, Acid–Base Equilibria and Salt-Induced Effects for the Cucumber Basic Protein. General Implications for Blue-Copper Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2* (3), 350–359.
- (94) Guckert, J. A.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I. Electronic Structure of the Reduced Blue Copper Active Site: Contributions to Reduction Potentials and Geometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (10), 2817–2844.
- (95) Solomon, E. I.; Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Lowery, M. D.; Shadle, S. E.; Guckert, J. A.; LaCroix, L. B. Electronic Structure of the Oxidized and Reduced Blue Copper Sites: Contributions to the Electron Transfer Pathway, Reduction Potential, and Geometry. *Inorganica Chim. Acta* **1996**, *243* (1–2), 67–78.
- (96) Grunwald, E.; Steel, C. Solvent Reorganization and Thermodynamic Enthalpy–Entropy Compensation. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (21), 5687–5692.
- (97) Zheng, H.; Kellog, S.; Erickson, A.; Dubauskie, N.; Smith, E. Redox Properties of Rubredoxin Variants as a Function of Solvent Composition and Temperature: Investigation of Monopolar and Dipolar Interactions. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (1–2), 12–18.
- (98) Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E.; Jeuken, L. J. C.; Ranieri, A.; Sola, M. Control of Metalloprotein Reduction Potential: Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Blue Copper Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42* (30), 9214–9220.

- (99) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Righi, F.; Sola, M. Redox Thermodynamics of Blue Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (3), 501–506.
- (100) Guss, J. M.; Harrowell, P. R.; Murata, M.; Norris, V. A.; Freeman, H. C. Crystal Structure Analyses of Reduced (CuI) Poplar Plastocyanin at Six pH Values. *J. Mol. Biol.* **1986**, *192* (2), 361–387.
- (101) Mitchell Guss, J.; Freeman, H. C. Structure of Oxidized Poplar Plastocyanin at 1.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1983**, *169* (2), 521–563.
- (102) Banci, L.; Bertini, I.; Bren, K. L.; Gray, H. B.; Sompornpisut, P.; Turano, P. Solution Structure of Oxidized *Saccharomyces Cerevisiae* Iso-1-Cytochrome c. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (29), 8992–9001.
- (103) Banci, L.; Bertini, I.; Huber, J. G.; Spyroulias, G. A.; Turano, P. Solution Structure of Reduced Horse Heart Cytochrome c. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4* (1), 21–31.
- (104) Bertini, I.; Bryant, D. A.; Ciurli, S.; Dikiy, A.; Fernandez, C. O.; Luchinat, C.; Safarov, N.; Vila, A. J.; Zhao, J. Backbone Dynamics of Plastocyanin in Both Oxidation States: solution structure of the reduced form and comparison with the oxidized state. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (50), 47217–47226.
- (105) Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; DeBeer George, S.; Basumallick, L. Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 419–458.
- (106) Dennison, C. Investigating the Structure and Function of Cupredoxins. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (24), 3025–3054.
- (107) Berry, S. M.; Ralle, M.; Low, D. W.; Blackburn, N. J.; Lu, Y. Probing the Role of Axial Methionine in the Blue Copper Center of Azurin with Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (29), 8760–8768.
- (108) Hopp, T. P.; Woods, K. R. Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78* (6), 3824–3828.
- (109) Liu, L.; Guo, Q.-X. Isokinetic Relationship, Isoequilibrium Relationship, and Enthalpy–Entropy Compensation. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (3), 673–696.
- (110) Yasui, M.; Miyahara, T.; Aizawa, T.; Demura, M.; Nitta, K. Differential Scanning Calorimetry of a Metalloprotein under Controlled Metal–Ion Activity. *Protein J.* **2006**, *25* (7–8), 475–482.

*El sitio de Cu_A en
la interfaz
electrodo-solución*

El sitio de Cu_A en la interfaz electrodo-solución

4.1- Introducción

El estudio funcional de proteínas redox es un aspecto de enorme relevancia para una completa caracterización y existen distintas estrategias para su abordaje. Como se desarrolló en el capítulo anterior, el empleo de técnicas electroquímicas, en particular la voltametría cíclica (VC), es una poderosa herramienta en el escrutinio de parámetros termodinámicos de la reacción de TE para el sitio activo de Tt-Cu_A (ver detalles en las secciones 3.2.3 y 3.2.4). Sin embargo, los experimentos allí discutidos no brindan información sobre la cinética del proceso, aspecto clave para entender los mecanismos que lo regulan. Si bien existen técnicas electroquímicas que permiten abordar la cinética de la reacción para especies en solución, la componente difusional presente en tales condiciones experimentales produce una importante limitación en la calidad y precisión de los resultados. Una invaluable herramienta para eludir este problema, y la elegida en esta tesis, es la adsorción de la muestra proteica sobre la superficie de un electrodo biocompatible.

Este enfoque implica un importante obstáculo inicial, ya que no es trivial generar este tipo de sistemas (proteína/electrodo) donde exista una comunicación directa entre el electrodo de trabajo y el sitio redox sin perjudicar la integridad estructural de la proteína, ergo su funcionalidad (ver detalles en la sección 1.2.4). A pesar de esta dificultad, los primeros reportes de medidas exitosas y reproducibles de proteínas redox en estado adsorbido datan de hace casi tres décadas, y desde entonces se han desarrollado varias estrategias para lograrlo ¹⁻⁶. Sin duda, una de las más populares ha sido la biocompatibilización de electrodos metálicos a partir de su recubrimiento con una monocapa autoensamblada (SAM) de alcanotioles ω -sustituídos ⁷⁻¹⁰. En este capítulo se hará foco con especial interés en los resultados experimentales obtenidos a partir de Tt-Cu_A y las distintas mutantes presentadas en el capítulo 3 adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs de alcanotioles ω -sustituídos.

4.1.1- Adsorción de Tt-Cu_A sobre electrodos biocompatibles

El dominio de Cu_A de la citocromo c oxidasa (CcO) es la región de la proteína que contiene a su aceptor primario de electrones, el sitio de Cu_A, y que además interactúa con el citocromo c (Cyt c) ¹¹. La región de reconocimiento entre ambas proteínas

presenta una amplia variabilidad entre especies, desde interacciones fuertemente electrostáticas entre regiones cargadas de polaridades opuestas hasta parches hidrofóbicos de estructura complementaria ¹²⁻¹⁷. El análisis de estos mecanismos de reconocimiento resulta de gran utilidad a la hora de diseñar estrategias de adsorción sobre electrodos biocompatibilizados. A partir de recrear este tipo de interacciones es posible no sólo la inmovilización de la enzima, sino también inducir una orientación promedio favorable a la transferencia electrónica (TE) heterogénea.

En el caso de la CcO de *T. Thermophilus*, la formación del complejo con el Cyt *c*₅₅₂ (su *partner* biológico) involucra tres segmentos particulares del dominio de Cu_A de la subunidad II ^{16,18}. El segmento I (Ala87, Phe88, Gly89, y Tyr90) es el más conservado entre las especies conocidas, el segmento II (Asp111, Val112, Ile113, y His114) participa además de la interacción con la subunidad I de la CcO y el segmento III (Gly154, Leu155, Cys156, His157, Gln158, Asn159 y Met160) no presenta aminoácidos cargados y es el de mayor accesibilidad al solvente cuando el complejo CcO/ Cyt *c*₅₅₂ no está formado (figura 4-1). Estos residuos dotan de un carácter hidrofóbico a la región de interacción entre la CcO de *T. Thermophilus* y el Cyt *c*₅₅₂, lo cual resulta poco común ya que en la mayoría de los casos conocidos el complejo CcO/ Cyt *c* involucra interacciones mayormente electrostáticas ¹⁵⁻¹⁷.

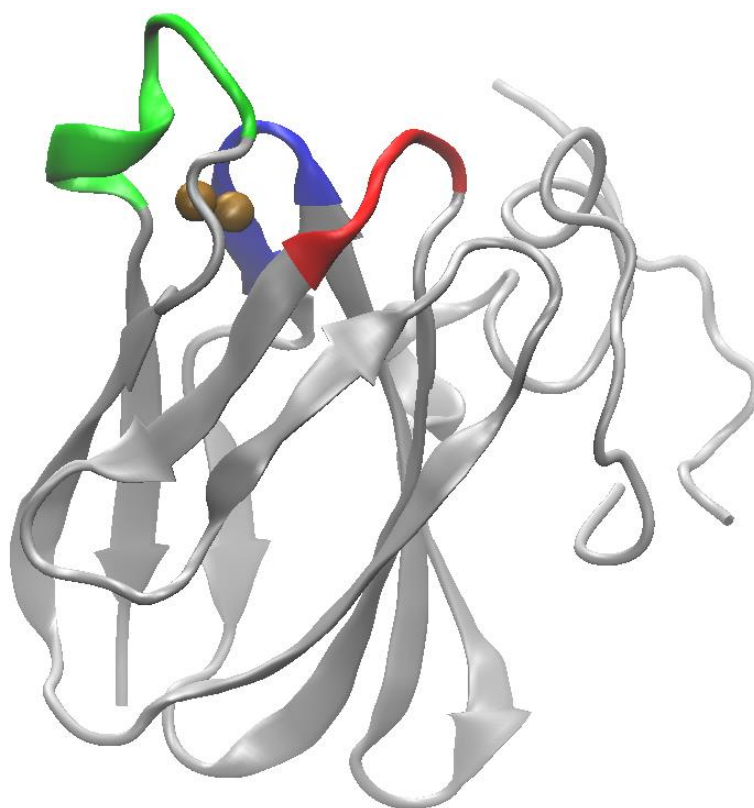


Figura 4-1. Representación esquemática de *Tt*-Cu_A (PDB: 2CUA). Se destacan en azul, rojo y verde los segmentos I, II y III respectivamente, y en bronce los dos átomos de cobre.

El primer reporte de medidas electroquímicas de Tt-Cu_A adsorbida sobre electrodos biocompatibles corresponde a Fujita y colaboradores, que emplearon SAMs mixtas de alcanotioles funcionalizados con grupos metilo e hidroxilo, compatible con el parche hidrofóbico de interacción con su *partner* biológico, el Cyt c₅₅₂ ¹⁹ (figura 4-1). Para este sistema se reportó una TE eficiente y se estimó un valor relativamente bajo de energía de reorganización (λ), atribuible parcialmente al carácter hidrofóbico de la interacción Tt-Cu_A/SAM, similar al de la formación del complejo CcO/Cyt c₅₅₂. Resulta destacable que, si bien hacia mediados de los 90' se realizaron los primeros estudios mediante el uso de técnicas electroquímicas convencionales sobre Tt-Cu_A, fue casi una década más tarde cuando se logró realizar este tipo de estudios sobre especies adsorbidas ^{19,20}.

El segmento III (partícipe también de la interacción entre las subunidades 1 y 2 de la CcO), que está expuesto a solvente, queda completamente embebido en la interface CcO/Cyt c₅₅₂ al formarse el complejo entre ambas proteínas. A partir de esta interacción se forma un “bolsillo” que expone el carbonilo amídico del residuo C153 (estrictamente conservada en todas las variantes reportadas), haciéndola accesible a la formación de un puente de hidrogeno ²¹⁻²⁵ (figura 4-2). Dado el comportamiento electroquímico de Tt-Cu_A adsorbida, se ha postulado que en la interacción Tt-Cu_A/SAM se conservaría esta accesibilidad, permitiendo la formación de un puente de hidrógeno entre el carbonilo amídico de la Cisteína 153 y un hidroxilo de la SAM, lo cual favorecería el acoplamiento electrónico para una TE eficiente ^{19,26,27}. Esta hipótesis se fundamenta en estudios de TE intermolecular entre la subunidad de Cu_A de algunas CcOs con sus respectivos *partners* biológicos, empleando en algunos casos mutantes puntuales que distorsionan la accesibilidad del carbonilo amídico del residuo C153 (que para cada especie tendrá una posición distinta en la secuencia aminoacídica) ^{15,17,28}.

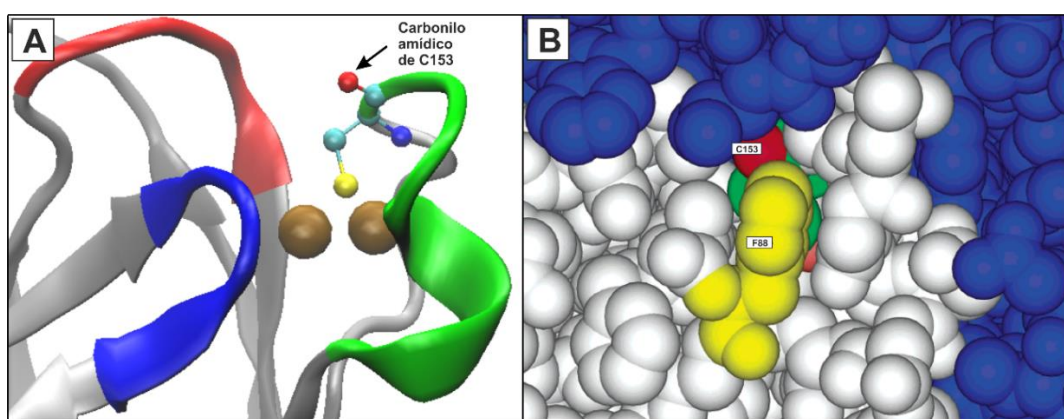


Figura 4-2. (A) Ampliación del sitio activo de Tt-Cu_A (figura 4-1), señalando el carbonilo amídico (rojo) del ligando coordinante cisteína 153. (B) (figura adaptada de Fujita et al. 2004 ¹⁹). Representación del complejo formado entre la subunidad de Cu_A de la CcO de *T. Thermophilus* (blanco) y el Cyt c₅₅₂ (azul). La fenilalanina (amarillo) permite la formación del “bolsillo” que hace accesible el carbonilo amídico C153 (rojo).

4.1.2- Primeros resultados a partir del sistema Tt-Cu_A/SAM/Au

Una de las características más interesantes de los sistemas proteína/SAM/electrodo es la posibilidad de manipular de manera sencilla el espesor de las SAMs mediante el empleo de alcanotioles de distinto largo de cadena alifática ²⁹ (ver detalles en las secciones 1.2.4 y 2.2.1). De hecho, existen numerosos trabajos publicados en los cuales se estudia la dependencia de la constante de velocidad de la reacción de TE heterogénea (k_{TE}) en función de la distancia muestra-electrodo para diversos sistemas proteicos, como por ejemplo distintos citocromos o proteínas azules de cobre ³⁰⁻³⁵ (figura 4-3).

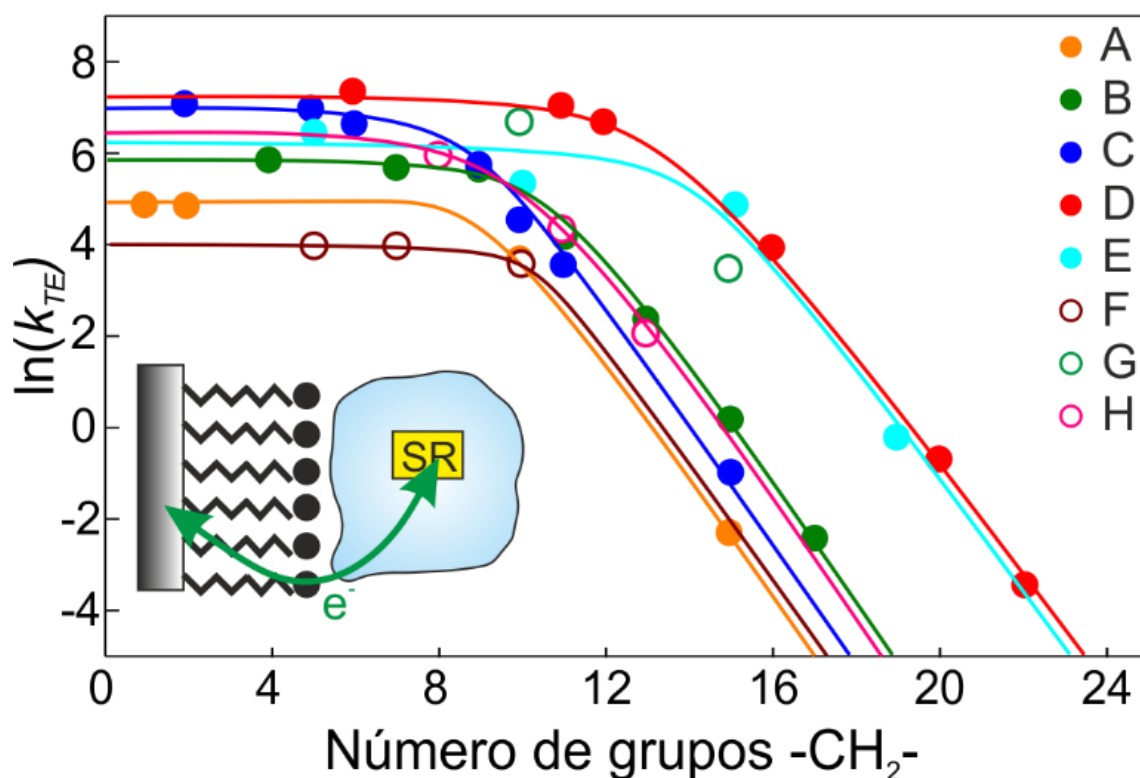


Figura 4-3. Dependencia (logarítmica) de k_{TE} con la distancia medida en número de metilenos de la SAM para el sitio redox (SR) de diversos sistemas proteicos. A: Cyt adsorbido sobre SAM(CO_2^-)/Ag ^{30,35,36}. B: Cyt adsorbido sobre SAM(CO_2^-)/Au ^{31,33,37,38}. C: Azurina adsorbida sobre SAM(CH_3)/Au ³². D: Cyt adsorbido sobre SAM(piridina)/Au ^{34,39}. E: Cyt (dominio del citocromo *caa3* oxidasa) adsorbido sobre SAM($CH_3:OH$)/Ag ⁴⁰. F: Cyt-*b*₅₆₂ adsorbido sobre SAM(NH_3^+)/Ag ⁴¹. G: Cyt-*c*₆ adsorbido sobre SAM($CH_3:OH$)/Ag ⁴². H: Tt-Cu_A adsorbida sobre SAM($CH_3:OH$)/Au ¹⁹.

Como se desarrolló en el capítulo 1, a partir del marco que brinda la teoría de Marcus se esperaba *a priori* una dependencia exponencial del valor de la k_{TE} con la distancia en este tipo de experimentos. En complejos inorgánicos y moléculas pequeñas se verifica

tal comportamiento, no obstante, la mayoría de las proteínas redox presentan desvíos que se manifiestan como un *plateau* a distancias cortas. A partir de la posibilidad de adsorber funcionalmente a Tt-Cu_A sobre una SAM, la realización de este tipo de estudios resultó inmediata, verificándose el mismo tipo de desvíos hacia SAMs delgadas, donde se alcanza un plateau para el valor de la k_{TE} ¹⁹ (figura 4-3). Este comportamiento, a primera vista anómalo, se observa independientemente del material utilizado como electrodo (oro, plata, distintos tipos de grafito), de las técnicas empleadas (VC, cronoamperometría, TR-SERRS), de las estrategias de inmovilización ensayadas (electrostática, hidrofóbica, coordinación, covalente) y de la naturaleza del centro redox (Cyt c, isocitocromo c, citocromo c₆, citocromo b₅₆₂, Azurina, Cu_A, etc.).

En todos los casos, los valores medidos de k_{TE} se encuentran aproximadamente entre 50 y 1100 s⁻¹, y por lo tanto por debajo de las resoluciones temporales de los métodos empleados. Existen diversas hipótesis planteadas que buscan explicar este fenómeno, la mayoría de ellas basadas conceptualmente en dos principios distintos (figura 4-4). En primer lugar, se ha propuesto que al disminuir la distancia entre la superficie del electrodo y el sitio redox, el acoplamiento electrónico (reflejado en el valor del elemento de matriz: $|H_{DA}|$) puede hacerse lo suficientemente grande como para que se produzca un cambio de régimen desde el no adiabático (o diabático) hacia el adiabático, también denominado como régimen de control friccional (figura 4-4 A). En este caso, la velocidad de la reacción de TE ya no se encontraría limitada por el tuneo electrónico a través de la SAM, sino por la frecuencia nuclear efectiva (ν_n) con la que se alcanza la intersección entre las curvas de reactivos y productos^{34,39,43,44} (ver detalles en la sección 1.3.1). Alternativamente, se plantean mecanismos en los cuales la proteína se encuentra adsorbida en una conformación u orientación preferencial que es redox inactiva, pudiendo interconvertirse con otra conformación u orientación redox activa (figura 4-4 B). A distancias proteína-electrodo muy chicas, el acoplamiento electrónico es tal que la velocidad de la reacción de TE pasaría a ser mayor que la de tal reorientación, volviéndose esta última el paso limitante de la cinética del proceso en su totalidad^{31,35,45-48}. Este paso limitante sería, en primera aproximación, independiente de la distancia muestra-electrodo.

Si bien existen casos puntuales en los cuales se ha podido determinar mediante mediciones directas el fenómeno que produce la independencia de k_{TE} con la distancia en la región del *plateau*, la mayoría de estos modelos propuestos se basan en evidencia experimental indirecta^{44,49,50}. Es evidente que los factores que determinan el tipo de fenómeno que gobierna la reacción de TE en condiciones de elevado acoplamiento electrónico están estrechamente vinculados con las particularidades de cada proteína redox. No obstante, algunos autores sugieren que la transición al régimen adiabático en tales condiciones constituye el caso general en cuanto a la independización del valor de la k_{TE} con la distancia entre donador (sitio redox) y aceptor (electrodo), relegando los otros mecanismos a las peculiaridades de cada sistema⁴⁴.

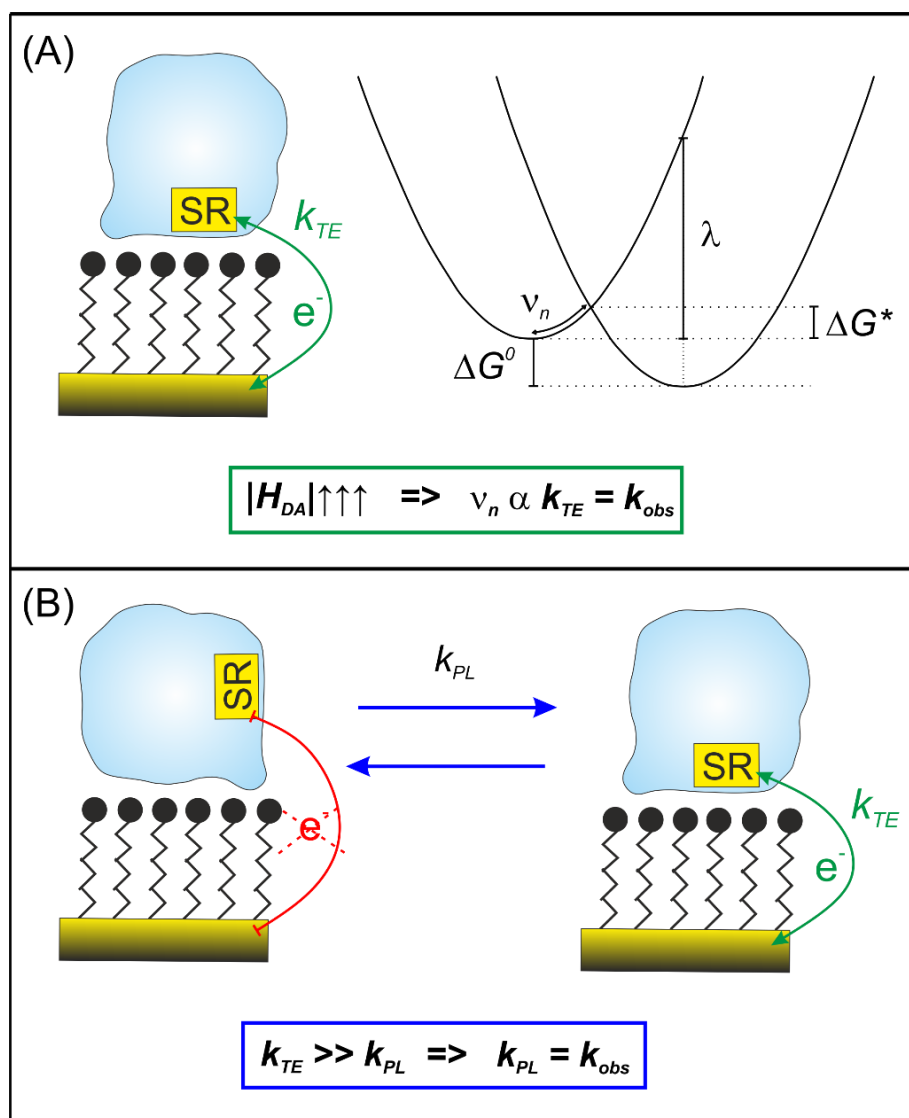


Figura 4-4. Representación esquemática de la reacción de TE heterogénea del sitio redox (SR) ante un acoplamiento electrónico $|H_{DA}|$ elevado, señalando los determinantes de la constante cinética observada (k_{obs}). (A) El régimen de control friccional gobierna la reacción de TE, por lo que no es la probabilidad del tuneleo electrónico (vinculada a $|H_{DA}|$) sino v_n la que determina el valor de k_{TE} (ver detalles en la sección 1.3.1). (B) La constante de velocidad de intercambio una conformación redox activa y otra inactiva (k_{PL}) es menor que el tuneleo electrónico, volviéndolo el paso limitante de la reacción de TE.

Si bien existen casos puntuales en los cuales se ha podido determinar mediante mediciones directas el fenómeno que produce la independencia de k_{TE} con la distancia en la región del *plateau*, la mayoría de estos modelos propuestos se basan en evidencia experimental indirecta ⁴⁹. No obstante, es evidente que los factores que determinan el tipo de fenómeno que gobierna la reacción de TE en condiciones de elevado acoplamiento electrónico están estrechamente vinculados con las particularidades de

cada proteína redox, aunque no de manera excluyente. Existen ejemplos de enzimas redox que a cortas distancias sitio-electrodo presentan las características o bien de un paso limitante (reorientación) o bien las del régimen adiabático de TE (control friccional) dependiendo de la estrategia utilizada para la inmovilización sobre el electrodo ^{34,39,47,51}. Estos reportes sugieren que aún en los casos donde se elimine el paso limitante de reorientación proteica, el cambio al régimen adiabático de TE a medida que el acoplamiento electrónico aumenta es inexorable ⁴⁴. Algunos autores sugieren que este cambio de régimen se constituiría como la generalidad en cuanto a la independización del valor de la k_{TE} con la distancia entre donador (sitio redox) y aceptor (electrodo), relegando los otros mecanismos a las peculiaridades de cada sistema.

Para el caso particular de Tt-Cu_A, no existen en la literatura estudios acerca del origen del *plateau* observado para SAMs delgadas. Sin embargo, fue en el Cyt *c* donde se desarrollaron muchos de los estudios mencionados sobre este tópico, existiendo distintas interpretaciones de resultados experimentales acerca de la presencia de un paso limitante de reorientación proteica o de un régimen adiabático de TE, así como condiciones experimentales que presentan resultados compatibles con ambos casos ^{34,39,47,48,51,52}. En particular, la reorientación fue propuesta como un posible paso en el mecanismo de TE electrónica *in vivo*, y la regulación de su cinética (por factores como el campo eléctrico interfacial, por ejemplo) como uno de las tantas posibles instancias regulatorias de la respiración celular ⁵³. Dado que el Cyt *c* es el *partner* biológico del sitio de Cu_A de la CcO, resulta de particular interés el estudio y caracterización de este tipo de fenómenos en un sitio nativo como el del modelo Tt-Cu_A, lo cual será abordado en este capítulo.

4.1.3- Dos estados redox activos en el sitio de Cu_A

Como se comentó en el capítulo anterior, el abordaje experimental del sitio de Cu_A nativo mediante técnicas electroquímicas resultó tardío, dada la variedad de dificultades experimentales que presenta. Por esta razón, hasta hace aproximadamente una década casi toda la información electroquímica sobre este sitio redox en un sistema biológico provenía del sitio artificial quimérico denominado Cu_A-Azu ¹⁰. Dado su carácter robusto, este sistema permitió el estudio y caracterización de las propiedades redox del sitio de Cu_A mediante la utilización de técnicas electroquímicas convencionales y algunos de los resultados obtenidos representaron fuertes implicancias desde el punto de vista fisiológico y evolutivo. Por un lado, se observó una transición dependiente del pH a partir de la cual el sitio de Cu_A alterna entre un estado de valencia mixta (VM) completamente simétrico (VMs) y otro donde la contribución a la función de onda electrónica de ambos iones metálicos es asimétrica (VMa). A partir de estos resultados fue propuesto un mecanismo regulatorio *in vivo* en el cual el sitio de Cu_A podría alternar entre un estado redox activo, el estado de VMs, y otro redox inactivo, el estado de VMa ^{54,55}. Por otro

lado, a partir de medidas electroquímicas sobre mutantes puntuales de la metionina axial, se determinó la baja influencia de este ligando sobre el valor del potencial redox (E^0), restándole importancia en la estructura electrónica y la funcionalidad del sitio de Cu_A ⁵⁶ (ver detalles en la sección 3.1.3).

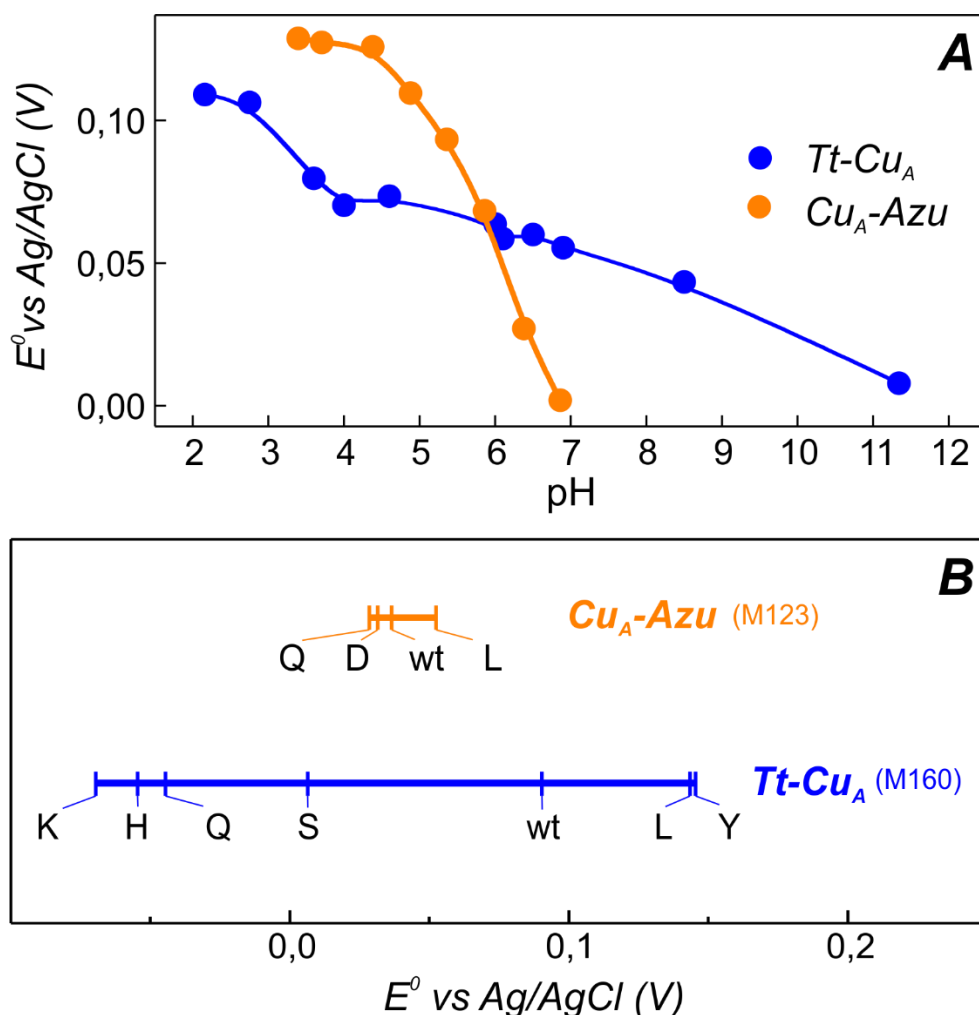


Figura 4-5. Diferencias en las características funcionales entre $Tt-Cu_A$ (azul) y Cu_A-Azu (naranja). (A) E^0 en función del pH, donde se observa un sensible contraste en la magnitud de la dependencia. (B) E^0 de distintas mutantes puntuales de ligando axial metionina, con un rol determinante en $Tt-Cu_A$, a diferencia de lo observado en Cu_A-Azu . Ver capítulo 3 para más detalles.

El desarrollo de $Tt-Cu_A$ y su estudio funcional permitió explorar este tipo de fenómenos por primera vez en un sitio nativo de Cu_A . A partir de diversos estudios espectroscópicos y electroquímicos sobre este modelo, algunos de los cuales se realizaron en nuestro laboratorio, se determinó que ninguna de estas conclusiones es extrapolable al sitio nativo (ver detalles en la sección 3.1.4). En particular se observó que

no existe transición dependiente del pH entre estados de VM de distinto grado de simetría y que además el ligado axial metionina 160 sí tiene un rol determinante en las propiedades redox del sitio de Cu_A ^{57,58} (figura 4-5). Estos resultados evidencian la importancia que presenta la matriz proteica sobre las propiedades del sitio de Cu_A, y motivaron la profundización en el estudio de Tt-Cu_A como un sistema modelo más adecuado.

En su forma oxidada el sitio de Cu_A es de VM y presenta una estructura electrónica que se puede describir mediante una (hiper) superficie de energía potencial (SEP) en función de la distancia Cu-Cu, con dos mínimos correspondientes a dos estados fundamentales alternativos accesibles a temperatura ambiente, los estados denominados σ_u^* y π_u (ver detalles en la sección 3.1.5). La diferencia de energía entre ambos estados ($\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$) implica un bajo poblamiento del estado alternativo π_u según la ley de Boltzman (5%), sumado a las predicciones de un alto valor de λ , propició que se desestimara su posible rol en la reacción de TE *in vivo* ⁵⁹⁻⁶¹. No obstante, algunos estudios en nuestro laboratorio habían demostrado que el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ puede ser modificado mediante mutaciones puntuales del ligando axial M160 ⁶². Más aún, las características del espectro UV-Vis indicativas de un aumento en el poblamiento del estado π_u , según la interpretación desarrollada en el capítulo anterior, están presentes en una variante modificada de quinol oxidasa de *Escherichia coli* ⁶³. Cabe destacar que los autores de aquel trabajo interpretaron los resultados espectroscópicos como prueba de que la variante desarrollada no recrea satisfactoriamente las características básicas del sitio de Cu_A.

La evidencia de los distintos casos sugería que tanto la primera esfera de coordinación como el resto de la matriz proteica podría estar cumpliendo un rol fundamental en la determinación del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Esto motivó el estudio computacional (mediante cálculos de tipo QM) de perturbaciones que permitieran el poblamiento del estado π_u en el sitio nativo de Cu_A, pero sin alterar significativamente la distancia Cu-Cu, observándose una variedad de distorsiones estructurales leves en el entorno de los iones metálicos que producían tal efecto ⁶². Se estudió, por ejemplo, el efecto de producir torsiones en los ángulos diedro N_{His114}-Cu-Cu-N_{His157} y Cu-S_{Cys149}-Cu-S_{Cys151}, o lo que es lo mismo, de romper la coplanaridad de las histidinas ligantes y la planaridad del motivo Cu₂S₂ (figura 4-6). En los distintos casos se observó la transición $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$ remontando barreras energéticas similares, en torno a los 600 cm⁻¹, y generando casi nulos cambios en la distancia Cu-Cu. Estos resultados sugieren que la elongación de la distancia Cu-Cu es simplemente una de las posibles coordenadas de la transición $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$, y que dicha transición puede ocurrir no sólo a través de otra coordenada, sino de muchas de ellas indistintamente o simultáneamente. Teniendo en cuenta la variedad de factores capaces de inducir este tipo de distorsiones *in vivo* (cambios en la atmosfera iónica o la protonación de residuos, interacción con interproteicas, etc.), este resultado cuestiona fuertemente la desestimación del estado π_u en la actividad biológica.

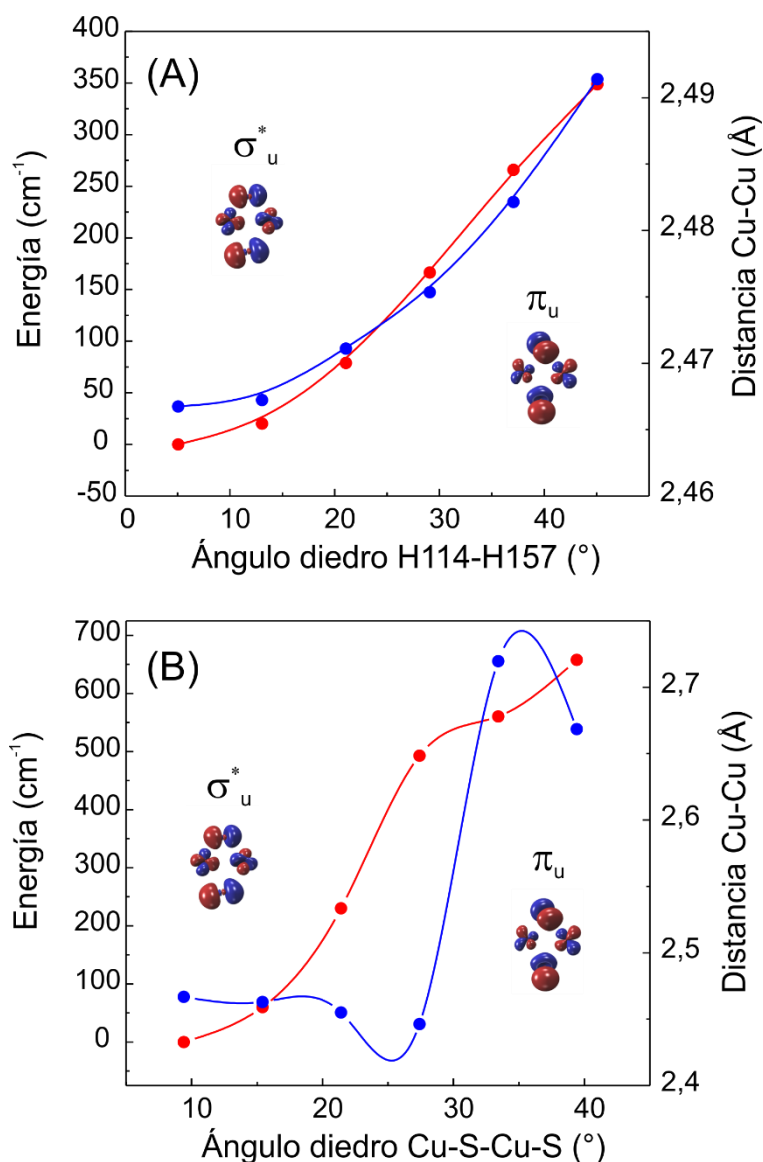


Figura 4-6. (figura adaptada de Abriata et al. 2012 ⁶²). *Energía (rojo) y distancia Cu-Cu (azul) en función de los ángulos diedro N_{His114} -Cu-Cu- N_{His157} (A) y Cu- S_{Cys149} -Cu- S_{Cys151} (B). Se indican las regiones donde se favorece cada estado fundamental alternativo.*

Algunos cálculos computacionales realizados a partir del sitio redox de Cu_A-Azu predijeron que tanto el *pathway* para la entrada como para la salida del electrón involucran a las cisteínas coordinantes, debido principalmente al alto grado de covalencia en el motivo Cu₂S₂ y la casi nula densidad de espín en el ligando axial metionina ²⁷. Sin embargo, estudios de RMN paramagnético sobre Tt-Cu_A revelan que, a diferencia de lo observado en el estado σ_u^* , existe una significativa densidad de espín sobre el ligando axial M160 en el estado π_u del sitio redox ⁵⁹. En nuestro laboratorio se realizaron cálculos computacionales que permitieron estudiar los *pathways* de entrada y salida del electrón en el proceso de TE, analizándolos a partir de evaluar las covalencias de ambos estados fundamentales alternativos. Los resultados indicaron que la TE desde

el hemo *c* del Cyt c_{552} maximiza el acoplamiento electrónico con la entrada del electrón a través de la metionina axial 160 (figura 4-2). La covalencia del átomo de azufre de este ligando con el ion metálico es 10 veces mayor en el estado π_u que en el estado σ_u^* , lo que supone una probabilidad de TE 100 veces mayor según la teoría de Marcus (ver detalles en la sección 1.3.1). Este resultado sugiere que el estado π_u , de ser redox activo, sería el más eficiente para la entrada de electrones desde el Cyt c_{552} dado el mayor acoplamiento electrónico que sobrecompensaría su bajo grado de poblamiento y el elevado valor de λ . Por su parte, para la reacción de TE desde el sitio de Cu_A en estado reducido al hemo *b* (o *a*) de la oxidasa, el cálculo de *pathways* indica que el acoplamiento electrónico es mayor a través de la histidina ecuatorial 157. Esto concuerda con resultados previos que sugieren a este ligando como posible punto de acoplamiento electrónico con la subunidad 1 de la CcO^{64–66} (figura 4-7). La covalencia del átomo de hidrógeno coordinante de la histidina 157 con el ion metálico del sitio reducido es el doble para el estado σ_u^* que para el estado π_u , implicando una probabilidad 4 veces mayor de tuneleo, lo cual sumado a su valor de λ bajo indica que el estado σ_u^* estaría optimizado para la salida del electrón. La propuesta en base a estos resultados fue que el sitio de Cu_A actuaría como conmutador alternando sus dos estados electrónicos fundamentales, favoreciendo la direccionalidad del proceso biológico⁶² (figura 4-7).

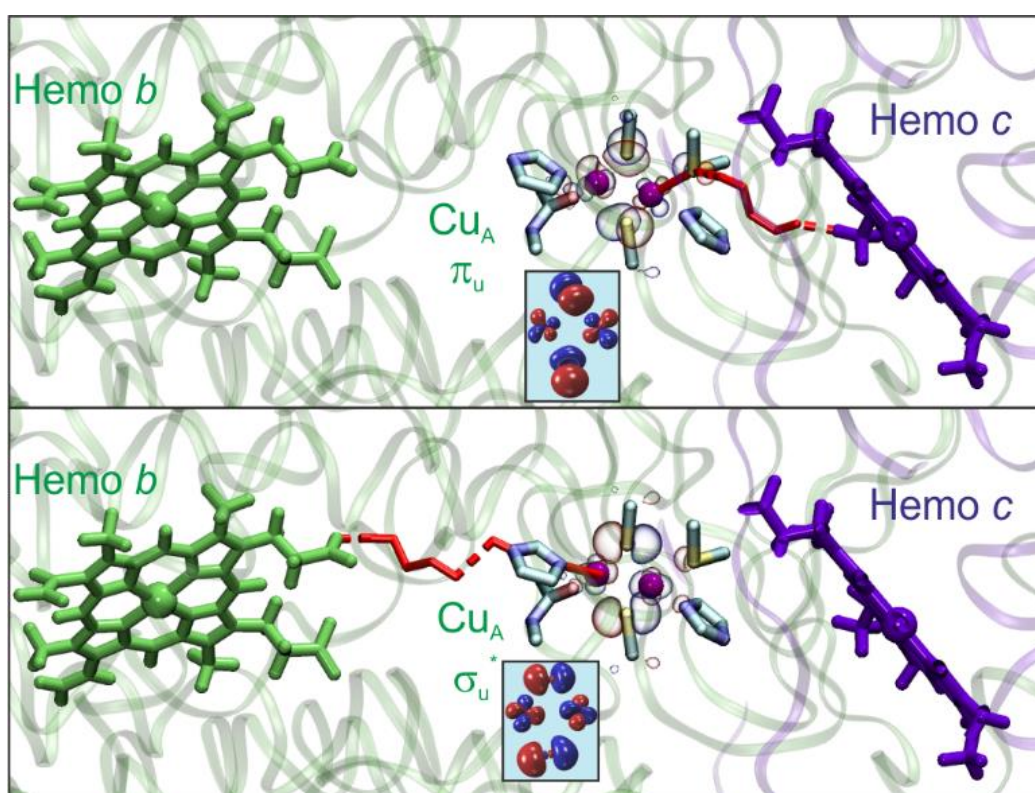


Figura 4-7. (arriba) *Pathway* optimizado desde el hemo *c* del Cyt *c* al sitio de Cu_A en el estado π_u . (abajo) *Pathway* optimizado desde el sitio de Cu_A en el estado σ_u^* al hemo *a* de la subunidad 1 de la CcO^{14,62,67}.

La reacción de TE entre los sitios redox de ambas enzimas presenta un bajo valor de energía libre (ΔG^0), característica que lo vuelve un proceso cuasi reversible. Esto resulta un factor determinante en cuanto al aprovechamiento energético a nivel fisiológico, pero a su vez aumenta las probabilidades de la reacción de TE inversa. La interconversión entre dos estados fundamentales alternativos optimizados para la entrada y la salida del electrón, respectivamente, conferiría direccionalidad al proceso de TE, dado que la reducción del sitio gatillaría el cambio de estado. Así, esta interconversión estaría previniendo que se produzca la reacción en sentido inverso y por lo tanto favoreciendo la continuidad del proceso hacia la reducción final del O_2 ⁶². Esto estaría compatibilizando dos características conocidas de este sistema (e indispensables para el sostenimiento de la vida): un valor ΔG^0 cercano a cero y una alta eficiencia de la reacción de TE ^{14,68,69}. El mecanismo propuesto podría configurar un punto clave en la regulación de uno de los procesos críticos para el sostenimiento de la vida sobre la tierra: la respiración celular. Sin embargo, no existe evidencia experimental de un sitio de Cu_A capaz de intercambiar su actividad redox entre ambos estados fundamentales alternativos. Por otra parte, el grado de complejidad del proceso completo, tanto por la multitud de actores como por la cantidad de variables implicadas, hace indispensable la profundización de su estudio en función de plantear modelos que permitan abordarlo más acabadamente.

Los campos eléctricos que existen como resultado de los distintos potenciales en la interfaz membrana-solución son, sin lugar a dudas, un factor determinante en el funcionamiento de estas enzimas, lo cual motiva el uso de entornos con algún grado de biomimetismo para su estudio (ver detalles en la sección 1.2). En particular, el uso de electrodos metálicos recubiertos con SAMs ofrecen no sólo estas ventajas, sino la posibilidad de manipular el campo eléctrico interfacial mediante el grosor del dieléctrico. A su vez, el entorno fisiológico puede presentar significativas variaciones en la atmosfera iónica y el pH a raíz del balance entre el bombeo protónico de los complejos respiratorios y la actividad de las ATP sintetasas. Cambios transientes en cualquiera de estas variables podrían afectar alguno (o varios) de los pasos que controlan el mecanismo de TE *in vivo*, actuando como factores reguladores de la reacción de TE en condiciones fisiológicas. Resulta entonces de enorme interés la exploración experimental de su efecto sobre las propiedades termodinámicas y cinéticas de la actividad redox del sitio de Cu_A .

4.2- Resultados

A lo largo de este capítulo se presentarán resultados principalmente electroquímicos de estudios realizados sobre Tt-Cu_A y las distintas variantes introducidas en el capítulo 3, adsorbidas sobre electrodos de oro biocompatibilizados con SAMs de alcanotioles ω -sustituidos. Se plantean dos objetivos específicos primordiales, en función de los cuales se analizarán también resultados obtenidos de diversos estudios espectroscópicos tanto de especies adsorbidas (SPR) como de especies en solución (RR, RMN, EPR, UV-Vis), para un abordaje más amplio del sistema. El primero de ellos es profundizar la caracterización desarrollada en el capítulo 3 de las distintas variantes del sitio de Cu_A, mejorando así la comprensión de la influencia de distintas perturbaciones mutagénicas sobre el sitio redox nativo en cuanto a sus propiedades funcionales. El segundo es estudiar el efecto de variables fisiológicamente relevantes como la fuerza iónica (I), el campo eléctrico, la distancia donador-aceptor y el pH, sobre tales propiedades. Ambos objetivos persiguen, en última instancia, realizar un aporte cualitativo en la construcción de un modelo conceptual acerca del rol fisiológico del sitio de Cu_A como intermediario electrónico y regulador en la respiración celular.

4.2.1- Adsorción sobre electrodos biocompatibles

El primer paso para el estudio de especies adsorbidas es la constitución de tal sistema, esto es, lograr una lámina o *film* de muestra proteica inmovilizada sobre los electrodos biocompatibles. Estudios previos en nuestro laboratorio sobre Tt-Cu_A y algunas mutantes puntuales permitieron el refinamiento de un protocolo publicado años atrás, siendo el punto de partida para el desarrollo experimental de este capítulo ^{19,57,62}. En pocas palabras, se incubaron electros de oro en soluciones etanólicas 5 mM de alcanotioles ω -sustituidos (de composición 3:2 SH-(CH₂)_n-OH: SH-(CH₂)_n-CH₃) durante una o dos noches para luego eluir el excedente (con alcohol y agua sucesivamente) e incubar el electrodo modificado en una solución aproximadamente 1 mM de muestra proteica durante dos horas (ver detalles en la sección 2.2.1). Este protocolo se utilizó para la adsorción de todas las variantes estudiadas (Tt-Cu_A, M160H, M160Q, Tt-3L y Tt-3L-M160H) sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs mixtas (3:2 OH:CH₃) de distinto espesor, conformando el sistema experimental proteína/SAM/Au sobre el que desarrollaron todos los experimentos de VC (figura 4-8).

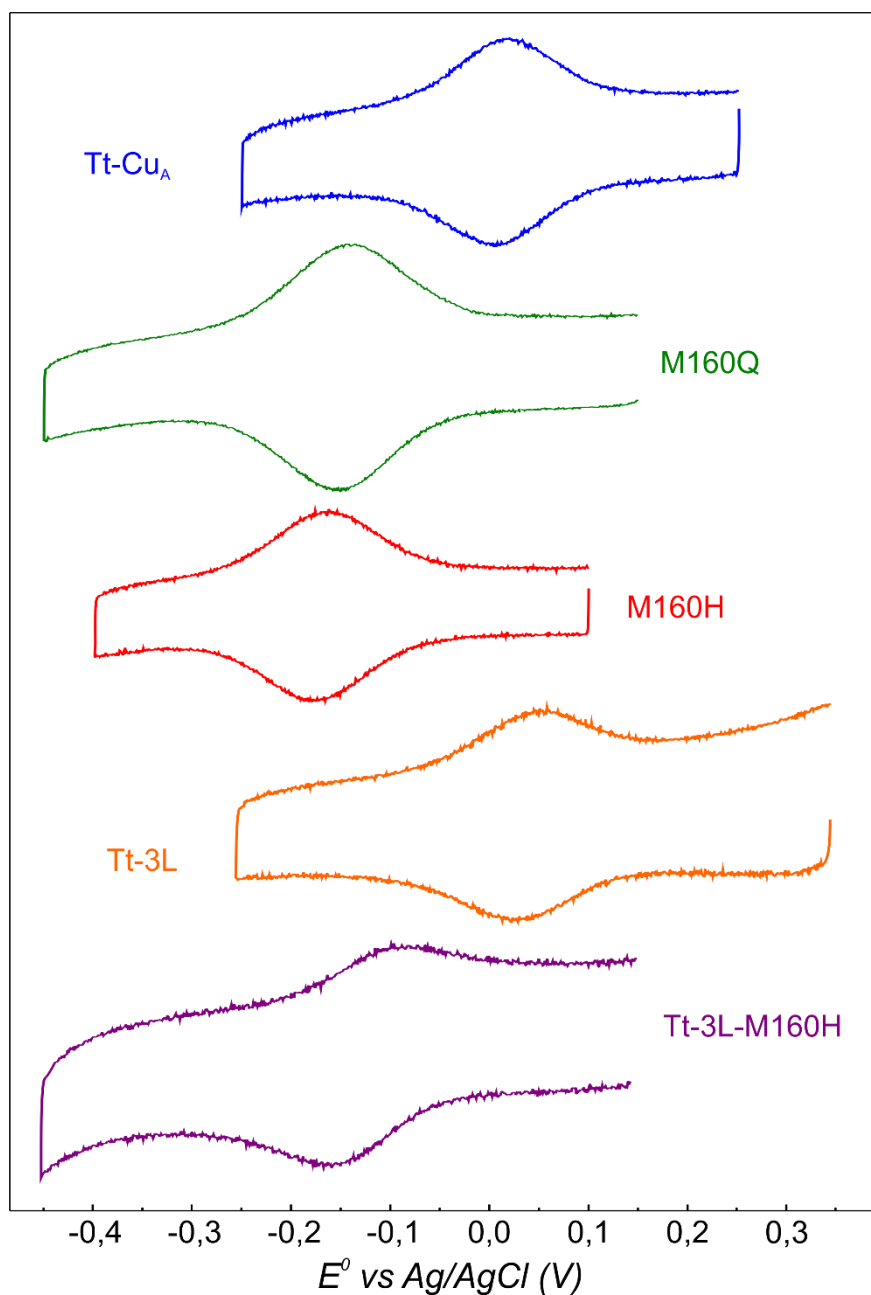


Figura 4-8. Voltagramas de Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo), M160Q (verde), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) en estado adsorbido a 100 mV/s y 273 K. El buffer de medida es fosfato pH 7 más 10 mM y 200 mM de KNO₃ como electrolito soporte. Los distintos parámetros analizados de ambas respuestas voltamétricas se detallan en la tabla 4-1.

En contraste con lo observado en el capítulo anterior para las proteínas en solución, los voltagramas no presentan el decaimiento difusional de la corriente faradaica posterior a los máximos de cada pico, lo cual responde a lo esperado para las señales voltamétricas de especies adsorbidas. El análisis de las intensidades de corriente y las áreas de los picos anódico y catódico (I_{pa} , I_{pc} , A_{pa} y A_{pc} respectivamente) señalan una

marcada simetría entre ambos picos, lo cual es indicativo de una respuesta electroquímica reversible (tabla 4-1). La variante Tt-3L-M160H muestra un desvío en este sentido, con cocientes I_{pa}/I_{pc} y A_{pa}/A_{pc} menos cercanos a 1 que las demás, lo cual puede estar siendo el reflejo de un coeficiente de transferencia de carga (α) ligeramente desviado del valor ideal 0,5⁷⁰. Sin embargo, es en la separación entre ambos picos de corriente (ΔE_p) donde se detecta la diferencia más conspicua: mientras Tt-Cu_A y las mutantes puntuales presentan valores de ΔE_p bajos (< 15 mV), y tendientes a cero para velocidades de barrido menores, Tt-3L presenta un valor de casi el doble y Tt-3L-M160H de más del cuádruple (tabla 4-1). La separación de picos en condiciones reversibles (valores bajos de v), es decir, descartando efectos de la cinética de la reacción de TE, puede darse por diversos motivos, como por ejemplo diferencias en la solvatación de la especie reducida respecto de la oxidada, o diferencias en la adsorción de moléculas en solución sobre la superficie de la proteína reducida respecto de la oxidada⁷¹. Independientemente del origen de las desviaciones, es evidente que la variante Tt-3L-M160H es un sistema que no responde completamente a los cánones de un comportamiento electroquímico ideal en estado adsorbido^{72,73}. Esto no implica que no pueda ser estudiada mediante estas técnicas, sino más bien que los resultados obtenidos merecen un cuidado especial en cuanto a las suposiciones realizadas, y una actitud más conservadora acerca de las conclusiones que se puedan extraer. En este sentido, cabe señalar que existen muchos ejemplos en literatura de proteínas redox con valores similares de ΔE_p , y en todos los casos se corroboró la efectividad de este tipo de técnicas para el estudio de la reacción de TE^{44,71,74–78}. Otra característica diagnóstica de una respuesta electroquímica reversible es el valor del FWHM, que idealmente adopta un valor de 90,6 mV, y para los voltagramas presentados se encuentra valores ligeramente superiores (tabla 4-1). Como se ha desarrollado en el capítulo 1, el valor de FWHM (al igual que ΔE_p e I_p) aumenta con v , tendiendo a sus valores ideales cuando tal parámetro tiende a cero, lo que ha sido corroborado para las cinco variantes.

Tabla 4-1. Valores de algunos parámetros relevantes, como I_{pa}/I_{pc} , A_{pa}/A_{pc} , ΔE_p , FWHM y E^0 obtenidos a partir de los voltagramas de las cinco variantes proteicas presentados en la figura 4-8. Los valores de E^0 para las especies en solución (E^0_{sc}) fueron tomados del capítulo anterior (sección 3.2.3).

Parámetro	Tt-Cu _A	M160H	M160Q	Tt-3L	Tt-3L-M160H
I_{pa}/I_{pc}	0,998	1,015	0,996	1.067	0,867
A_{pa}/A_{pc}	0,961	1,085	0,959	1.110	0,825
ΔE_p (mV)	14	11	14	26	61
FWHM (mV)	107-113	115-108	100-102	92-108	134-136
$E^0_{vs Ag/AgCl}$ (mV)	21	-155	-138	44	-126
E^0_{sc} (3.2.3) (mV)	69	-111	-139	50	-132

En cuanto al valor del E^0 para cada variante proteica, se estimó a partir del promedio entre E_{pc} y E_{pa} , y los resultados muestran una tendencia generalizada de valores de E^0 menores a los registrados para las especies en solución (tabla 4-1). No obstante, los corrimientos no presentan la misma magnitud para las distintas especies, y el caso de Tt-3L-M160H es nuevamente la excepción, ya que el valor del E^0 en estado adsorbido es ligeramente superior al observado en solución. La fisonomía de su voltagrama sugiere que la razón podría ser un desplazamiento del E_{pa} hacia valores mayores (responsable también del ΔE_p alto), reforzando la noción de que en esta mutante en particular el estado reducido experimenta mayores cambios respecto del oxidado. En cuanto a las demás variantes, el corrimiento observado no resulta novedoso, ya que resultados similares han sido reportados para otras proteínas redox pequeñas, como el Cyt *c* o proteínas azules de cobre^{30,79}. Inicialmente, este fenómeno fue interpretado como una consecuencia de la mayor afinidad de adsorción de la forma oxidada (respecto de la reducida), mientras que estudios posteriores propusieron que sería el efecto de la distribución (caída) interfacial del potencial el principal responsable^{30,53,80,81} (ver detalles en la sección 1.2.4).

Para estudiar el efecto de la caída interfacial de potencial en Tt-Cu_A adsorbida, la estrategia utilizada fue la manipulación del espesor del dieléctrico en los electrodos de trabajo. Para este y otros fines, a lo largo del capítulo se emplean electrodos recubiertos con SAMs de distinto espesor, seleccionando alcanotioles con valores de *n* de 3; 5; 7; 10 y 15 para la confección de las soluciones de incubación. Así, la distancia entre la muestra adsorbida y la superficie del electrodo de oro se controla de una manera tan precisa como simple, lo que constituye un excelente método para estudiar el efecto de esta distancia sobre distintas propiedades de la reacción de TE. Con el objeto de simplificar la notación para estos sistemas, se designará como C_n a una SAM mixta de la composición antes mencionada (3:2 HS-(CH₂)_{*n*}-OH:HS-(CH₂)_{*n*}-CH₃) para determinado valor *n* de metilenos. A partir del estudio del efecto de la distancia muestra-electrodo sobre el valor del E^0 en Tt-Cu_A mediante VC, se observó una modulación de 20 mV (en principio lineal) entre C_3 y C_{15} , lo que equivale a un rango de distancias de aproximadamente 16 Å³⁰ (figura 4-9).

La pendiente del ajuste lineal para la dependencia del valor de E^0 con el espesor del dieléctrico es aproximadamente 1,1 mV/Å, que resulta un valor compatible con una simple caída interfacial del potencial³⁰. Esto permite descartar, en principio, otros efectos que pudieran operar sobre las muestras adsorbidas tales como cambios estructurales. Así, la estrategia de manipulación de la distancia proteína-electrodo resulta válida para controlar, por ejemplo, el acoplamiento electrónico de la reacción de TE heterogénea, que será estudiado en la sección 4.2.4. La baja amplitud del efecto observado sugiere que la caída interfacial del potencial tiene una incidencia menor en el valor de E^0 , aunque no permite descartar efectos de mayor envergadura sobre otros

aspectos de la reacción de TE, como sus parámetros cinéticos. Algunos de estos aspectos serán retomados y discutidos a lo largo del capítulo.

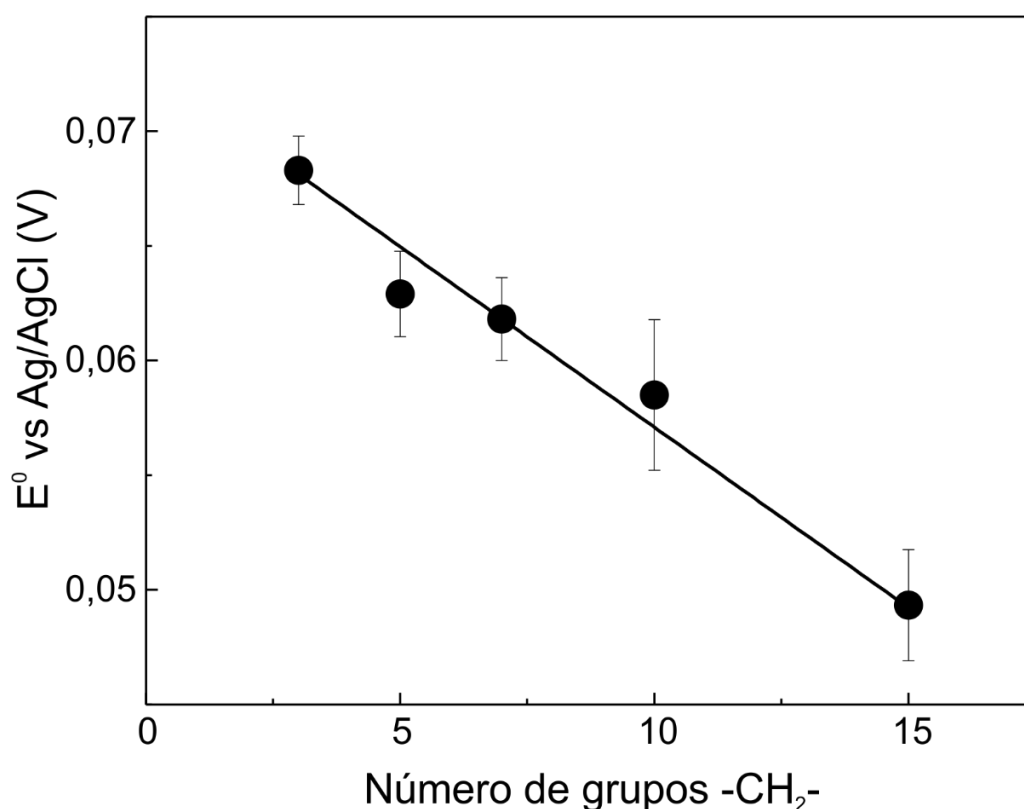


Figura 4-9. Valor de E^0 de Tt-Cu_A en función de la distancia muestra-electrodo medida en número de metilenos (-CH₂-) de los alcanotioles que conforman la SAM. Los valores de E^0 se obtuvieron a 273 K en un buffer de medida HAc/AcNH₄ 10 mM a pH 4,6 con 200 mM de KNO₃ como electrolito soporte. El ajuste lineal arroja una pendiente de $1,1 \text{ mV}/\text{\AA}$.

4.2.2- Efecto de la fuerza iónica sobre el valor de E^0

El espacio intermembrana mitocondrial, donde el sitio de Cu_A de la CcO desarrolla su actividad biológica, presenta un ambiente de composición compleja y dinámica (ver secciones 1.2.2 y 1.2.3). Si bien existen resultados previos que indican que la fuerza iónica (I) de este espacio se encuentra entre 100 y 150 mM, las concentraciones de los distintos iones, y por consiguiente el valor de I, pueden variar significativamente en las inmediaciones de las membranas (de manera local y transiente), dado que estas son superficies cargadas y heterogéneas⁸². A su vez, la actividad de las múltiples bombas y canales iónicos presentes en la membrana interna mitocondrial también contribuye significativamente a la variabilidad temporal y espacial de I. En relación a estas características (entre otras) resulta entonces de interés el estudio del efecto de esta

variable sobre la reacción de TE del sitio de Cu_A en condiciones (parcialmente) biomiméticas.

Se desarrollaron experimentos voltamétricos a partir de Tt-Cu_A y ambas mutantes puntuales adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs C_5 y C_{15} , empleando un electrolito soporte compuesto por un *buffer* $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$ 10 mM, pH 4,6; y una concentración variable de KNO_3 (electroquímicamente inerte), a fin de manipular el valor de I . A partir de los voltagramas adquiridos se estudió la dependencia del valor de E^0 con I para ambas SAMs, esto es, a dos distancias diferentes muestra-electrodo (figura 4-10). Los resultados obtenidos señalan una pronunciada modulación del valor del E^0 con I con una amplitud en torno a los 80 mV a lo largo del rango estudiado, aunque la mayor parte del efecto se produce en valores relativamente acotados de I : entre 10 y 110 mM. Cabe aclarar que, si bien en esta sección se analizarán los resultados obtenidos en términos del E^0 , las medidas realizadas permitieron realizar algunas determinaciones cinéticas, las cuales serán tratadas en la siguiente sección.

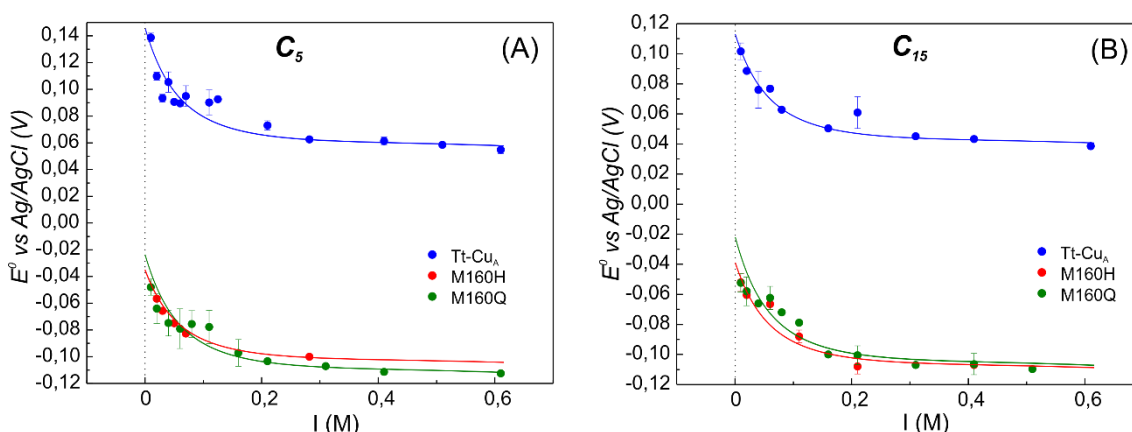


Figura 4-10. E^0 vs I para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo) y M160Q (verde) adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs (A) C_5 y (B) C_{15} . Las líneas no responden a ningún ajuste y sirven sólo como orientación de la tendencia observada.

Estos resultados señalan la importancia de la fuerza iónica como factor modulador del valor de E^0 , lo cual resulta particularmente interesante en términos de su relevancia fisiológica. Es muy probable que la interacción entre la subunidad de Cu_A de la CcO y su *partner* biológico (el $\text{Cyt } c$) modifique significativamente la atmosfera iónica del sitio de Cu_A , sobre todo teniendo en cuenta su proximidad a la región de interacción interproteica. Este cambio en la atmosfera iónica se reflejará en un cambio del valor de E^0 , que a su vez contribuiría a aumentar o disminuir la energía libre de la reacción de TE, regulando así su velocidad. Esto implica que la sensibilidad del E^0 con I puede constituir un factor determinante en la regulación de la respiración celular, no sólo a partir de

cambios en las concentraciones iónicas del espacio intermembrana, sino también por las interacciones específicas entre la CcO y el Cyt c que modifican la atmósfera iónica del sitio activo.

Por otra parte, las medidas realizadas permiten acceder a otras propiedades del sistema, como la carga total de la proteína (q), para lo cual resulta necesario un análisis más formal. En una primera aproximación, el valor del E^0 se verá modulado por el efecto que ejerce I sobre los coeficientes de actividad (γ). Además, el potencial que afecte al sitio redox será el resultado del efecto tanto de las cargas de la proteína como del apantallamiento culómbico del medio iónico. A fin de analizar cuantitativamente el proceso de TE desde un aspecto termodinámico, se puede escribir la variación de energía libre (ΔG_{rx}) como:

$$\Delta G_{rx} = \Delta G^0 + RT \ln \left(\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right) \quad (1)$$

donde a_{red} y a_{ox} son las actividades del sitio en los estados reducido y oxidado respectivamente. Expresándolo en términos de la ecuación de Nernst y separando cada actividad a en concentración c y coeficiente de actividad γ , el valor de E^0 puede expresarse como:

$$E^0 = E_{I=0}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{c_{red}}{c_{ox}} \right) + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{\gamma_{red}}{\gamma_{ox}} \right) \quad (2)$$

donde $E_{I=0}^0$ es el valor de E^0 cuando se cumple $I = 0$. Los valores de γ_{red} y γ_{ox} son una medida de las contribuciones eléctricas al potencial químico de las especies redox y pueden estimarse a partir del modelo de Debye-Hückel, que permite expresar al coeficiente de actividad como:

$$\ln(\gamma) = \frac{z^2 A \sqrt{I}}{1 + B r_e \sqrt{I}} \quad (3)$$

donde A y B son parámetros que dependen de la temperatura, y a 298K se estiman típicamente con valores de $0,509 \text{ (L/mol)}^{1/2} \text{ cm}^{-1}$ y de $0,329 \cdot 10^8 \text{ (L/mol)}^{1/2} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente. El parámetro r_e es geométrico y se define como el radio efectivo de la especie, considerándola como un ion de simetría radial, mientras que z es su carga. Una medida razonable de la carga del valor de z para el sitio redox de una proteína es su carga neta, que llamaremos q . Reemplazando los valores conocidos a 298K, el parámetro z por q y combinando (2) y (3), se puede expresar:

$$E^0 = E_{I=0}^0 - 0.03 \left(\frac{[q_{ox}^2 - q_{red}^2] \sqrt{I}}{1 + 0.329 r_e \sqrt{I}} \right) \quad (4)$$

Para estimar un valor del parámetro r_e se utilizaron datos extraídos de cálculos computacionales previamente realizadas en nuestro laboratorio. Estos cálculos

consisten básicamente en simulaciones de dinámica molecular a partir de la estructura cristalina de Tt-Cu_A (que fue previamente termalizada y minimizada), donde se evaluó, entre otras propiedades, el radio de giro de la proteína, que puede definirse intuitivamente como el radio de la esfera de menor tamaño capaz de contener a la proteína completa. El valor del radio de giro es de 14 Å, y se utilizó como una estimación de r_e para los ajustes realizados con la ecuación (4).

Utilizando los datos presentados en la figura 4-10 se analizó la dependencia del valor de E^0 con I en términos del modelo de Debye-Hückel extendido, para lo cual se incluyeron en el tratamiento únicamente los valores medidos dentro del rango de validez del modelo, esto es, hasta un valor de I de 110 mM (figura 4-11). Con esta metodología se determinó el valor de q_{red} para las tres variantes estudiadas a partir del ajuste con la ecuación (4) de los datos en cada condición (Tabla 4-2). Como resulta esperable para el caso de un efecto electrostático inespecífico, los valores no difieren entre las distintas variantes, no obstante, se observa que la carga de la proteína es mayor en C₅ que en C₁₅. Esto puede ser atribuible a diferencias en el pH local para distintos largos de monocapa, de manera que a un mismo valor del pH de la solución, para electrodos recubiertos con SAMs de distinto grosor, las especies adsorbidas estarán sometidas a valores de pH local diferente ³⁰. Este aspecto acerca de las proteínas adsorbidas sobre electrodos recubiertos con SAMs se profundizará y discutirá en la sección 4.2.6.

Los resultados indican que el valor de E^0 puede ser sensiblemente modulado por la interacción electrostática del sitio de Cu_A con las cargas superficiales de la proteína, pero el mayor efecto se observa a valores de fuerza iónica por debajo del rango fisiológico. Sin embargo, la variación de la carga total de Tt-Cu_A con el espesor de la SAM sugiere que la distribución interfacial de potencial podría estar afectando al E^0 tanto a través de la caída del potencial local como del corrimiento del pH interfacial respecto del seno de la solución. Por otra parte, como ya fue comentado en párrafos anteriores, la superficie de Tt-Cu_A participa en procesos de interacción interproteica específica con, al menos, la subunidad I de CcO y el Cyt *c*, siendo muy probable que estas interacciones modifiquen la distribución de cargas superficiales de las proteínas involucradas. Esto significa que el valor del E^0 del sitio de Cu_A podría cambiar significativamente, por ejemplo, con la formación de un complejo transiente con el Cyt *c*. Este efecto electrostático sobre el sitio de Cu_A a partir de una interacción específica donador-aceptor, acoplado a los efectos que pueden ejercer los cambios en la atmósfera iónica y el campo eléctrico interfacial, podría configurar un factor importante en los mecanismos regulatorios de la TE *in vivo*.

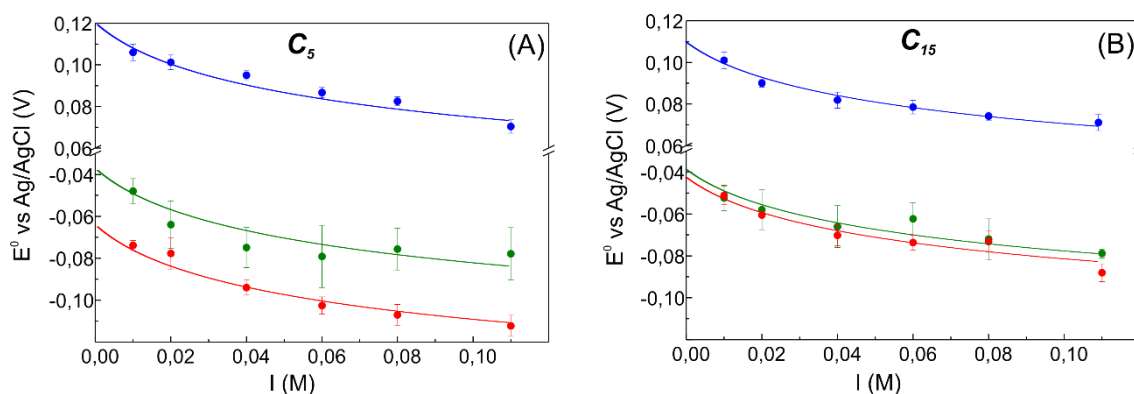


Figura 4-11. E^0 vs I para $Tt-Cu_A$ (azul), $M160H$ (rojo) y $M160Q$ (verde) de la figura 4-10 acotados a valores de I entre 10mM y 110 mM. Las curvas resultan del ajuste de la ecuación (4) para estimar la carga de las proteínas (q) adsorbidas sobre SAMs (A) C_5 y (B) C_{15} .

Tabla 4-2. Valores de q_{red} para $Tt-Cu_A$, $M160H$ y $M160Q$ adsorbidas sobre C_5 y C_{15} a pH 4,6. El error de los valores reportados es de 0,5 en todos los casos.

Proteína	$q_{red} (C_5)$	$q_{red} (C_{15})$
$Tt-Cu_A$	8,5	7
$M160H$	8,7	7,1
$M160Q$	8,5	7,2

4.2.3- Determinación de parámetros cinéticos de la reacción de TE

La VC es una técnica que permite el acceso a parámetros cinéticos de la reacción de TE heterogénea mediante el muestreo de la respuesta voltamétrica a distintas velocidades de barrido. Como paso previo a estudios cinéticos se verificó una relación lineal de las intensidades de corriente I_{pa} e I_{pc} de los voltogramas con v , característica distintiva tanto de especies en estado adsorbido como de la ausencia de una contribución significativa de la resistencia no compensada (R_u) de la celda electroquímica⁸³ (figura 4-12). Esta última cualidad resulta una condición crucial a la hora de determinar la constante temporal de la celda (τ_c), definida como el producto entre R_u y la capacitancia del electrodo de trabajo (C_e). El valor de ambos parámetros característicos de una celda electroquímica con un electrodo de trabajo de simetría radial esférica (lo cual resulta una buena aproximación al caso) está definida como:

$$C_e = 4\pi r^2 C_e^0 \quad (5)$$

$$R_u = (4\pi \kappa r_0)^{-1} \quad (6)$$

donde r_0 es el radio del electrodo de trabajo (cuasi) esférico, C_e^0 es la capacitancia del electrodo de trabajo por unidad de área y κ es la conductividad de la solución de la celda. Estrictamente, la ecuación (6) debería completarse con un factor que considera la disminución del valor de R_u por la proximidad del electrodo de referencia, definido como $x/(x + r_0)$, donde x es tal distancia entre ambos electrodos (el de trabajo y el de referencia). Este factor pierde peso rápidamente para electrodos de trabajo de dimensiones reducidas (como los aquí empleados) por lo que, en primera aproximación y para evitar sobreestimar los límites de detección, será considerado unitario, es decir, $x \gg r_0$. Cabe aclarar, a pesar de esta consideración, en todas las medidas cinéticas se minimizó lo máximo posible el valor de x , con el objeto de optimizar τ_c .

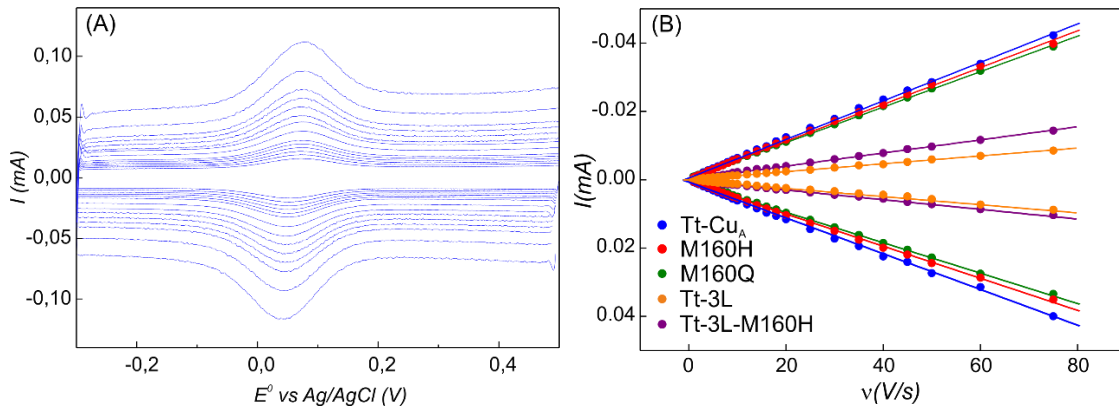


Figura 4-12. (A) Ejemplo de voltagramas de Tt-Cu_A adsorbidos sobre una SAM C₅ medidos a diferentes valores de v entre 0,1 y 50 V/s. (B) I_{pa} e I_{pc} en función de v para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta). En todos los casos se observa una clara dependencia lineal.

De la definición de τ_c y las ecuaciones (5) y (6) surge inmediatamente la expresión:

$$\tau_c = r_0 \kappa^{-1} C_e^0 \quad (7)$$

que considerando un valor de $C_e^0 = 3,7 \mu\text{F cm}^{-2}$ y un $\kappa = 0,02 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$, como ha sido reportado para un electrodo de oro recubierto con una SAM C₆ OH pura y una solución 200 mM de KNO₃ respectivamente, resulta en valores de τ_c entre 11,1 y 16,6 μs para los tamaños de electrodos empleados, de r_0 entre 0,06 y 0,09 cm⁸⁴⁻⁸⁶ (ver sección 2.2.1). Distintos autores señalan el límite cinético de detección de una celda electroquímica entre valores de $5\tau_c$ y $10\tau_c$, esto quiere decir que el límite cinético de detección más conservador (tomando un límite de $10\tau_c$, un r_0 de 0,09 cm y un $x \gg r_0$) contempla un proceso de constante de velocidad de 6000 s⁻¹, mientras que para un tamaño promedio de electrodo el límite está en 7250 s⁻¹.

Se determinaron experimentalmente los dos parámetros que definen la constante temporal de la celda, R_u (con una utilidad del *software* Gamry Instruments Framework Version 5.61) y C_e (a partir de la corriente capacitiva de un voltograma), obteniéndose valores promedio de 38Ω y $0,26 \mu\text{F}$, respectivamente. Estos valores corresponden a un τ_c de $10 \mu\text{s}$ lo cual permite, manteniendo el criterio conservador del límite de detección en $10\tau_c$, medir una constante de velocidad de hasta 10000 s^{-1} . Este valor supera el estimado teóricamente en el párrafo anterior, en particular, porque el valor de resistencia obtenido es menor al esperado teniendo en cuenta el κ considerado y para un valor promedio de r ($0,075 \text{ cm}$), en cuyo caso se obtendría $R_u \approx 50 \Omega$. La baja resistencia medida es consecuencia de la optimización de la geometría de la celda, en la cual se minimiza la distancia entre los electrodos de trabajo y de referencia, disminuyendo el valor del factor $x/(x + r_0)$. A lo largo de la tesis, se tuvo especial cuidado con este factor en los experimentos donde los procesos medidos fueran rápidos, de manera de mejorar aún más la constante de tiempo de la celda. Cabe señalar que este límite supera por más del 100% al máximo valor de constante de velocidad medido, y por más del 200% al valor medido en la mayoría de los procesos rápidos de este capítulo (como se verá en las siguientes secciones). Valores similares fueron determinados a partir de medidas de impedancia modeladas con un circuito RC, y también se determinó experimentalmente la conductividad de la solución de medida (10 mM de *buffer* fosfato y 200mM de KNO_3), que presenta un valor de $\kappa = 0,021$, consistente tanto con el valor de literatura y como con el valor de R_u medido para la celda.

A partir de las medidas presentadas en la figura 4-12 es posible acceder al valor de k_{TE} de las especies adsorbidas utilizando el método de Laviron sobre los datos expresados en el denominado “gráfico de trompeta” (figura 4-13). Este formalismo consiste en el empleo de una curva de trabajo que vincula el valor de k_{TE} con ΔE_p en función de v , y es válido para valores de ΔE_p de hasta 200 mV ⁸⁷. Es además necesario para un ajuste confiable que el sistema presente una respuesta electroquímica similar en ambos estados redox, lo que se traduce en un valor de coeficiente de transferencia de carga (α) cercano a $0,5$. Esta condición se deriva típicamente en una respuesta voltamétrica simétrica (como la observada para las distintas variantes en la figura 4-8) y se considera que el ajuste es apropiado en un rango de valores que comprende entre $0,3 < \alpha < 0,7$ ^{70,72,73}.

Por otra parte, si bien en el trabajo original se plantea un límite cinético de aproximadamente 1000 s^{-1} para el método, en líneas generales se corrobora que es la constante de la celda τ_c el único factor que determina el límite cinético de detección, e incluso algunos trabajos señalan que este método tiende a sobreestimar (en hasta un 20%) los valores de k_{TE} en condiciones donde el efecto del campo eléctrico interfacial sea considerable ^{71,87,88}. El método de Laviron fue desarrollado a partir del formalismo de Butler-Volmer, muy utilizado dado el contraste entre su alto poder predictivo y su

bajo nivel de complejidad. Es interesante señalar que el marco teórico de Marcus constituye un abordaje más refinado y complejo para una reacción de TE heterogénea, no obstante, ambas teorías predicen comportamientos muy similares en condiciones cuasi-reversibles, donde los valores de ΔE_p son bajos ⁸⁹.

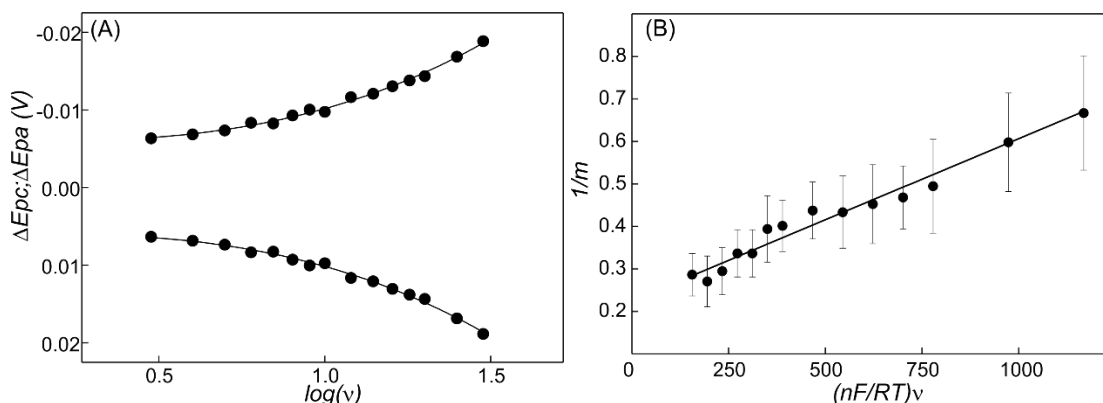


Figura 4-13. (A) E_p en función de $\log(v)$, conocido como gráfico de “trompeta”, para un experimento sobre Tt-Cu_A. (B) Ajustes de Laviron para los datos del panel (A). La inversa de la pendiente del ajuste lineal corresponde con la k_{TE} .

Preliminarmente se realizaron medidas de k_{TE} en función de I con el objeto de determinar las concentraciones de electrolito soporte por encima de las cuales el efecto de R_u sobre las medidas electroquímicas fuera despreciable (figura 4-14). Los resultados señalan que a concentraciones mayores a 120 mM de KNO₃ (sumado el buffer 10 mM) no se detectan cambios significativos en el valor de k_{TE} . A partir de estas determinaciones se estipuló una concentración de 10 mM del par ácido-base regulador más 200 mM de KNO₃ para las distintas soluciones de medida utilizadas en experimentos sobre especies adsorbidas. Es interesante comentar que, si bien son condiciones comparables a las encontradas en literatura, algunos autores han reportado incrementos en el valor de k_{TE} aún por encima de estas concentraciones en un sistema similar como el Cyt *c* adsorbido ⁴³. No obstante, tales aumentos resultan en aproximadamente un 10% del valor de k_{TE} para un incremento de un orden de magnitud en el valor de I . Aun cuando no se ha determinado unívocamente si el origen de este aumento radica en un valor residual de R_u o un efecto específico de la fuerza iónica sobre la cinética de la reacción de TE del Cyt *c*, su incidencia es minoritaria, por lo que se le ha restado importancia en términos prácticos.

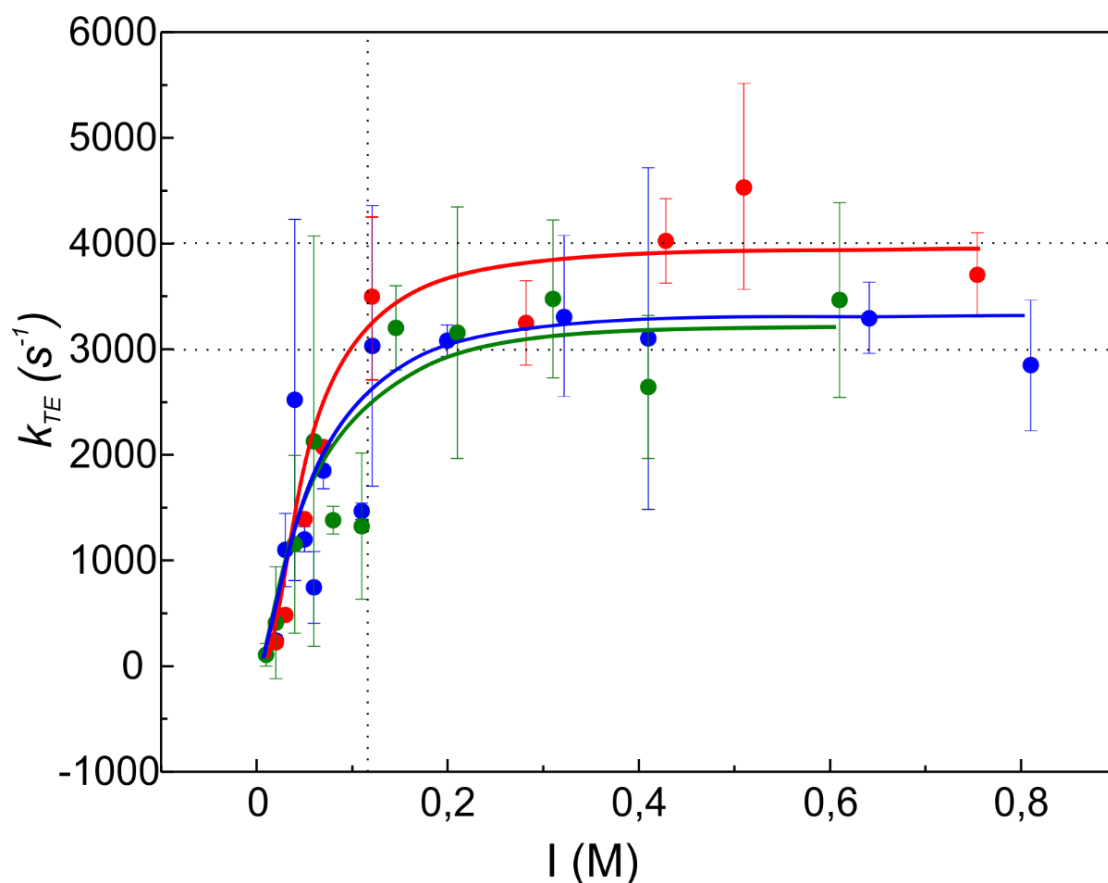


Figura 4-14. k_{TE} vs I para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde) y M160H (rojo) en estado adsorbido a pH 7. La línea punteada vertical marca el valor de I por encima del cual no hay cambios significativos en k_{TE} . Las líneas horizontales marcan el rango de valores de k_{TE} en el que no se registran variaciones significativas. Los ajustes corroboran la variación casi nula en los valores de k_{TE} a concentraciones salinas por encima de los 200mM.

El valor absoluto de k_{TE} que obtiene con esta estrategia experimental no es en sí mismo relevante para la caracterización de las distintas variantes, dado que no sólo depende de las propiedades de la proteína sino también de las del electrodo de trabajo. No obstante, la comparación entre los valores de k_{TE} de las distintas variantes de Tt-Cu_A, así como también el monitoreo de la dependencia de este parámetro con distintas variables (como la distancia muestra-electrodo o el pH) representan herramientas muy útiles para el abordaje cinético de la reacción de TE. Resulta de particular interés el estudio de la dependencia de dicho parámetro con la temperatura, ya que los datos obtenidos permiten acceder a la energía de activación del proceso (ΔE^*) a partir de un ajuste tipo Arrhenius. Cabe señalar que en el acotado rango de temperaturas experimentalmente accesibles (de 278 K a 313 K) la utilización de ajustes más refinados que el de Arrhenius (tales como el de Eyring o el de Marcus) no exhiben diferencias significativas. La energía libre de activación (ΔG^*) es aproximadamente igual a ΔE^* teniendo en cuenta que en fases condensadas la entalpía y la energía de activación

resultan prácticamente equivalentes ($\Delta E^* = \Delta H^*$) y que la entropía de activación (ΔS^*) es en primera aproximación despreciable para metaloproteínas redox, que típicamente vale $\Delta S^* = \Delta S^0/2$ ⁹⁰. Además, como fue desarrollado en la sección 1.3.1, dadas las condiciones experimentales y el modelo empleado se corrobora que $\Delta G^* = \lambda/4$, lo que implica que a partir del ajuste de Arrhenius es posible acceder al valor de λ de la reacción de TE para cada variante ⁹¹. No obstante, en la literatura existe una variedad de estrategias para la determinación de λ , con enormes discrepancias en los valores reportados para los diversos sistemas estudiados, lo que evidencia la dificultad de su determinación ^{92–97}. Esto hace importante que el análisis de los resultados sea cuidadoso, evitando la comparación entre valores determinados mediante distintas técnicas. Con estas consideraciones, se realizaron medidas voltamétricas por triplicado (o más réplicas) de las cinco variantes en función de la temperatura, en un rango que va de 5°C a 40°C (figura 4-15 A). Para cada una de las temperaturas ensayadas se adquirieron voltagramas a distintas velocidades de barrido para obtener valores de k_{TE} mediante el formalismo de Laviron y utilizarlos en el ajuste tipo Arrhenius para acceder al valor de λ de cada variante (figura 4-15 B y C).

Las distintas variantes, a excepción de Tt-3L-M160H, presentan valores de k_{TE} similares (medidas a idénticas condiciones experimentales), indicativo de que las distintas mutaciones de primera y segunda esfera de coordinación no perjudican significativamente la cinética global del proceso (tabla 4-3). En el caso de Tt-3L-M160H, el valor de k_{TE} muestra una caída de casi dos órdenes de magnitud respecto de las demás variantes, lo cual puede ser consecuencia de un elevado valor de λ y/o un bajo valor de $|H_{DA}|$ (según la teoría de Marcus). Sin embargo, ni M160H ni Tt-3L (cuyos valores de λ son similares) presentan tales caídas de k_{TE} , lo cual descarta este parámetro como responsable la cinética lenta y sugiere una fuerte disminución del acoplamiento electrónico. Cabe recordar que el segmento III de la secuencia aminoacídica (con numerosas mutaciones en esta variante) forma un “bolsillo” que expone el carbonilo amídico de la cisteína 153 en el complejo con el Cyt C₅₅₂, y se postula que la cinética rápida de la reacción de TE de Tt-Cu_A en estado adsorbido radica en la conservación de dicho bolsillo y la formación de un puente de hidrógeno entre el carbonilo amídico del ligando C153 y un OH de la SAM, maximizando el parámetro $|H_{DA}|$ ^{19,21–27} (figura 4-2). Esta hipótesis fue reforzada por resultados a partir de mutantes puntuales de residuos cuya voluminosidad restringía levemente la accesibilidad del carbonilo del ligando C153, disminuyendo drásticamente la velocidad de TE disminuye ^{15,17,28}. Es posible que la estabilidad estructural disminuida de Tt-3L-M160H contribuya a una distorsión menor en la región del segmento III, tendiendo a cerrar el bolsillo que expone dicho carbonilo e impidiendo así la formación del puente de hidrógeno que maximiza el acoplamiento electrónico.

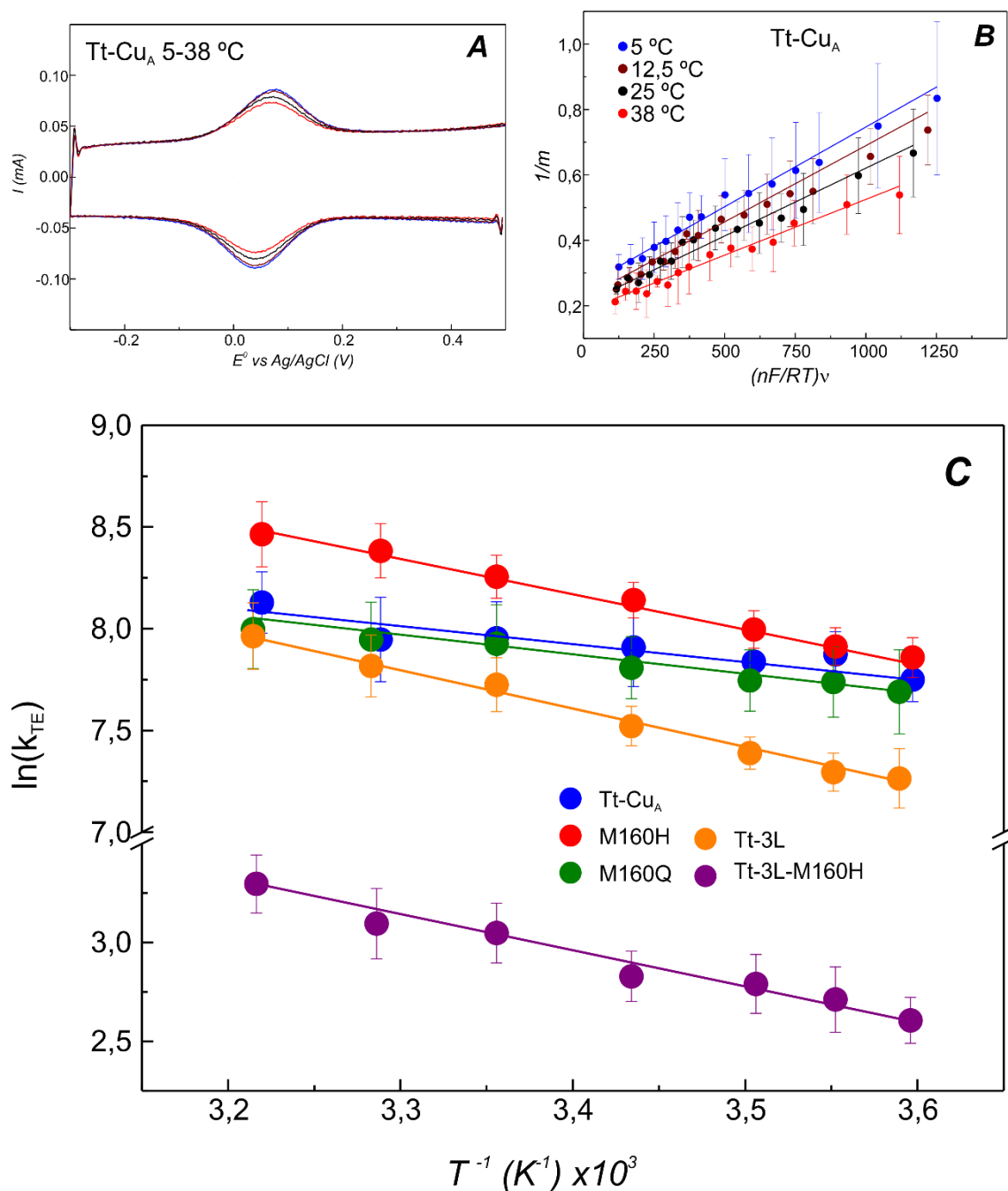


Figura 4-15. (A) Voltagramas de Tt-Cu_A (a modo de ejemplo) adsorbida sobre una SAM C₅ adquiridos a cuatro temperaturas distintas (5; 12,5; 25 y 38 °C). La solución de medida contiene 200 mM de KNO₃ y 10 mM de fosfato a pH 7. (B) Ajuste de Laviron para los datos voltamétricos de las medidas mostradas en (A) a distintos valores de v para 5; 12,5; 25 y 38 °C (azul, marrón, negro y rojo, respectivamente). (C) Gráfico de Arrhenius para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta). La pendiente de los ajustes lineales permite acceder al valor de λ , reportado en la tabla 4-3 junto al valor de k_{TE} a 25 °C de cada variante.

Tabla 4-3. Valores de k_{TE} (a 273 K) y λ para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L M160H (violeta) en estado adsorbido a pH 7 (en las condiciones especificadas en la figura 4-15). El error en los valores de los parámetros reportados es de aproximadamente un 15 %.

Parámetro	Tt-Cu _A	M160H	M160Q	Tt-3L	Tt-3L-M160H
k_{TE} (s ⁻¹)	3200	3800	3000	2700	32
λ (eV)	0,29	0,60	0,32	0,62	0,60

Por otra parte, los valores de λ obtenidos para las distintas variantes de Tt-Cu_A a pH 7 pueden separarse en dos grupos: Tt-Cu_A y M160Q presentan valores en torno a 0,3 eV mientras que M160H, Tt-3L y Tt-3L-M160H presentan valores cercanos a 0,6 eV (tabla 4-3). Apelando nuevamente a antecedentes bibliográficos, distintos cálculos basados en mecánica cuántica (algunos realizados en nuestro laboratorio) predicen un valor de λ entre 0,3 y 0,4 eV para el sitio nativo de Cu_A en el estado σ_u^* , mientras que en el estado π_u el valor estaría en torno a 0,6 y 0,7 eV^{60,62}. Teniendo en cuenta que Tt-Cu_A y M160Q presentan un poblamiento muy mayoritario del estado fundamental σ_u^* , los valores de λ medidos sugieren que es éste el estado redox activo (RAMO) que se detecta en los voltagramas. A priori se podría atribuir la ausencia de una segunda cupla detectable correspondiente al sitio activo en su estado alternativo π_u a su baja población, dificultando así la detección voltamétrica por la baja intensidad de corriente asociada. No obstante, los resultados de las demás variantes descartan esta hipótesis, dado que, como se discutió en el capítulo anterior, el estado fundamental alternativo π_u presenta una población considerable y comparable al del estado fundamental σ_u^* . Además, las tres variantes presentan una única cupla redox cuyos valores de λ son consistentes con el estado fundamental alternativo π_u actuando como único RAMO. La ausencia de segundas cuplas fue corroborada en ensayos voltamétricos realizados en amplias ventanas de potenciales (-0,6 V a 0,7 V) y valores de v (0,001 V/s a 75000 V/s), descartando la actividad redox de ambos estados fundamentales alternativos en la misma variante proteica. Estos resultados hacen necesario un análisis más profundo para entender el fenómeno que produce la ausencia total de una u otra cupla redox en las distintas variantes.

En primer lugar, ya se ha discutido que el sitio de Cu_A en su estado oxidado puede describirse mediante una superficie de energía potencial en función de una coordenada de reacción arbitraria (por ejemplo, la distancia entre los iones metálicos) con dos mínimos casi degenerados, los estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u (ver detalles en la sección 3.1.5). Además, medidas RMN indican que el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ es muy bajo en las variantes que presentan valores de $\lambda \approx 0,6$ y que la interconversión entre ambos estados es muy rápida^{59,62,98} (ver detalles en las secciones 3.2.1 y 3.2.2). Si la coordenada de la reacción de TE estuviera acoplada a la coordenada (o las coordenadas) de la transición σ_u^*/π_u , el sitio de Cu_A sólo transferirá el electrón a través de uno de los dos

estados fundamentales, y es la relación entre la energía libre de activación de la reacción de TE (ΔG_{TE}^*) y el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ la que determine cuál de ellos. El avance sobre la coordenada de reacción de un proceso y el otro serían equivalentes, y ocurrirá indefectiblemente primero el de menor energía de ambos (figura 4-16). Cuando $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ sea lo suficientemente grande como para superar la energía libre de activación de la reacción de TE (el valor de ΔG_{TE}^*), entonces el RAMO será el estado fundamental σ_u^* , como sucede con Tt-Cu_A y M160Q que son las variantes con valores más altos de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (figura 4-13 A). Por su parte, Tt-3L, M160H y Tt-3L-M160H presentan valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ mucho más bajos y menores al valor de ΔG_{TE}^* en cada caso, por lo tanto, el sitio de Cu_A en su estado fundamental σ_u^* indefectiblemente sufrirá la transición al estado π_u antes de que ocurra la reacción de TE, haciendo de este último el RAMO (figura 4-13 B).

Según este modelo, independientemente del estado fundamental de partida, es el valor de ΔG_{TE}^* del RAMO el que se mide experimentalmente en tanto que el acoplamiento entre ambos procesos (la reacción de TE y el intercambio de estado fundamental) sea fuerte. Si este acoplamiento no lo fuera, existiría una probabilidad de que el proceso de mayor energía también se produjera (en alguna proporción), y esta probabilidad aumentaría cuanto menor sea la diferencia entre ambas energías. Sin embargo, no se observan rastros de una segunda cupla redox en ninguna de las cinco variantes, lo que sugiere que ambos procesos están altamente acoplados, haciendo virtualmente inaccesible al de mayor energía. Así, la relación de magnitudes entre ambas variables, a saber, ΔG_{TE}^* y $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, determinaría el “camino” que toma la reacción de TE. Como fue comentado en la sección 4.1.3; estudios computacionales previamente realizados en nuestro laboratorio indican la existencia de múltiples distorsiones que pueden producir la transición σ_u^*/π_u , aumentando la probabilidad de que este tipo de acoplamiento ocurra ⁶². Este antecedente, sumado a las evidencias acerca de distintos factores fisiológicamente relevantes que modulan el valor del E^0 (algunos ya presentados y otros que serán discutidos en las siguientes secciones), sugieren que este modelo podría configurar parte de un mecanismo regulatorio de la TE *in vivo*.

Por otra parte, estos resultados indican que ambos estados fundamentales pueden ser redox activos, y que las distintas variantes utilizadas en esta tesis permiten estudiar a cada uno de manera independiente, lo cual representa una conclusión de enorme valor experimental que será explotada en las siguientes secciones. Además, tanto M160H como Tt-3L presentan velocidades de TE similares a Tt-Cu_A y M160Q a pesar de tener un valor de λ superior (tabla 4-3). La similitud en la cinética de la reacción de TE sugiere que el acoplamiento electrónico del estado alternativo π_u estaría siendo mayor que el del estado fundamental σ_u^* , sobrecompensando el mayor valor de λ . Este aspecto será tratado en profundidad en las secciones 4.2.5 y 4.2.6.

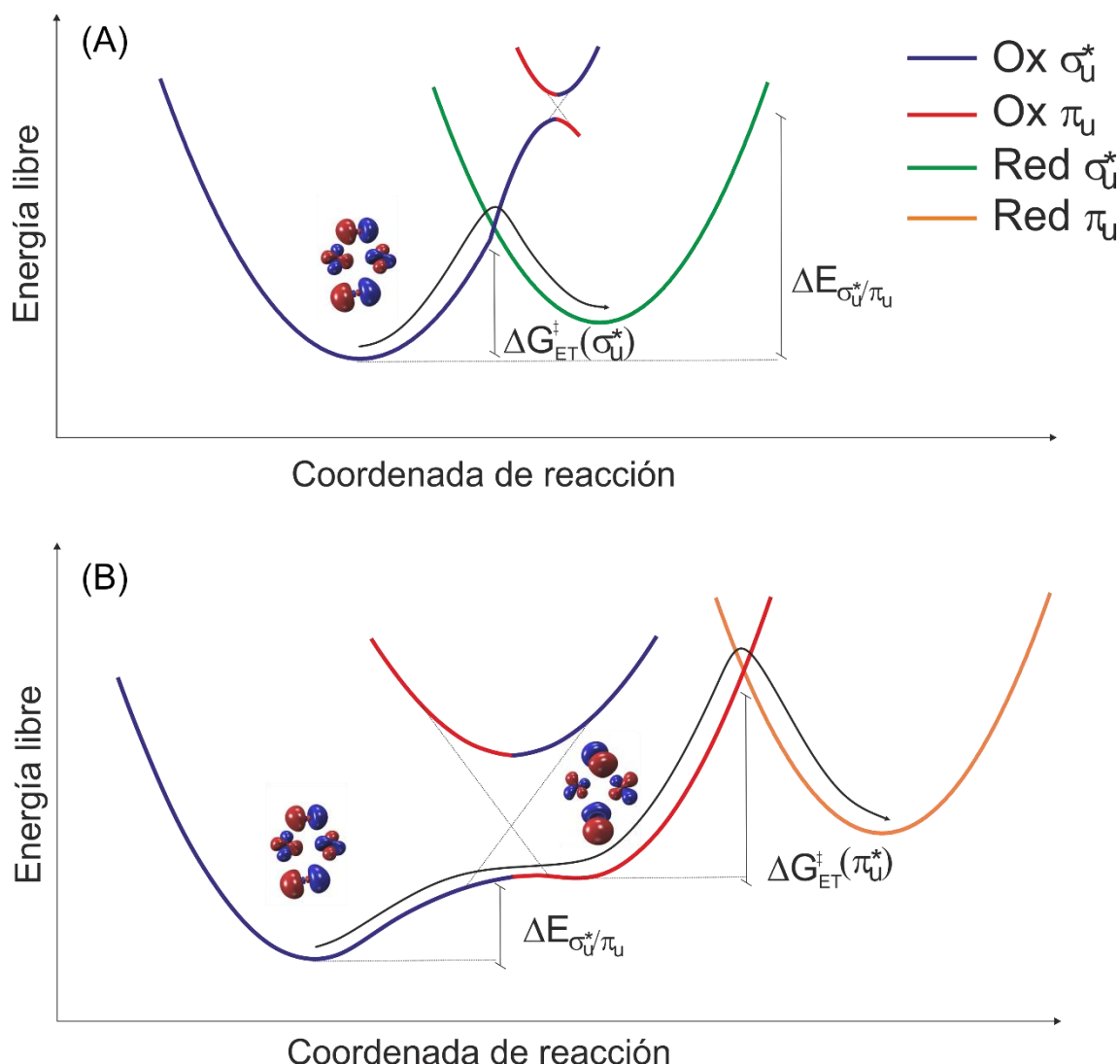


Figura 4-16. Modelo idealizado de la SEP para sitios de Cu_A con valores (A) altos de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, como Tt- Cu_A y M160Q, y con valores (B) bajos de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, como M160H, Tt-3L y Tt-3L-M160H. Las curvas de los estados oxidados σ_u^* y π_u se muestran en azul y rojo respectivamente. Las curvas de los estados reducidos σ_u^* y π_u se muestran en verde y naranja respectivamente. Cuando $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ es mayor al valor de ΔG_{TE}^* la reacción de TE produce desde el estado σ_u^* , mientras que cuando es menor, se produce desde el estado π_u . El acoplamiento entre las coordenadas de la transición σ_u^*/π_u y de la reacción de TE en el estado σ_u^* anula su actividad redox.

4.2.4- Dependencia de la velocidad de TE con la distancia muestra-electrodo

En la sección 1.3.1 se desarrollaron los fundamentos de la teoría de Marcus y su extensión para reacciones de TE heterogénea (Marcus –DoS), según la cual el valor de k_{TE} es proporcional al cuadrado del elemento de matriz del acoplamiento electrónico entre el donador y el aceptor de la reacción de TE ($|H_{DA}|$):

$$k_{TE} = \frac{|H_{DA}^0|^2 \exp[2\beta(R_e - R_0)]}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} |H_{DA}|^2 \int_{-\infty}^{\infty} f(\epsilon)\rho(\epsilon)\kappa_n(\epsilon; \xi) d\epsilon \quad (8)$$

donde R_e es la distancia del sitio redox al electrodo, R_0 es la distancia mínima y $|H_{DA}^0|$ es el acoplamiento electrónico a R_0 , ξ es el sobrepotencial aplicado al electrodo, ϵ es la variable de integración y se corresponde con los niveles de energía del metal, k_B es la constante de Boltzman, $f(\epsilon)$ es la distribución de Fermi-Dirac para el electrodo metálico, $\rho(\epsilon)$ es su densidad de estados y $\kappa_n(\epsilon; \xi)$ es el factor de reorganización nuclear (o factor de Franck-Condon).

Se determinó el valor de la k_{TE} para Tt-Cu_A y las mutantes puntuales en función de la distancia muestra-electrodo mediante la manipulación del espesor de las SAMs utilizadas (figura 4-17). Los resultados obtenidos verifican la dependencia esperada según la ecuación (8) a distancias largas con un valor de $\beta = 1,1 \text{ \AA}^{-1}$, similar al reportado para diversos sistemas de características similares en la región no adiabática 19,31,32,35,43,44,99–101.

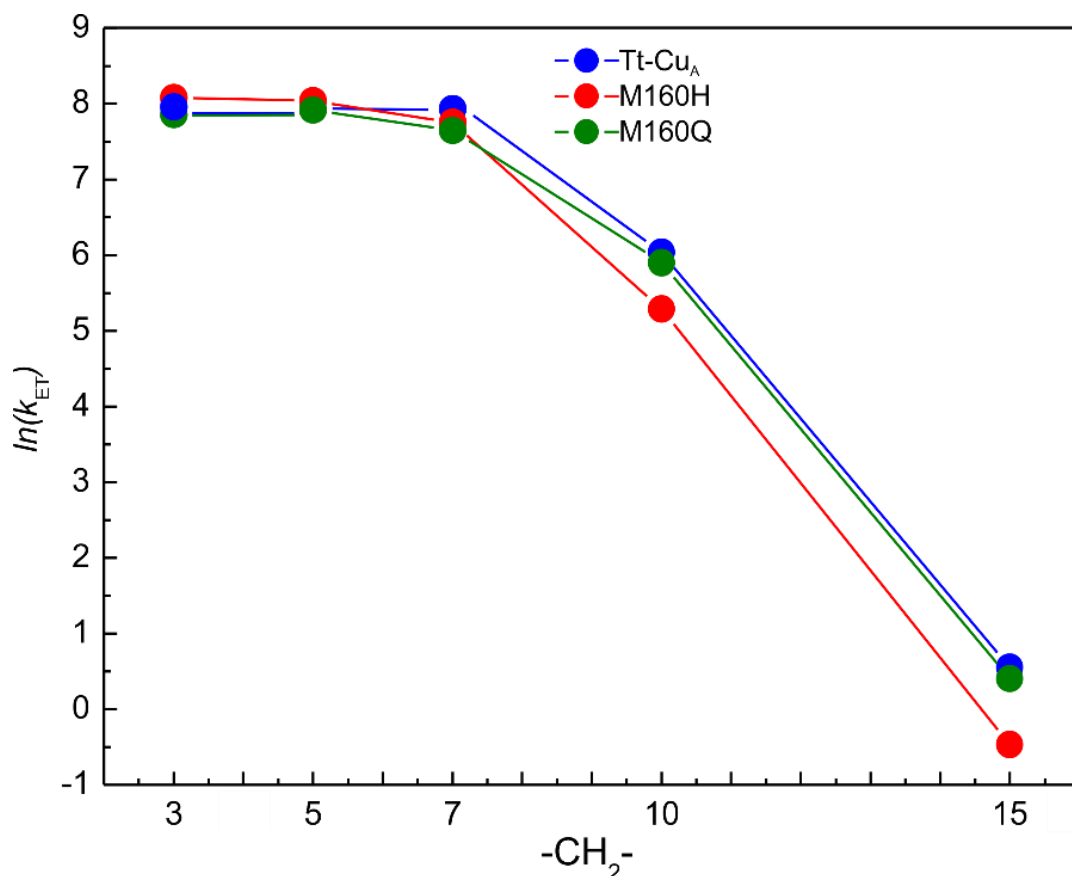


Figura 4-17. Dependencia (logarítmica) de k_{TE} con la distancia (medida en número de metilenos de la SAM) para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo) y M160Q (verde). El valor reportado de $\beta = 1,1 \text{ \AA}^{-1}$ se midió a partir de la pendiente entre los puntos medidos sobre SAMs C₁₅ y SAMs C₁₀.

Por otra parte, al igual que numerosos ejemplos mencionados en la sección introductoria, la k_{TE} tiende a un *plateau* a distancias cortas cuyo origen puede deberse a distintos fenómenos³⁰⁻³⁵ (figuras 4-3 y 4-17). En el marco teórico de Marcus se plantea que, como regla general, cuando el acoplamiento electrónico es lo suficientemente grande (distancias cortas), el mecanismo de reacción cambia, pasando del límite no adiabático al límite adiabático, también conocido como régimen de control friccional⁹¹ (figura 4-4 A). En esta situación, la k_{TE} se hace proporcional a la frecuencia nuclear efectiva (ν_n) que lleva a los reactivos a la intersección de las curvas de energía libre (ver detalle en sección 1.3.1):

$$k_{TE} = \nu_n \kappa_n(\epsilon; \xi) \quad (9)$$

El factor ν_n es la frecuencia efectiva nuclear y está vinculado con los tiempos de relajación de la polarización del solvente, que a su vez está relacionado con los modos difusionales del mismo y dependen de la viscosidad (η)^{34,39,43,44,101}. Por lo tanto, la k_{TE} en el régimen de control friccional está estrechamente vinculada con la viscosidad del medio, ya que ambos dependen de dichos tiempos de relajación. Trabajos pioneros de Goguet y colaboradores demostraron una proporcionalidad empírica entre la viscosidad del medio y el factor ν_n , que más tarde fue corroborada y estudiada en mayor profundidad por Khoshtariya y colaboradores^{34,43,44,101,102}. Esta proporcionalidad responde a la expresión:

$$\nu_n \propto \eta^{-\delta} \quad (10)$$

donde δ es un parámetro empírico de acoplamiento solvente-proteína que puede adoptar valores entre 0 y 1. El valor nulo de δ indica que la relajación de la polarización del solvente y ν_n están íntegramente desacoplados, es decir, no hay una vinculación directa entre la dinámica del solvente y la del sitio redox. Por su parte, cuando $\delta \approx 1$ ambas dinámicas están acopladas y la reacción de TE en el régimen adiabático dependerá de la viscosidad del medio.

Con el objetivo de evaluar esta correlación sobre Tt-Cu_A en la región del *plateau* se determinaron los valores de k_{TE} a partir de medidas voltamétricas realizadas con soluciones de trabajo a distintos valores de η , que se ajustaron mediante el agregado de sacarosa en la solución de medida. Como se muestra en la figura 4-18, las medidas cinéticas en función de la viscosidad se llevaron a cabo tanto en la zona de respuesta exponencial de la figura 4-17 (C₁₅) como en la región del *plateau* (figura 4-18 A y B, respectivamente). Cabe señalar que, en el rango de concentraciones de sacarosa utilizados (entre 0 y 30 % m/m), la viscosidad es la única propiedad que sufre cambios significativos, mayores al 300%, mientras que otros parámetros como la conductividad o la constante dieléctrica varían por debajo de un 10%¹⁰³. En muestras adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs C₁₅, situación experimental gobernada por el régimen no adiabático de TE, el valor de la k_{TE} resulta insensible a cambios en η . Por su

parte, en las muestras adsorbidas sobre SAMs C_5 se observa un evidente efecto ralentizador de la reacción de TE al aumentar η . A partir del ajuste de los datos a la ecuación (10) se determinó un valor de $\delta=0,5$, similar al reportado para otros sistemas similares en condiciones de control friccional de la reacción de TE heterogénea 43,102,104,105.

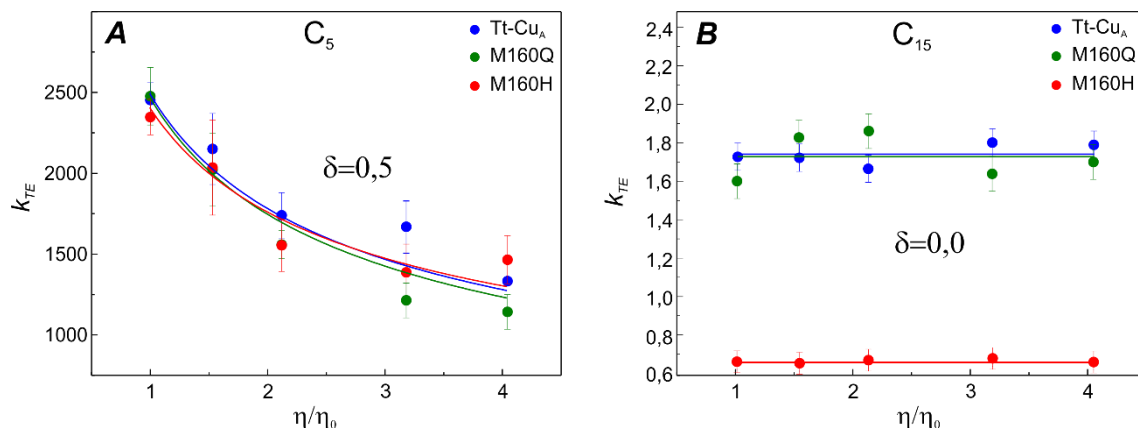


Figura 4-18. k_{TE} en función de η (normalizada) para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo) y M160Q (verde) adsorbidas sobre (A) SAM C_5 y (B) SAM C_{15} . Los ajustes a la ecuación (11) presentan el mismo valor de δ para las tres variantes, obteniéndose un $\delta=0,5$ en C_5 y un $\delta=0,0$ (no hay dependencia) en C_{15} .

Este resultado es consistente con el cambio de mecanismo planteado para la reacción de TE en la región del *plateau*. No obstante, el mismo tipo de dependencia de la velocidad de TE con η ha sido propuesto para un mecanismo gobernado por un fenómeno de reorientación o cambio conformacional que no esté intrínsecamente vinculado con la reacción de TE, pero que actúe como paso limitante (figura 4-4 B). En este mecanismo, el cambio conformacional es condición necesaria para que ocurra la reacción, y si la velocidad de intercambio entre la conformación activa y la conformación inactiva es menor a la velocidad de TE, será entonces el proceso limitante ^{31,35,45,46}. Los resultados hasta aquí presentados son, en principio, compatible con los dos modelos planteados.

Si bien ambos mecanismos comparten la dependencia inversa con η , son procesos distintos y por lo tanto deben tener diferente valor de ΔG_{TE}^* aparente, ya que en uno de los casos será la energía de activación del proceso previo a la reacción de TE. El factor $\kappa_n(\epsilon; \xi)$ en la ecuación (9) es en principio igual tanto en el régimen no adiabático como en el régimen adiabático de TE, y puede expresarse como (ver sección 1.3.1):

$$\kappa_n(\epsilon; \xi) = \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left[\frac{(\lambda - e\xi + \epsilon)}{4\lambda k_B T} \right] d\epsilon \quad (11)$$

Dado que los valores de k_{TE} obtenidos utilizando la curva de trabajo de Laviron son por definición valores a $\xi = 0$, se cumple que $\Delta G^* = \lambda/4$, lo cual permite acceder al valor de λ considerando las mismas aproximaciones que las desarrolladas en la sección anterior. Teniendo en cuenta que en principio κ_n es independiente del mecanismo de reacción, el valor de ΔG_{TE}^* aparente de la TE en el régimen no adiabático será el mismo que el que se mida en la región del *plateau* si el mecanismo es de control friccional, mientras que se observará un valor diferente de ΔG_{TE}^* aparente si existiera un paso limitante de tipo conformacional. Por ejemplo, para Cyt c fuertemente adsorbido sobre SAMs de cadena corta, donde el paso limitante no es la TE sino la reorientación, el valor aparente de λ resulta muy inferior al medido en condiciones óptimas ⁵¹.

Se midieron los valores de ΔG_{TE}^* aparente a partir de las constantes de Tt-Cu_A adsorbida sobre SAMs C₁₅ y C₅, en este último caso a dos valores distintos de viscosidad, aplicando el ajuste de Arrhenius de la misma forma que la desarrollada en la sección anterior (figura 4-19). Los resultados de los tres experimentos revelan una total independencia del valor de ΔG_{TE}^* aparente (y por consiguiente de λ) respecto de la distancia muestra-electrodo, así como también del valor de η (tabla 4-4). El carácter invariante de los parámetros de activación de la reacción de TE es consistente con un régimen de control friccional a cortas distancias muestra-electrodo ⁴³. Más aún, a la luz de la evidencia acumulada a lo largo de los últimos años, este pareciera ser el mecanismo generalizado para la TE en proteínas redox bajo condiciones de elevado acoplamiento electrónico ⁴⁴.

Tabla 4-4. Valores de ΔG_{TE}^* aparente y de λ obtenidos a partir del ajuste de Arrhenius sobre las medidas cinéticas de Tt-Cu_A adsorbida sobre C₁₅ y C₅ (en este último caso a dos valores distintos de η).

C _x (-CH ₂ -)	η/η_0	ΔG^* (kJ/mol)	λ (eV)
15	1	7 ± 1	$0,3 \pm 0,1$
5	1	7 ± 1	$0,3 \pm 0,1$
5	2	7 ± 1	$0,3 \pm 0,1$

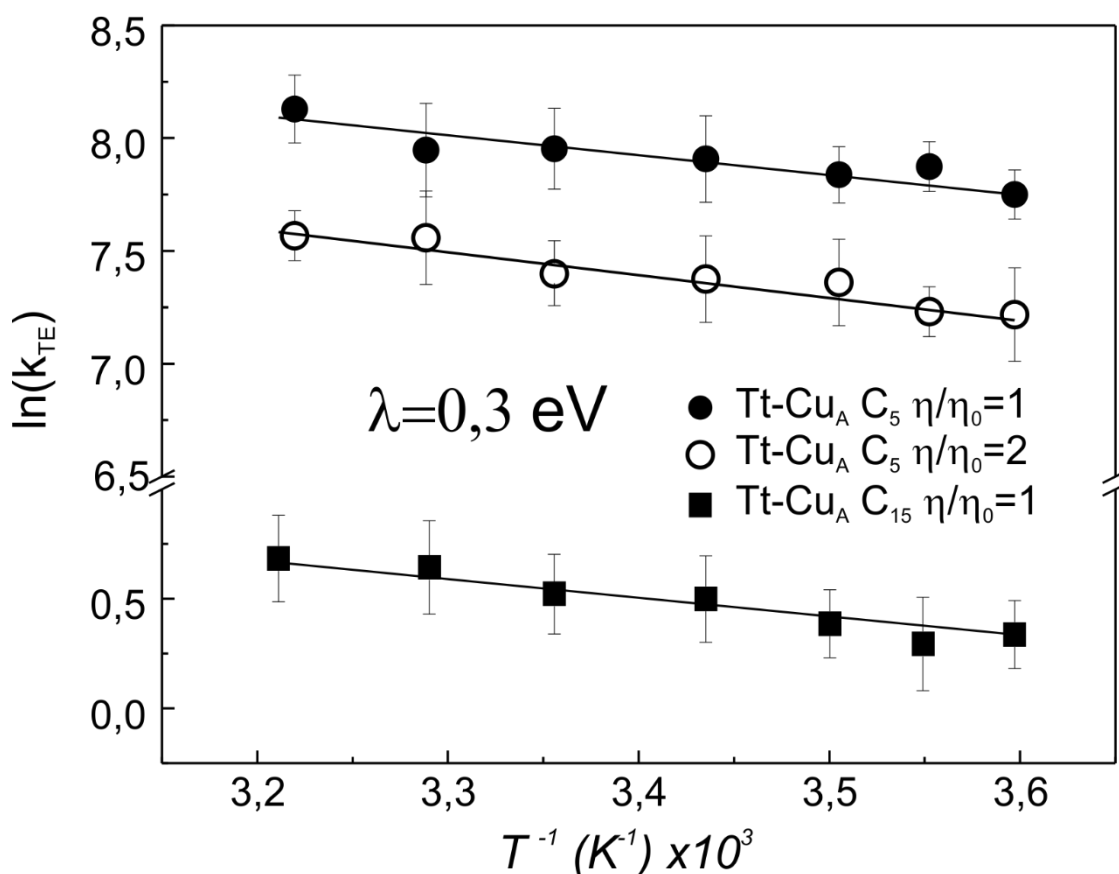


Figura 4-19. Gráfico de Arrhenius para Tt-Cu_A adsorbida sobre C₅ (círculos) en un medio de viscosidad $\eta/\eta_0=1$ (círculos llenos) y $\eta/\eta_0=2$ (círculos vacíos), y adsorbida sobre C₁₅ en un medio de viscosidad $\eta/\eta_0=1$ (cuadrados). La pendiente de los ajustes lineales permite acceder al valor de λ (a partir del valor de ΔG^*), igual para los tres casos y reportado en la tabla 4-4.

4.2.5- Efecto del pH sobre el sobre el sitio de Cu_A en un entorno biocompatible

Estudiar el efecto del pH sobre las propiedades de una proteína redox resulta un aspecto atractivo para explorar los mecanismos de TE. Existen numerosos antecedentes en la literatura de casos donde el pH tiene algún efecto significativo sobre parámetros funcionales relevantes de este tipo de sistemas ^{10,55,106–110}. Además, la cadena de transporte de electrones de la respiración celular se caracteriza por múltiples procesos de transferencia electrónica y protónica acoplados (ver detalles en la sección 1.2.2). Así, el entorno fisiológico de la subunidad de Cu_A de las CcOs representa un ambiente de fuertes variaciones en la concentración protónica. A lo largo del capítulo 3 se expusieron resultados experimentales y antecedentes bibliográficos que descartan un efecto significativo del pH sobre las propiedades estructurales y funcionales de Tt-Cu_A en un rango fisiológicamente relevante. Estos resultados se mostraban en clara contraposición a las determinaciones previamente realizadas sobre el sistema quimérico Cu_A-Azu, donde se observa una transición de estados dependiente del pH ^{54,55}. Sin embargo, tanto

los experimentos espectroscópicos como electroquímicos fueron realizados en solución y el comportamiento de la proteína adsorbida a un entorno biocompatible puede no ser el mismo.

Al igual que en casos anteriores, se realizaron experimentos de VC con Tt-Cu_A y las distintas mutantes adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con SAMs C₅, pero en este caso a distintos valores de pH de la solución de medida. En los primeros ensayos se exploró una amplia ventana de valores de pH, entre 2,5 y 10; para estudiar el comportamiento del valor de E^0 y poder detectar o descartar transiciones dependientes del pH (figura 4-20 A). Los resultados muestran una variación continua y monótona, con una amplitud máxima de aproximadamente 100 mV en todo el rango. Este tipo de dependencia, comparable a la observada para Tt-Cu_A en solución, ha sido atribuida a un efecto electrostático de la superficie proteica, poblada de residuos protonables cuyos equilibrios ácido-base modifican de manera continua (a lo largo del rango de pH) la atmósfera iónica del sitio activo ⁵⁸. Las diferencias entre Tt-Cu_A en estado adsorbido y en solución en cuanto a la dependencia del valor de E^0 con el pH están probablemente asociadas al cambio de superficie expuesta al solvente y a diferencias en los valores locales de constante dieléctrica y de pH tras la adsorción ^{30,111} (como se discutirá en la siguiente sección). Es importante señalar también que, aunque la magnitud de la variación total es considerable, la ausencia de quiebres o cambios abruptos permite descartar transiciones como la observada en Cu_A-Azu ⁵⁵. Por otra parte, acotando el rango del pH analizado a valores fisiológicamente relevantes, en torno a pH 7, tanto el E^0 de Tt-Cu_A como de las distintas variantes presentan variaciones de pocos mV (figura 4-20 B). Estos resultados sugieren que el pH no cumpliría un rol determinante en la modulación del valor del E^0 .

Se estudió también la dependencia del valor de la k_{TE} de las distintas variantes de Tt-Cu_A en función del pH, mediante el mismo método descrito en las secciones anteriores, obteniéndose resultados cuya interpretación resulta menos inmediata (figura 4-21). En primer lugar, Tt-3L presenta un valor de k_{TE} insensible al pH dentro del rango estudiado, mientras que Tt-Cu_A y ambas mutantes puntuales exhiben una dependencia reversible de tipo sigmoidea con un valor de pKa en torno a 5, sugiriendo una transición pH-dependiente de este parámetro. En segundo lugar, resulta destacable la diferencia de amplitudes para dicha transición, ya que mientras el valor de k_{TE} de Tt-Cu_A y M160Q apenas varía en aproximadamente un 25%, en M160H el aumento supera el 100% (tabla 4-5). Con el objeto de ilustrar la magnitud del cambio, se presentan en la figura 4-21 datos “crudos”, como ejemplos de voltagramas y gráficos de Laviron, para las variantes con efectos más disímiles, a saber, Tt-3L y M160H. Cabe mencionar que, ante dificultades experimentales que presenta Tt-3L-M160H a valores de pH no neutros, esto es, degradación de muestra y pérdida de respuesta electroquímica (como fue comentado en la sección 3.2.2), ha resultado imposible obtener datos cinéticos de buena calidad a partir de medidas en función del pH.

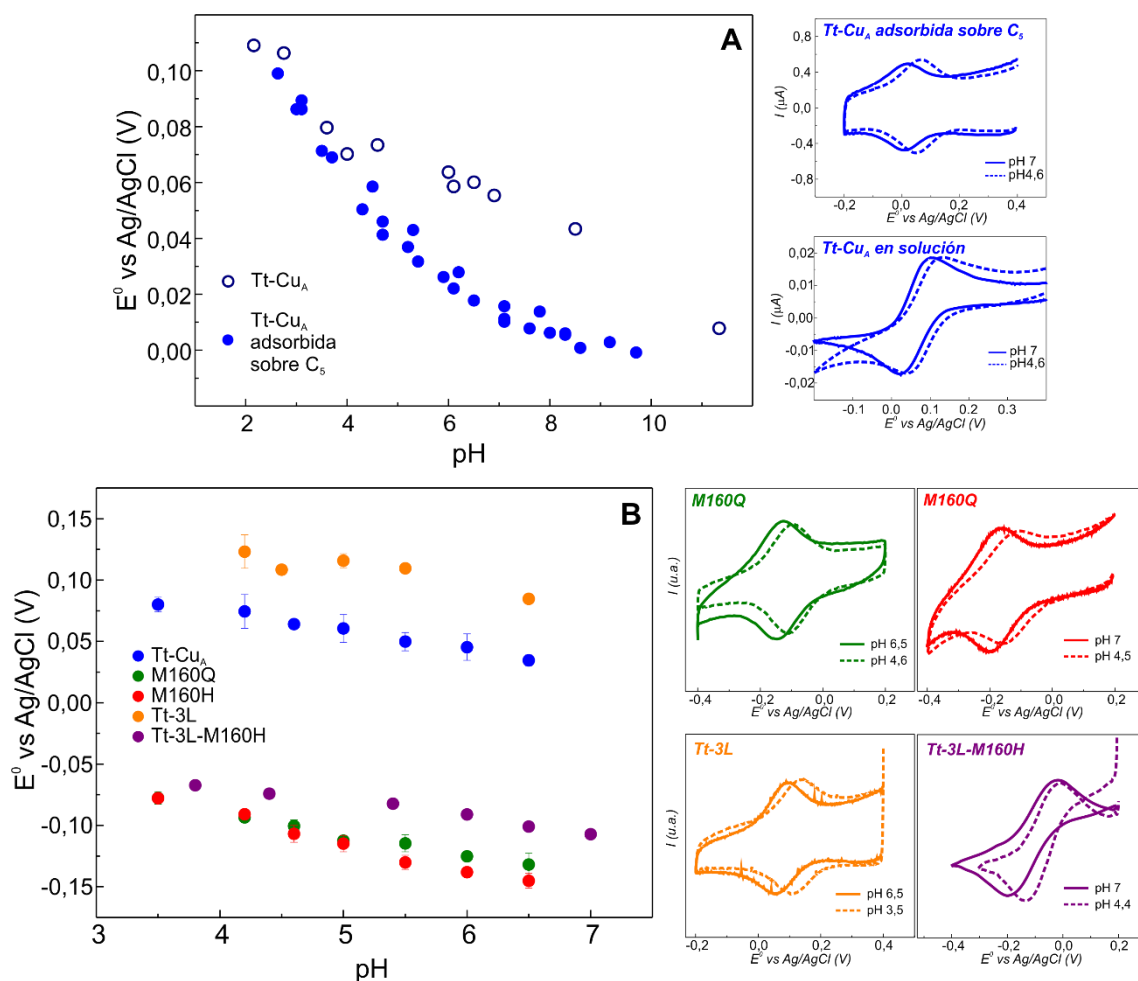


Figura 4-20. (A) E^0 en función del pH para Tt-Cu_A en estado adsorbido (círculos llenos) y en solución (círculos vacíos). (B) E^0 en función del pH para Tt-Cu_A (azul), M160Q (verde), M160H (rojo), Tt-3L (naranja) y Tt-3L-M160H (violeta) en estado adsorbido. A la derecha de (A) y (B) se presentan voltagramas de cada variante a pH neutro (línea llena) y ácido (línea punteada, a modo de ejemplo).

Tabla 4-5. Valores de k_{TE} mínimo y máximo a lo largo del rango de pH medido, aumento porcentual de su valor entre pH ácido y pH neutro y pKa de la transición medida para Tt-Cu_A, Tt-3L, M160Q y M160H en estado adsorbido.

Proteína	k_{TE} min (s^{-1})	k_{TE} max (s^{-1})	Aumento (%)	pKa
Tt-Cu _A	2500 ± 200	3200 ± 300	28	5,0
Tt-3L	2800 ± 500	2700 ± 300	-	-
M160Q	2400 ± 200	3000 ± 300	25	4,8
M160H	1800 ± 300	3800 ± 500	111	5,1

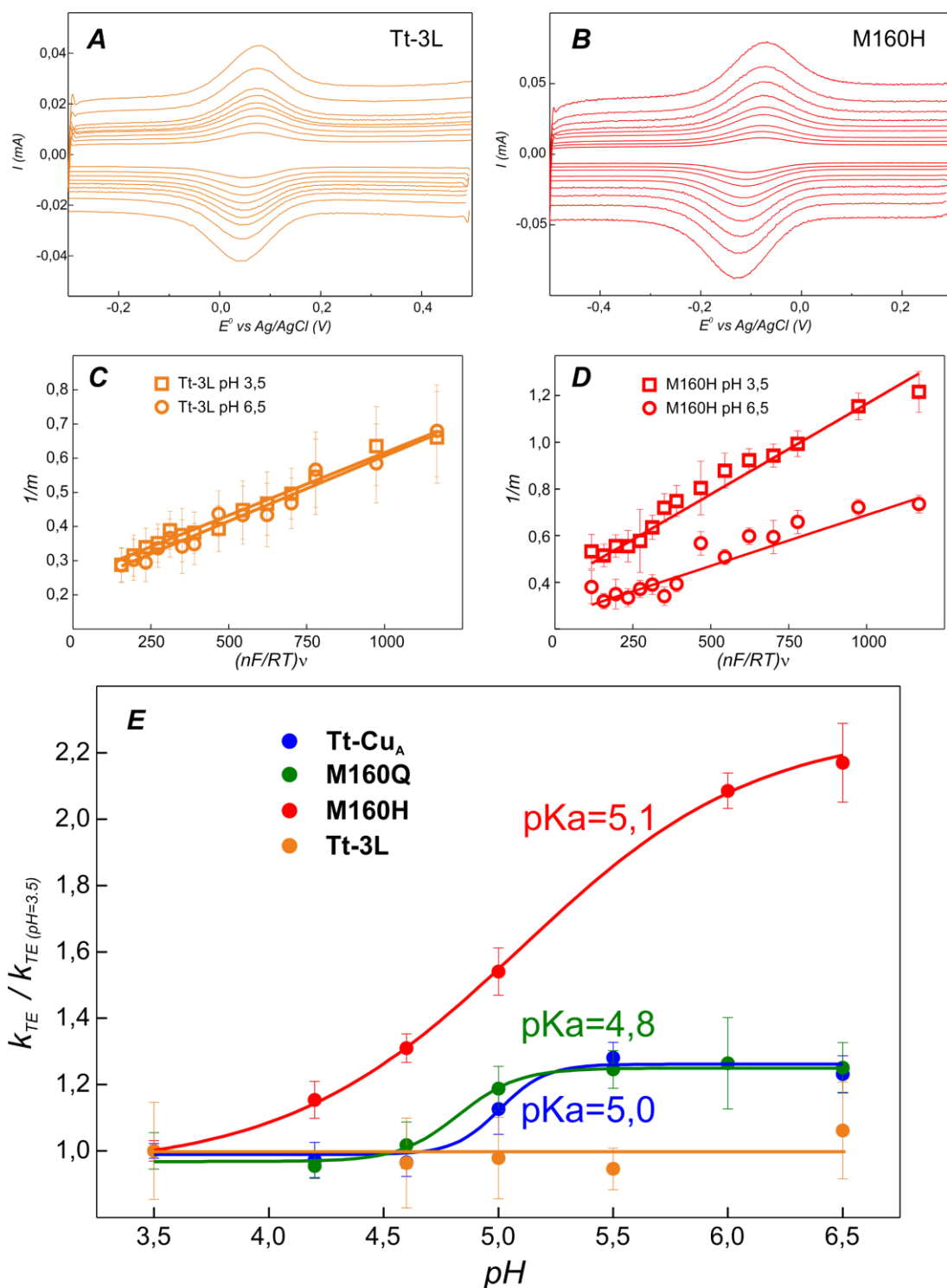


Figura 4-21. Medidas cinéticas de las distintas variantes de Tt-Cu_A adsorbidas sobre C5 en un buffer de medida con 10mM fosfato (pH variable) y 200 mM KNO₃. (A) y (B) Voltagramas de Tt-3L (naranja) y M160H (rojo) adquiridos a distintas velocidades de barrido. (C) y (D) Formalismo de Laviron para la obtención del valor de k_{TE} en los valores extremos de pH ensayados. (E) k_{TE} (normalizada) en función del pH para Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo), M160Q (verde) y Tt-3L (naranja) en estado adsorbido. Se muestran los valores de pKa obtenidos del ajuste a una curva sigmoidea, a excepción de Tt-3L, que no presenta transición dependiente del pH.

Según la teoría de Marcus, una transición en el valor de k_{TE} producida en estas condiciones experimentales puede estar reflejando cambios en tres variables distintas, a saber, la fuerza impulsora, el acoplamiento electrónico y la energía de reorganización (ver detalles en la sección 1.3.1). Dadas la ausencia de transiciones abruptas en el valor del E^0 y el hecho de que el método utilizado para determinar k_{TE} arroja el valor a sobrepotencial nulo, la fuerza impulsora no puede ser la responsable del cambio cinético^{87,89}. Si bien no es posible medir de manera directa el acoplamiento electrónico entre la muestra adsorbida y el electrodo, se puede acceder al valor de λ empleando el ajuste de Arrhenius del mismo modo que en las secciones anteriores. Con este objetivo se realizaron determinaciones del valor de k_{TE} en función de la temperatura a valores distintos de pH por encima y por debajo del pKa de la transición. Sorprendentemente M160H mostró también una transición pH-dependiente en este parámetro, con valores de aproximadamente 0,3 eV y 0,6 eV a pH ácido y neutro respectivamente (figura 4-22). El valor de λ del resto de las variantes no presento variabilidad con el pH, manteniendo los valores de 0,3 eV, 0,3 eV y 0,6 eV para Tt-Cu_A, M160Q y Tt-3L, respectivamente, previamente informados en la tabla 4-3.

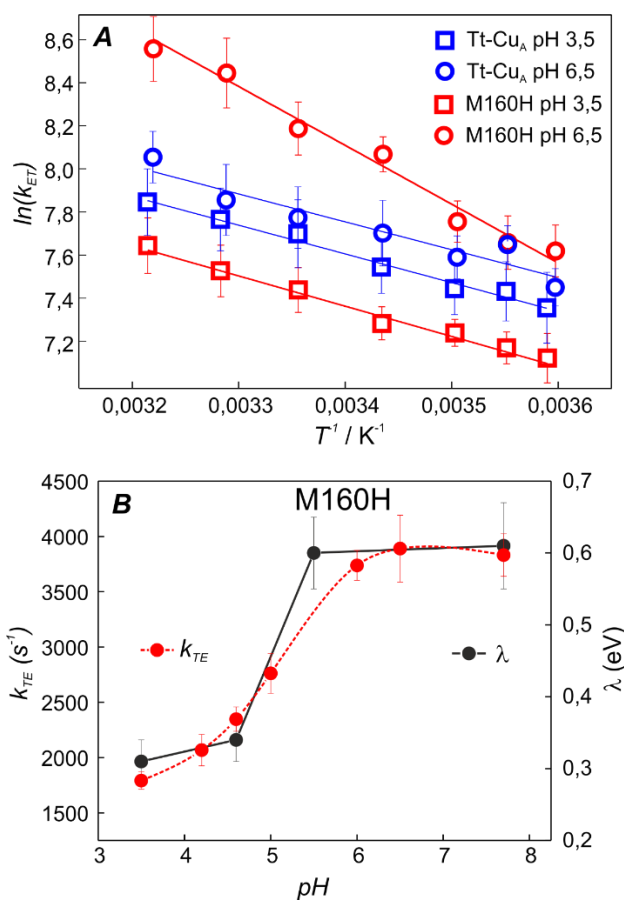


Figura 4-22. (A) Ajuste de Arrhenius para medidas cinéticas de Tt-Cu_A (azul) y M160H(rojo) a pH 3,5 (cuadrados) y 6,5 (círculos). (B) Valores de k_{TE} (eje izquierdo, rojo) y λ (eje derecho, negro) en función del pH para M160H.

Ante estos resultados se buscó, en primer lugar, descartar artefactos experimentales particulares de M160H que estuvieran generando datos espurios y pudieran así conducir a conclusiones erróneas. Se corroboró la reversibilidad de la transición del valor de k_{TE} , así como también de la variación en el valor del E^0 , descartando cambios estructurales irreversibles en M160H que alteren las propiedades funcionales del sitio activo (figura 4-23 A). Además, algunas de las réplicas introducidas en los ajustes de Arrhenius fueron realizadas sobre muestras sometidas previamente a distinto pH, sin que se afectara la calidad de las regresiones lineales (figura 4-23 B).

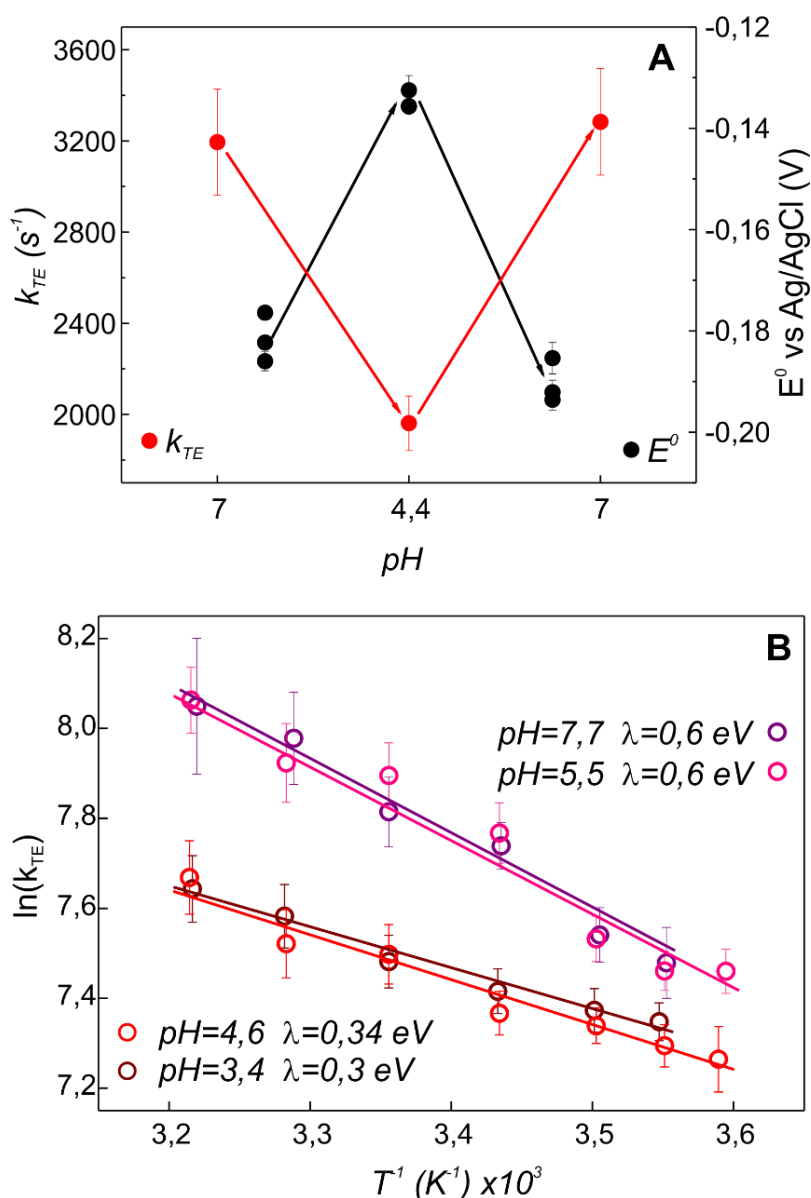


Figura 4-23. (A) Valores de k_{TE} (eje izquierdo, rojo) y E^0 (eje derecho, negro) para medidas sucesivas de M160H realizadas a pH 7; 4,4 y 7, corroborando la reversibilidad de los cambios. (B) $\ln(k_{TE})$ vs T^{-1} para M160H a pH 3,4 (marón); 4,6 (rojo); 5,5 (rosa) y 7,7 (violeta). Los valores de λ se obtuvieron a partir de las regresiones lineales.

Cabe señalar que, según los resultados presentados en la sección anterior, la reacción de TE para Tt-Cu_A adsorbida sobre SAMs delgadas se encuentra en el régimen adiabático o de control friccional. En este régimen el valor de k_{TE} se hace prácticamente independiente de la distancia, pasando a depender fuertemente de la frecuencia nuclear efectiva ν_n (la dependencia con κ_n no se altera). No obstante, las descripciones matemáticas del modelo responden a los casos extremos, es decir, a la reacción de TE cuando ocurre en condiciones totalmente adiabáticas o totalmente no adiabáticas. Los resultados electroquímicos aquí presentados señalan que las condiciones de adsorción sobre una SAM C₅ representan para esta proteína un caso intermedio que no responde completamente a la descripción de alguno de los dos regímenes, sino parcialmente a ambos.

Constatada la calidad y reversibilidad de los resultados, se analizó el hecho de que la transición pH dependiente de la k_{TE} esté asociada a una transición entre dos valores característicos de λ (0,3 y 0,6 eV). Esto sugiere que M160H sufre una transición funcional entre sus dos estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u , que se alternarían como RAMO. Según esta hipótesis, el valor de λ medido a pH ácido (0,3 eV) se correspondería con la reacción de TE desde su estado σ_u^* , mientras que hacia pH neutro la TE se produciría a partir del estado π_u (0,6 eV), lo que configuraría un *switch* funcional dependiente de pH entre ambos estados. El hecho de que el valor de k_{TE} se duplique cuando el valor de λ también lo hace resulta a priori anti-intuitivo, no obstante, es consistente con los resultados presentados en la sección 4.2.3. En ese caso, los valores de k_{TE} entre mutantes de distinto λ son similares, sugiriendo que el en el estado π_u presenta un mayor acoplamiento electrónico que compensa el elevado valor de λ . En este caso, el estado π_u de M160H presentaría un aumento del acoplamiento electrónico respecto del estado σ_u^* , el cual estaría sobrecompensando el mayor valor de λ , aumentando así la velocidad de la reacción de TE cuando actúa como RAMO. A la luz de la teoría de Marcus, los valores de k_{TE} y λ obtenidos a pH ácido y a pH neutro (a ambos lados del aparente *switch* funcional) serían indicativos de un aumento del acoplamiento electrónico entre el sitio de Cu_A de M160H y el electrodo |H_{DA}| en un factor 7,5. Cabe señalar que, dado que el término del de acoplamiento electrónico esta elevado al cuadrado en la ecuación (8), este aumento de |H_{DA}| representa un aumento en casi un factor 60 para el valor de k_{TE} (considerando invariable los demás parámetros).

Estos resultados propulsaron diversos intentos para estudiar espectroscópicamente a las distintas variantes de Tt-Cu_A en estado adsorbido, desde espectroscopia Raman resonante (RR) intensificada por superficie (SERRS), técnica de la que se cuenta con gran *expertise* en nuestro laboratorio, hasta medidas de absorción UV-Vis en muestras adsorbidas sobre electrodos transparentes de oro (tAu) biocompatibilizados^{45,50,100,112,113}. Desafortunadamente las características propias del sistema y de los métodos ensayados presentaron obstáculos insorteables. La ausencia de una banda de absorción en el espectro UV-Vis que sea lo suficientemente intensa como para producir,

con las líneas láseres disponibles, la intensificación necesaria de señal (por resonancia), resulta un fuerte limitante de la sensibilidad de la SERRS ^{20,50}. Además, para contar con control electroquímico, es necesario trabajar por encima de las temperaturas de congelamiento del agua, donde las bandas en los espectros RR de los sitios de Cu_A tienden a ensancharse, perjudicando aún más la detección ^{58,114,115}. Por otra parte, la espectroscopia UV-Vis de especies adsorbidas sobre oro transparente requiere un coeficiente de extinción molar de la muestra lo suficientemente alto como para que la absorbancia de una monocapa de moléculas sea detectable. Lamentablemente, este no es el caso de Tt-Cu_A, y por extensión de sus variantes, dado que tal coeficiente no sobrepasa los 3100 M⁻¹ cm⁻¹ en el espectro visible ¹¹⁶.

Sin embargo, fue posible la utilización de una técnica capaz de brindar información complementaria sobre el sistema proteína/SAM/electrodo, y ampliar así el enfoque acerca del efecto del pH sobre M160H: la resonancia de plasmón superficial (SPR). Para las medidas realizadas fue empleado un electrodo plano y transparente de oro recubierto de la misma SAM utilizada en los experimentos electroquímicos antes desarrollados, sobre el cual se adsorbieron M160H y Tt-Cu_A (como control). A partir de un sistema de flujo, ambas muestras fueron sometidas a soluciones de distinto pH, midiendo en cada caso la reflectividad en función del ángulo incidente del haz sobre la superficie metálica. Se midieron 3 valores de pH, a saber, 7; 4 y 3; para medir luego un cuarto punto a pH 7 nuevamente y corroborar la reversibilidad de los (posibles) cambios (ver detalles en la sección 2.4.3). Los datos demuestran que hacia pH ácido se produce un cambio reversible y de igual magnitud en la reflectividad de ambas proteínas (figura 4-24).

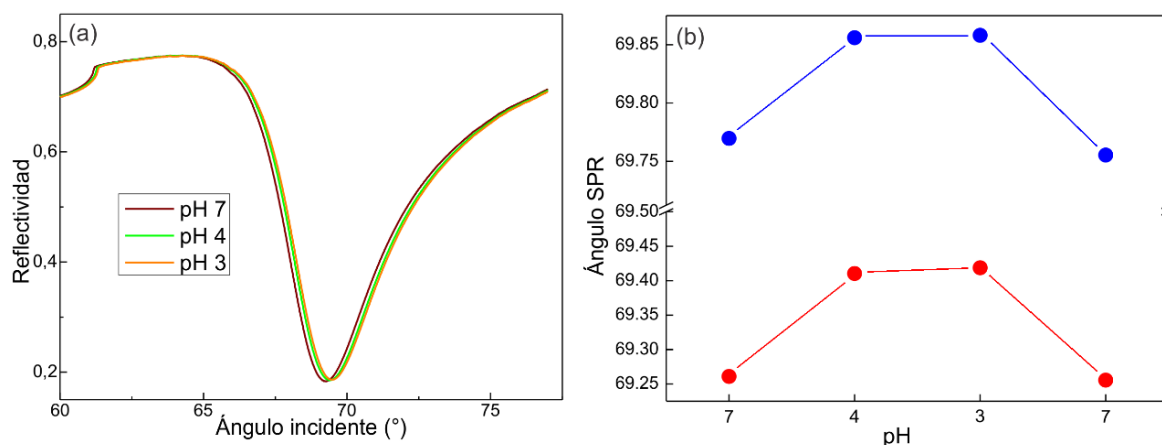


Figura 4-24. (a) Curvas de reflectividad en función del ángulo incidente del haz para M160H a distintos valores de pH. (b) Ángulo SPR para Tt-Cu_A (azul) y M160H (rojo) a distintos valores de pH. El experimento consta de medidas consecutivas a pH 7; 4; 3 y 7 nuevamente, corroborándose la reversibilidad del cambio observado. Las líneas actúan como guía visual de la secuencialidad experimental.

Para el análisis de estos resultados es importante recordar que, si bien la transición de los parámetros cinéticos de la reacción de TE en M160H implica una duplicación tanto del valor de k_{TE} como del valor de λ , Tt-Cu_A también presenta una transición que se refleja únicamente en un aumento leve (28%) del valor de su k_{TE} (figuras 21 y 22). Teniendo esto en cuenta, los resultados obtenidos por SPR sugieren una reorientación reversible dependiente del pH de la proteína tanto para Tt-Cu_A como para M160H. Esta reorientación dependiente del pH explica el leve aumento en el valor de k_{TE} de Tt-Cu_A y M160Q (que no fue medida por SPR) observado en la figura 21, ya que un cambio de orientación puede generar un cambio en el acoplamiento electrónico, alterando el valor de k_{TE} sin modificar el E^0 . Es importante señalar que un fenómeno de estas características es probablemente consecuencia del equilibrio ácido-base de uno o varios residuos superficiales. M160Q y Tt-Cu_A tienen una superficie proteica idéntica, y asumiendo que la reorientación se debe al cambio de protonación de residuos superficiales, esta también será idéntica, generando el mismo cambio en el acoplamiento electrónico y por lo tanto el mismo cambio en el valor de k_{TE} , como lo corroboran los datos de la tabla 4-5.

Por su parte, M160H también es superficialmente idéntica a Tt-Cu_A, por lo cual también debe ser idéntica su reorientación pH-dependiente, como lo refleja el hecho de que la magnitud de la variación en el ángulo SPR de ambas sea tan similar (figura 4-24). Cabe recordar que, de las cuatro variantes estudiadas electroquímicamente, Tt-3L es la única cuya k_{TE} resulta insensible al pH. Esta es además la única de las cuatro variantes que presenta mutaciones superficiales en los bucles que conforman el sitio activo (ver detalles en la sección 3.2.2), lo cual posiblemente haya alterado su sensibilidad al pH, impidiendo su reorientación y consecuente cambio de acoplamiento electrónico (esto aspecto será retomado en la siguiente sección). Los resultados SPR señalan que el fenómeno que genera una transición en el valor de k_{TE} de Tt-Cu_A y ambas mutantes puntuales sería una reorientación dependiente del pH. Sin embargo, es insuficiente para explicar el gran aumento de la k_{TE} con el pH en M160H (comparado al leve aumento en Tt-Cu_A y M160Q), o el cambio de su valor de λ entre los correspondientes a ambos estados fundamentales alternativos (figura 4-22 y tabla 4-5). Una modulación de esta magnitud en ambos parámetros cinéticos no puede atribuirse a una simple reorientación, menos aún si provoca variaciones tan leves en proteínas casi idénticas desde el punto de vista estructural. Por lo tanto, la hipótesis de un *switch* funcional dependiente del pH en M160H no sólo no puede descartarse, sino que estimula una profundización en los estudios sobre esta peculiar variante de Tt-Cu_A.

4.2.6- El *switch* en el estado redox activo del sitio de Cu_A

Con el objetivo de profundizar el estudio acerca del posible switch funcional pH-dependiente en M160H se realizaron diversos estudios espectroscópicos en función del pH sobre muestras en solución (UV-Vis, RR, RMN y EPR). Este tipo de medidas brindan información complementaria en relación a aquellas realizadas sobre especies adsorbidas (presentadas en la sección anterior: VC y SPR), lo cual permite un abordaje más completo del sistema. Uno de los aspectos más importantes dado que el fenómeno observado ocurre a valores ácidos de pH es descartar cambios estructurales que afecten las propiedades fundamentales del sitio redox tales como su carácter de VM, generando así los cambios cinéticos no por el poblamiento del estado alternativo π_u sino por el cambio en la descripción electrónica del mismo estado fundamental σ_u^* . Se realizaron entonces determinaciones mediante EPR sobre la mutante M160H a distintos valores de pH, buscando elucidar la permanencia o no del carácter de VM a lo largo de todo el rango (figura 4-25). Si bien los espectros adquiridos presentan leves diferencias, en todos los casos reproducen las características típicas de los sitios de Cu_A, con su electrón desapareado completamente deslocalizado entre ambos átomos de cobre^{59,63,116–120} (ver detalles en la sección 3.2.2). En particular, los valores del factor g y del acoplamiento hiperfino (A) responden a los de un sitio de VM en los cuatro valores estudiados de pH (tabla 4-6).

Tabla 4-6. Valores de $g_{\parallel}$, $g_{\perp}$, $A_{\parallel}$ y $A_{\perp}$ para M160H a pH 7; 5; 4,5 y 3,5 obtenidos a partir de los espectros EPR de la figura 4-25. La variabilidad casi nula con los valores presentados corrobora el carácter de VM en todo el rango de pH.

Parámetros	pH 7	pH 5	pH 4,5	pH 3,5
$g_{\parallel}$	2,219	2,219	2,212	2,210
$g_{\perp}$	2,02	2,02	2,01	2,01
	1,96	1,97	1,96	1,98
$A_{\parallel}$ (mT)	60	60	60	60
$A_{\perp}$ (mT)	40	40	40	40
	40	40	40	40

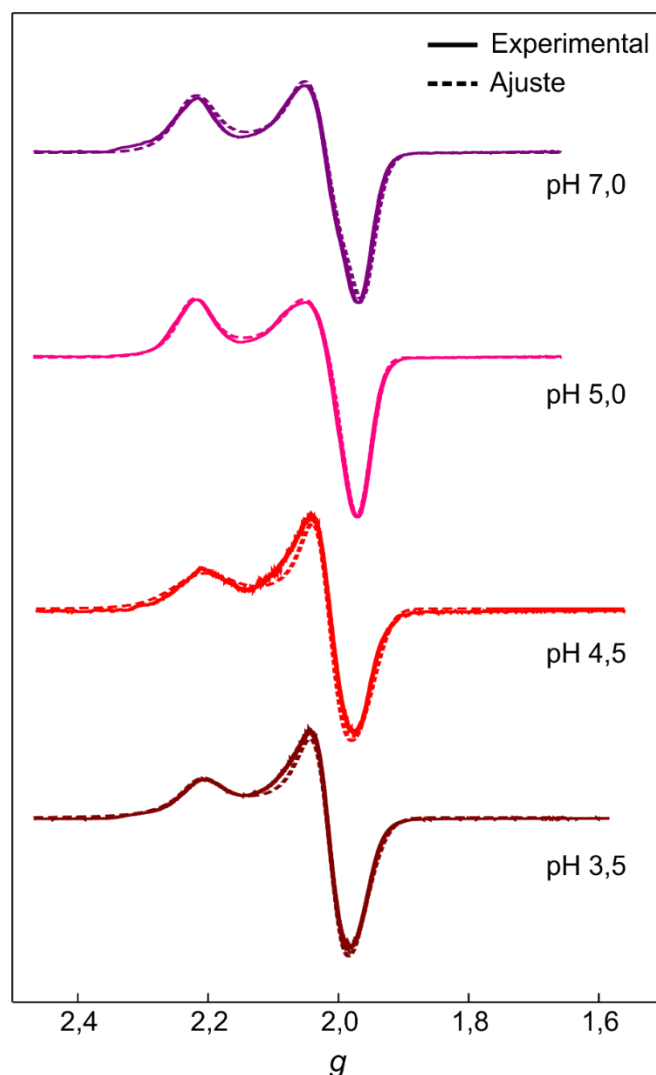


Figura 4-25. Espectros EPR de M160H (línea llena) a pH 7 (violeta); 5 (rosa); 4,5 (rojo) y 3,5 (marrón), dispuestos de arriba hacia abajo. A partir de los ajustes (líneas punteadas) se obtuvieron los parámetros detallados en la tabla 4-6 que permiten descartar cambios significativos en el carácter de VM del sitio de Cu_A.

Estos resultados son consistentes con la ausencia de transiciones en el valor del E^0 , donde se vería reflejado un cambio en el carácter de valencia mixto del sitio de Cu_A, como fue reportado para el caso de Cu_A-Azu^{54,55} (figura 4-20 B). Otra técnica útil para monitorear cambios en la estructura y la descripción electrónica del sitio de Cu_A es la espectroscopia Raman resonante (RR), ya que permite obtener espectros vibracionales intensificando los modos normales que involucran a los átomos de cobre¹²¹. Se adquirieron espectros RR en condiciones análogas a las empleadas en el capítulo anterior, esto es, utilizando un láser de excitación de 514 nm (19455 cm^{-1}) que se encuentra en resonancia con la transición electrónica de TCLM $S_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ del estado fundamental σ_u^* , intensificándose principalmente los modos en los que participa el motivo Cu₂S₂ de acuerdo a la asignación vibracional previamente realizada para el sitio

de Cu_A de la CcO de *P. denitrificans*¹¹⁵ (figura 4-26 A). Cabe recordar que, dado que la línea láser utilizada es resonante únicamente con una transición desde el estado fundamental σ_u^* , el espectro obtenido es “invisible” al estado alternativo π_u . Estas medidas fueron adquiridas a distintos valores de pH entre 7 y 2,2 (empleando distintas soluciones de buffer fosfato 100 mM) y a 77 K con los objetivos de optimizar la señal RR y de maximizar el poblamiento del estado fundamental medido (figura 4-27).

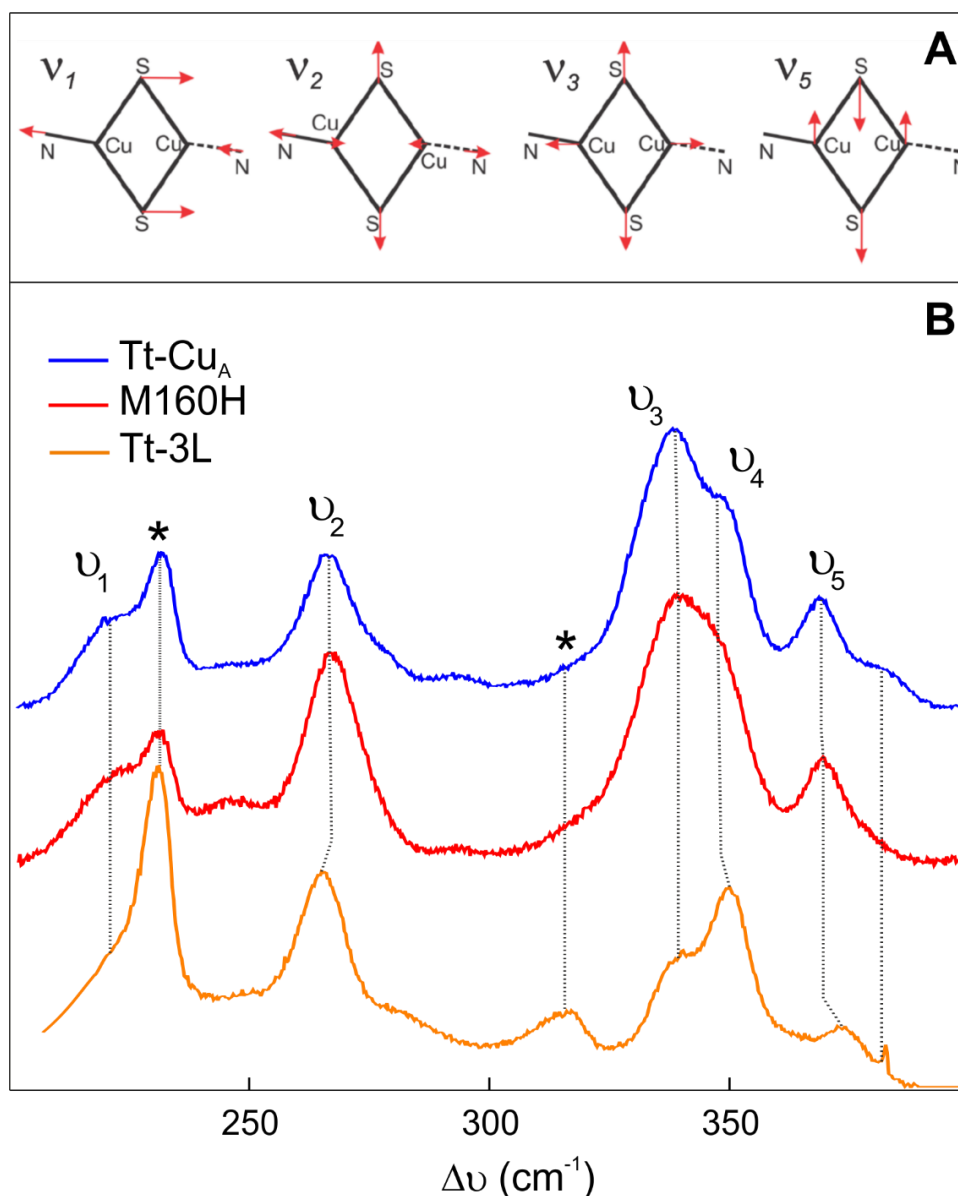


Figura 4-26. (A) Representación esquemática de los cuatro modos normales asignados a bandas detectables mediante RR empleando excitación de 514 nm. (B) Espectros RR de Tt-Cu_A (azul) M160H (rojo) y Tt-3L (naranja) obtenidos con láser de excitación a 514 nm, a una temperatura de 77 K y a pH 7. Las líneas punteadas marcan la posición de las bandas observadas cuya asignación responde al antecedente de citado de *P. denitrificans*¹¹⁵ (S corresponde al solvente).

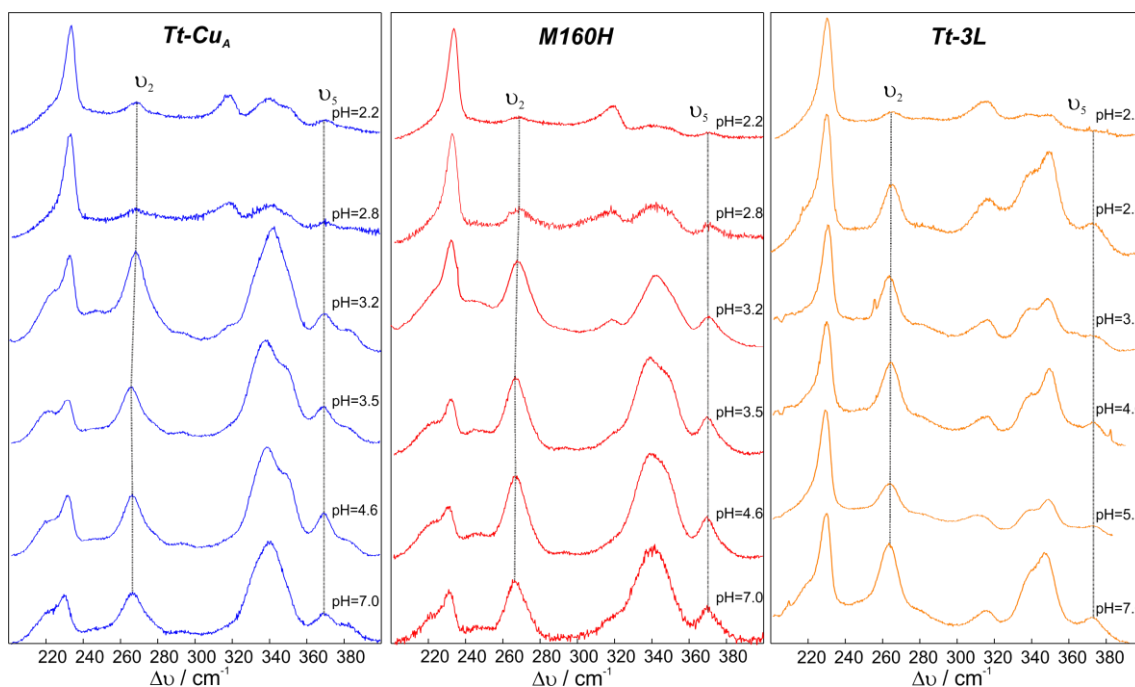


Figura 4-27. Espectros RR de Tt-Cu_A (azul), M160H (rojo) y Tt-3L (naranja) a distintos valores de pH (por simplicidad se omiten los espectros de M160Q, idénticos a Tt-Cu_A). Las líneas punteadas siguen la posición del máximo de las bandas ν_2 y ν_5 , que se presenta en la figura 4-22.

Los espectros RR de estas proteínas presentan seis bandas características cuya asignación ya ha sido analizada en el capítulo anterior (ver detalles en las secciones 3.2.1 y 3.2.2). Resumidamente, la banda ν_1 responde a una combinación asimétrica de los estiramientos Cu-N y Cu-S, la banda ν_2 es la correspondiente a una combinación de movimientos de elongación Cu-N_{His} y Cu-S_{Cys}, la banda ν_3 está asignada al estiramiento simétrico del rombo Cu₂S₂, la banda ν_5 viene dada por el estiramiento asimétrico del rombo Cu₂S₂, y las bandas ν_4 y ν_6 no han podido ser asignadas (figura 4-26). A partir de la inspección de las medidas en función del pH se puede observar una fuerte resiliencia en la posición de las distintas bandas con esta variable, a excepción de la banda ν_2 (≈ 267 cm⁻¹), que presenta un corrimiento en los espectros de Tt-Cu_A, M160Q y M160H con una amplitud de aproximadamente 3 cm⁻¹. Este desplazamiento de la banda ν_2 hacia energías mayores (≈ 270 cm⁻¹) ocurre a valores ácidos de pH, con un pKa aparente de 3,2; pero no aparece en la variante Tt-3L, cuyo espectro RR se muestra absolutamente insensible a cambios en el pH (figuras 4-27 y 4-28).

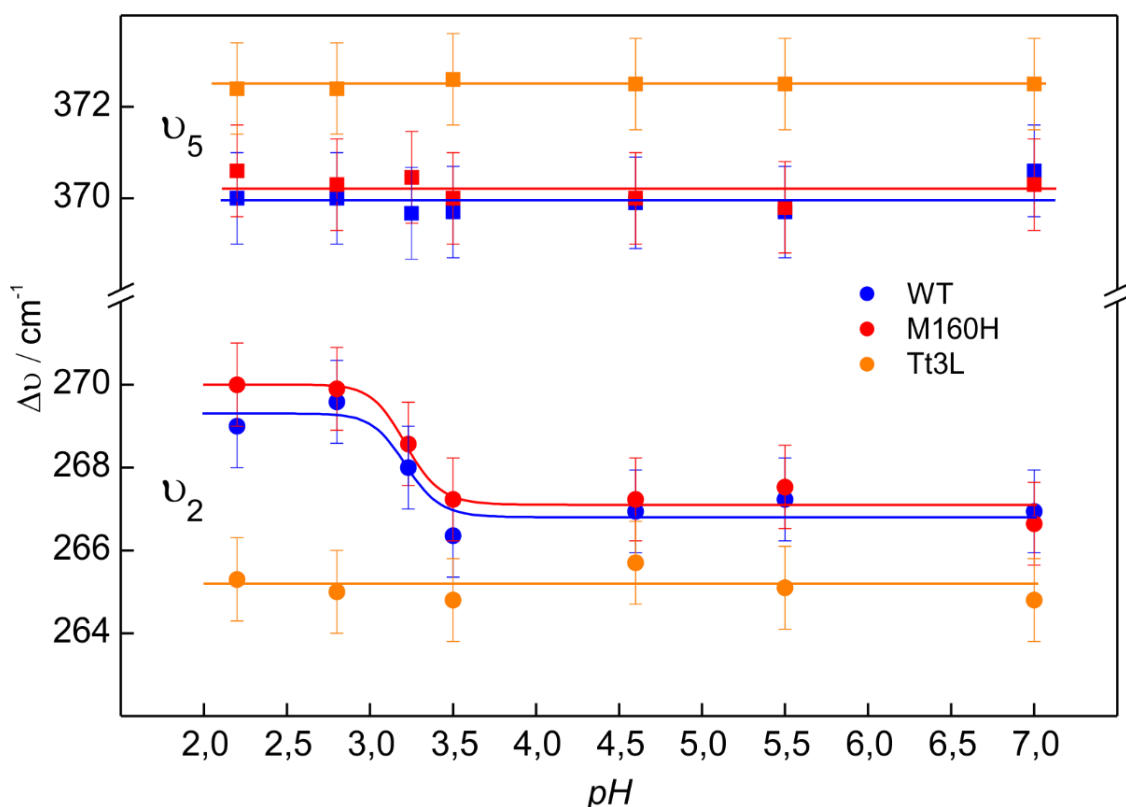


Figura 4-28. Dependencia de las bandas ν_2 (círculos) y ν_5 (cuadrados) de las variantes medidas con el pH. Tt-Cu_A (azul) y M160H (rojo) presentan una transición pH-dependiente en la posición de la banda ν_2 con un pKa aparente de 3,2, mientras Tt-3L (naranja) resulta insensible al pH.

El valor de pKa registrado en la transición de la banda ν_2 es notablemente similar a lo observado en estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre Tt-Cu_A, que indican la existencia de una transición dependiente del pH con un pKa aparente de 3,5. Esta transición aparente, detectada por medidas de RMN paramagnético, fue atribuida a un cambio en la velocidad de intercambio protónico del anillo imidazólico del ligando ecuatorial histidina 157, probablemente debido a un cambio sutil en la matriz proteica inducido por el cambio de pH. Sin embargo, se pudo descartar que este efecto altere las poblaciones relativas de los estados fundamentales alternativos de Tt-Cu_A⁵⁸ (figura 4-29). Por su parte, la banda ν_2 del espectro RR corresponde a un modo vibracional A_{1g} cuyas contribuciones mayoritarias corresponden a elongaciones de enlaces Cu-Cu, Cu-N y Cu-S¹¹⁵ (figura 4-26 A). Por lo tanto, es esperable que este modo normal, directamente ligado a la oscilación de enlaces Cu-N, se vea afectado por perturbaciones en el ligando H157 como las detectadas por RMN. Si esta transición detectada por RMN fuera la responsable del corrimiento de la banda ν_2 , sería también esperable que aquellas bandas atribuidas a modos que no involucren la oscilación Cu-N_{H157} permanezcan inalteradas en el rango de valores de pH estudiados. En concordancia con esta interpretación se verifica que la banda ν_5 (≈ 360 cm⁻¹), correspondiente a un modo

normal que involucra de manera casi excluyente a los átomos del motivo Cu_2S_2 ¹¹⁵ (figura 4-26 A), resulta insensible al pH a lo largo de todo el rango medido y para todas las variantes proteicas estudiadas (figuras 4-27 y 4-28). Estos resultados sugieren que el desplazamiento de la banda ν_2 es consecuencia de un cambio en el entorno de la histidina 157 que ocurre a pH ácido y que aumenta tanto su velocidad de intercambio protónico con el solvente como la energía vibracional del enlace $\text{Cu-N}_{\text{H157}}$.

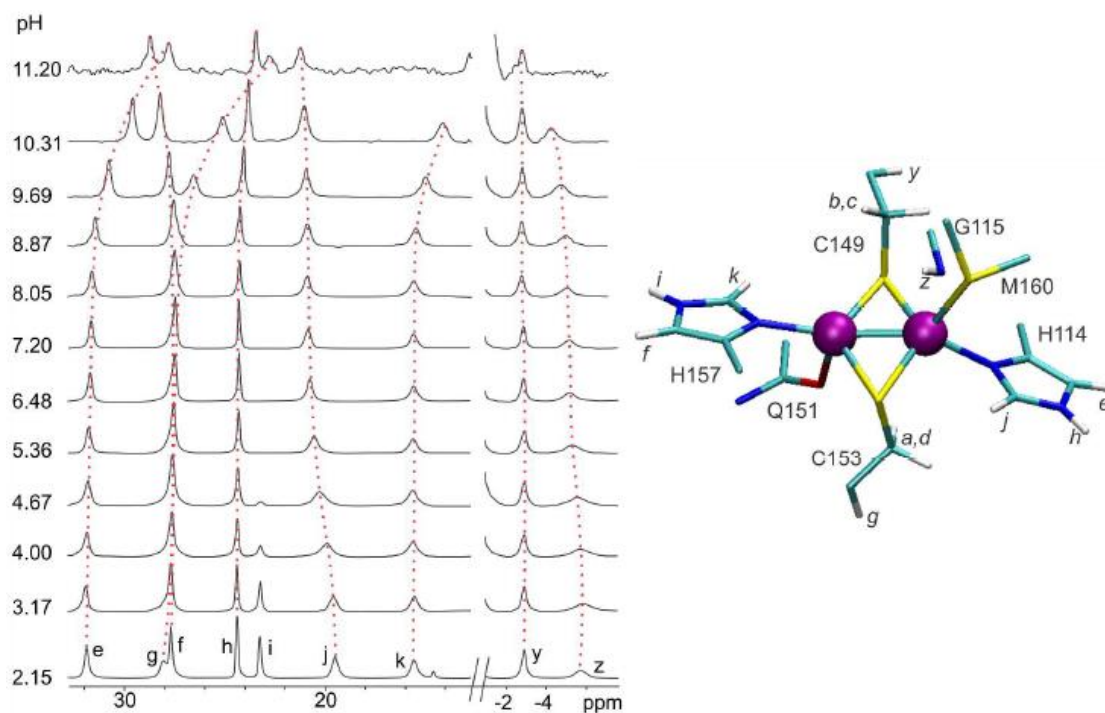


Figura 4-29. (figura adaptada de Álvarez-Paggi et al. 2013⁵⁸) *Espectro protónico de RMN paramagnético de Tt-Cu_A a distintos valores de pH. Las señales de los distintos desplazamientos químicos están referenciadas al esquema del sitio de Cu_A. De particular interés es la aparición de la señal i a valores bajos de pH, atribuida a un cambio en la velocidad del intercambio protónico de la histidina 157.*

La interpretación de los datos espectroscópicos desarrollada en párrafo anterior implica que la insensibilidad al pH del espectro RR de Tt-3L debe estar vinculada con la sustitución de los tres bucles que configuran el sitio activo (ver detalles en la sección 3.2.2). Esta variante presenta 12 mutaciones puntuales respecto de Tt-Cu_A, todas en el entorno del sitio activo, y en particular tres de ellas resultan próximas a la Histidina 157 en la estructura tridimensional: L155A, G156N y Q158S. Estas mutaciones evidentemente alteran el entorno proteico de la histidina 157, eliminando su sensibilidad al cambio de pH (en el rango medido), lo que explica no sólo los resultados obtenidos por RR, sino también la ausencia de transición en el valor de la k_{TE} observada

en los experimentos electroquímicos presentados en la sección anterior (figura 4-21). Además, el cambio del valor de k_{TE} de un 25% observado en Tt-Cu_A y M160Q (y ausente en Tt-3L) había sido atribuido, a partir de la evidencia obtenida por SPR, a una reorientación dependiente del pH (ver detalles en la sección 4.2.5). Así, los resultados espectroscópicos y electroquímicos en conjunto son consistentes con que las mutaciones superficiales introducidas en la construcción de Tt-3L provocan una insensibilidad al pH que se manifiesta en la ausencia de transición tanto de su valor de k_{TE} como en la posición de la banda ν_2 .

Por otra parte, y teniendo en cuenta que la transición observada mediante los espectros RR son idénticas en Tt-Cu_A y las mutantes puntuales, permanece aún el interrogante acerca de la fuerte modulación de los parámetros cinéticos (k_{TE} y λ) de M160H. En este aspecto, los espectros RR medidos en función del pH representan un aporte, ya que permiten descartar una perturbación del estado fundamental σ_u^* a valores ácidos de pH como explicación de los distintos valores de λ medidos electroquímicamente. Sería esperable que cambios en la descripción electrónica del sitio activo capaces de modificar de tal manera los parámetros redox implicaran una sensible redistribución de su densidad electrónica. A partir del modelo Cu_A-Azu (y su mutante puntual H120A) estudiado a distintos valores de pH, Xie y colaboradores determinaron que una perturbación del sitio activo de tales características está asociada a cambios en su descripción electrónica y, en particular, a un aumento en la interacción Cu-Cu^{54,60}. Los autores observaron que los espectros RR del sitio de Cu_A perturbado presenta un corrimiento positivo de 10 cm⁻¹ en la banda correspondiente al modo normal que involucra la vibración entre los átomos metálicos, como consecuencia de su mayor interacción. La insensibilidad al pH de la mayoría de las bandas en los espectros RR es indicativa de que tal tipo de transición no tiene lugar en este caso, confirmando que el estado fundamental σ_u^* se mantiene inalterado (figuras 4-27 y 4-28). En el citado trabajo se observan además otras alteraciones espectroscópicas asociadas a la perturbación del sitio de Cu_A, como por ejemplo cambios en los parámetros obtenidos de los espectros EPR. Los resultados de EPR (figura 4-25 y tabla 4-6) aquí discutidos no responden a cambios comparables a los observados en Cu_A-Azu, por el contrario, son consistentes con un sitio de Cu_A cuya naturaleza se ve inalterada ante los cambios de pH estudiados.

Habiéndose descartado que el efecto del pH sobre el sitio redox de M160H radique en un cambio de su descripción electrónica, se refuerza la hipótesis de un *switch* funcional entre ambos estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u . Un fenómeno de estas características podría producirse por el cambio en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, que repercutiría además en la población relativa de ambos estados, aumentando la población del estado σ_u^* hacia pH ácido (donde se registra un valor de λ de 0,3 eV) y del estado π_u hacia pH neutro (donde se registra un valor de λ de 0,6 eV). Así, el pH no estaría ejerciendo (en principio) un efecto sobre la naturaleza de los estados fundamentales alternativos, sino sobre el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, cuya relación con el valor de ΔG_{TE}^*

estaría determinando si es el estado σ_u^* o el estado π_u el que actúa como RAMO (figura 4-16). Por lo tanto, si la transición observada en los parámetros cinéticos de M160H implica un aumento en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ al bajar el pH (y el consecuente incremento poblacional del estado σ_u^*), debería verse reflejada en el espectro UV-Vis (ver detalles en las secciones 3.2.1 y 3.2.2). Se adquirieron espectros UV-Vis de las distintas variantes proteicas a distintos valores de pH en el rango comprendido entre pH 7 y pH 2,2 (figura 4-30). Los espectros de Tt-Cu_A, Tt-3L y M160Q se muestran invariantes frente a cambios en el pH, mientras que M160H presenta cambios significativos hacia valores de pH ácidos (por debajo de pH 4). En particular, se observa una variación reversible en las intensidades relativas entre la banda de TCLM S_{Cys}→Cu del estado σ_u^* ($\approx 18500 \text{ cm}^{-1}$) y la banda de TCLM S_{Cys}→Cu del estado π_u (28000 cm^{-1}). Empleando el mismo análisis desarrollado en el capítulo anterior a partir de los espectros simulados para el sitio de Cu_A en ambos estados fundamentales alternativos, los cambios espectrales de M160H con a pH ácido reflejan una modulación en el poblamiento relativo de ambos estados fundamentales alternativos ⁶² (ver detalles en las secciones 3.2.1 y 3.2.2).

Analizando el cambio de intensidades relativas observado en los espectros de M160H en función del pH, se detecta una variación que responde a un ajuste de tipo sigmoideo (figura 4-31). La forma de esta variación indica una transición entre dos estados, y el hecho de que el pK_a adopte un valor de 3,1 sugiere que el aumento de la población relativa del estado σ_u^* a pH ácido puede estar vinculada a la transición observada en los espectros RR, con un pK_a de 3,2 (figura 4-28). La transición asociada al cambio en el entorno de la histidina ligante 157 hacia valores bajos de pH sería entonces la responsable del aumento en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, con el consecuente aumento de la población relativa del estado fundamental σ_u^* y los cambios asociados en el espectro UV-Vis. No obstante, la transición observada en el espectro RR de M160H es compartida por Tt-Cu_A y M160Q, quienes no muestran una transición asociada en sus espectros UV-Vis. Este aspecto controversial en la interpretación de los resultados espectroscópicos será discutido en los párrafos sucesivos a la luz de mayor evidencia.

Por otra parte, es posible determinar semicuantitativamente la población relativa de ambos estados fundamentales alternativos a partir de las intensidades relativas de sus respectivas bandas de TCLM S_{Cys}→Cu. Considerando al estado fundamental alternativo π_u como el primer y único estado excitado accesible, su población relativa (P_{π_u}) puede expresarse en términos de la ley de Boltzman:

$$P_{\pi_u} = \frac{\exp(-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T)}{1 + \exp(-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T)} \quad (12)$$

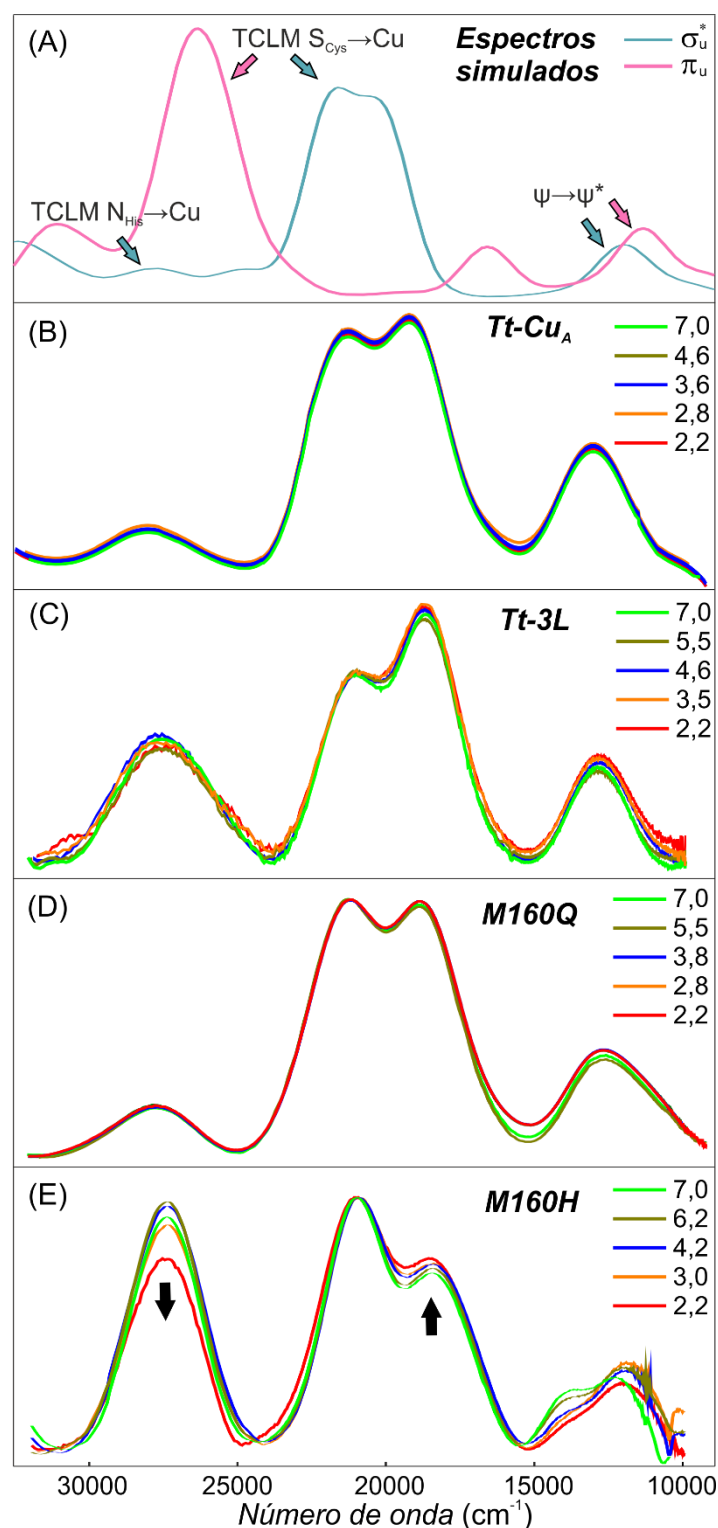


Figura 4-30. (A) Espectros UV-Vis simulados de ambos estados fundamentales alternativos del sitio de Cu_A (ver detalle en las secciones 3.2.1 y 3.2.2), con la asignación de las distintas bandas. En los paneles (B), (C), (D) y (E) se presentan los espectros experimentales (normalizados) de Tt-Cu_A, Tt-3L, M160Q y M160H a distintos valores de pH abarcando un rango entre pH 7 y pH 2,2. El espectro de M160H es el único que presenta cambios significativos pH-dependientes. Las flechas destacan los principales cambios de intensidades, analizados en la figura 4-31.

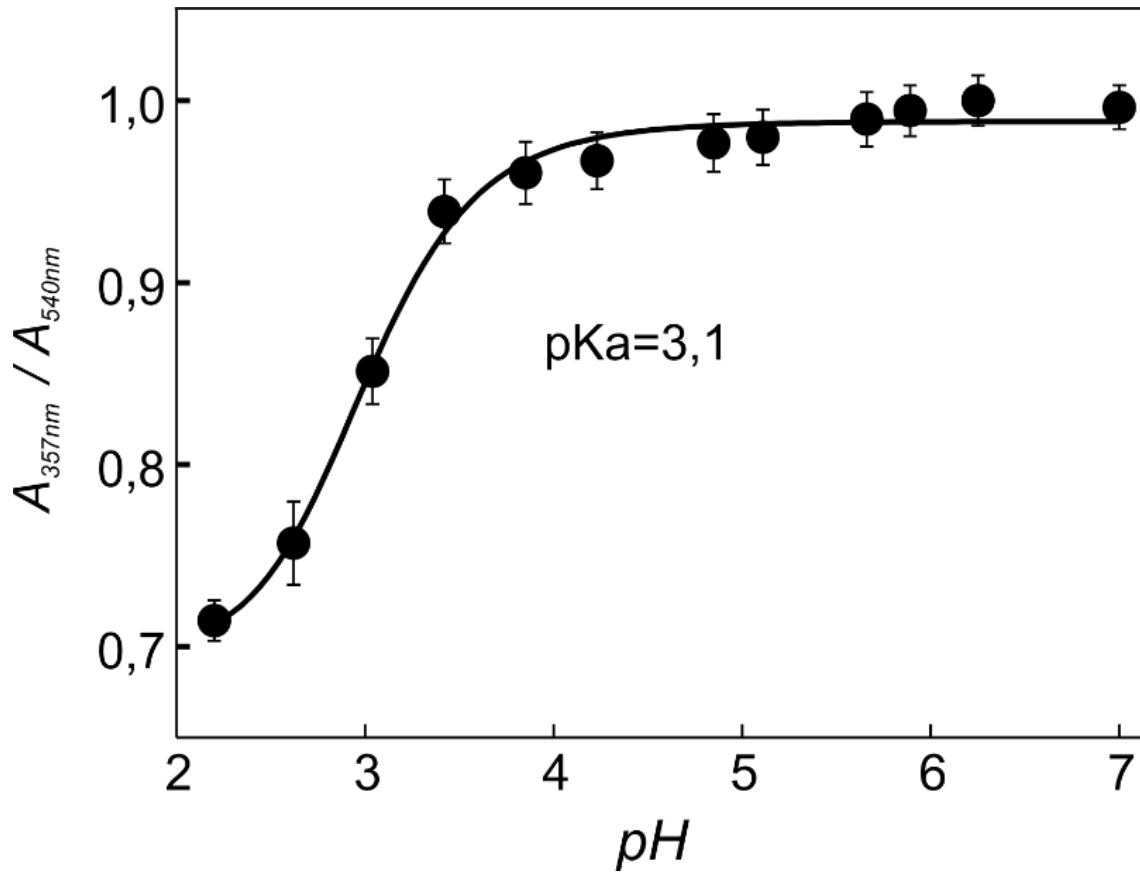


Figura 4-31. Cociente entre el máximo de absorbancia de las bandas de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ de los estados σ_u^* (A_{540nm}) y π_u (A_{357nm}) de los espectros de M160H presentados en la figura 4-30 en función del pH. El ajuste a una curva de tipo sigmoidea presenta un valor de $pK_a=3,1$.

Se debe considerar también que la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ del estado π_u tiene una absorptividad molar un 33% mayor que la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ del estado σ_u^* según los espectros simulados. Esta primera banda, además, está superpuesta con la banda de TCLM $N_{His} \rightarrow Cu$ del espectro σ_u^* , cuya absorptividad molar es un 32% menor que la TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ en el espectro de M160Q, que casi no tiene contribución del estado π_u (ver detalles en la sección 3.2.1). Con estas consideraciones, el valor de P_{π_u} se puede estimar en términos de dos valores de absorbancia como:

$$P_{\pi_u} = \frac{1,33 \times (A_{357nm} - 0,32 \times A_{540nm})}{A_{540nm} + 1,33 \times (A_{357nm} - 0,32 \times A_{540nm})} \quad (13)$$

donde A_{357nm} es la absorbancia a 357 nm (el máximo de la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ del estado π_u) y A_{540nm} es la absorbancia a 540 nm (el máximo de la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ del estado σ_u^*). Comparando las poblaciones obtenidas a partir de los espectros UV-Vis y la ecuación (13) con las calculadas mediante la ecuación (12) empleando los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ determinados por RMN (ver detalle en las secciones 3.2.1 y 3.2.2), se

puede constatar que la ecuación (13) permite realizar estimaciones semicuantitativas aceptables, lo que pone de manifiesto la consistencia de la línea argumental (figura 4-32).

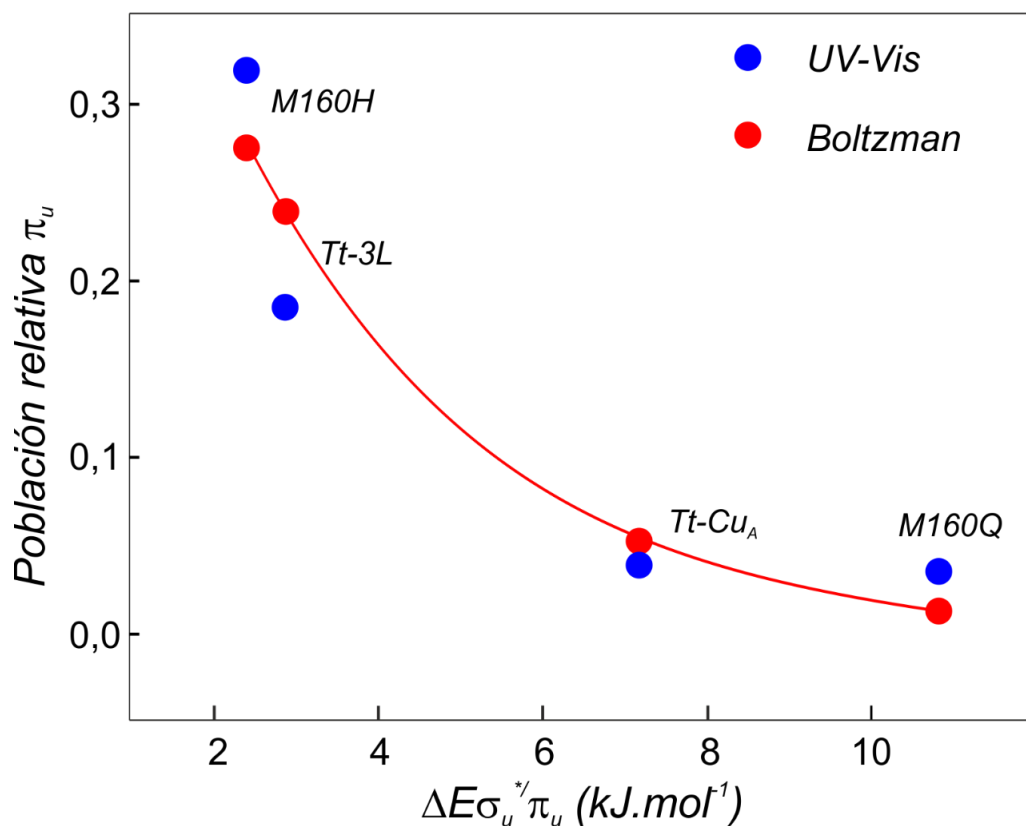


Figura 4-32. P_{π_u} calculada con la ecuación (14) (azul) y la ecuación (13) (rojo) empleando los valores de A_{540nm} y A_{357nm} (de los espectros UV-Vis) y los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (de las medidas RMN) respectivamente.

Según la ley de Boltzman, expresada en la ecuación (12), la disminución de la temperatura provoca un aumento en la población relativa del estado fundamental σ_u^* sin alterar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Lo mismo debería ocurrir como consecuencia de aumentar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ lo cual, según los resultados hasta aquí presentados, ocurre en M160H a pH ácido (figura 4-30). Se midió entonces el espectro UV-Vis de M160H a 25 °C y pH 7, luego el espectro de la misma muestra tras una disminución de 20 °C, y finalmente un tercer espectro tras la restauración de la temperatura inicial y la acidificación del medio hasta pH 2,2 (figura 4-33). Los resultados corroboran el comportamiento esperado, ya que la disminución tanto del pH como de la temperatura generan los cambios espectroscópicos indicativos de un aumento de la población relativa del estado σ_u^* .

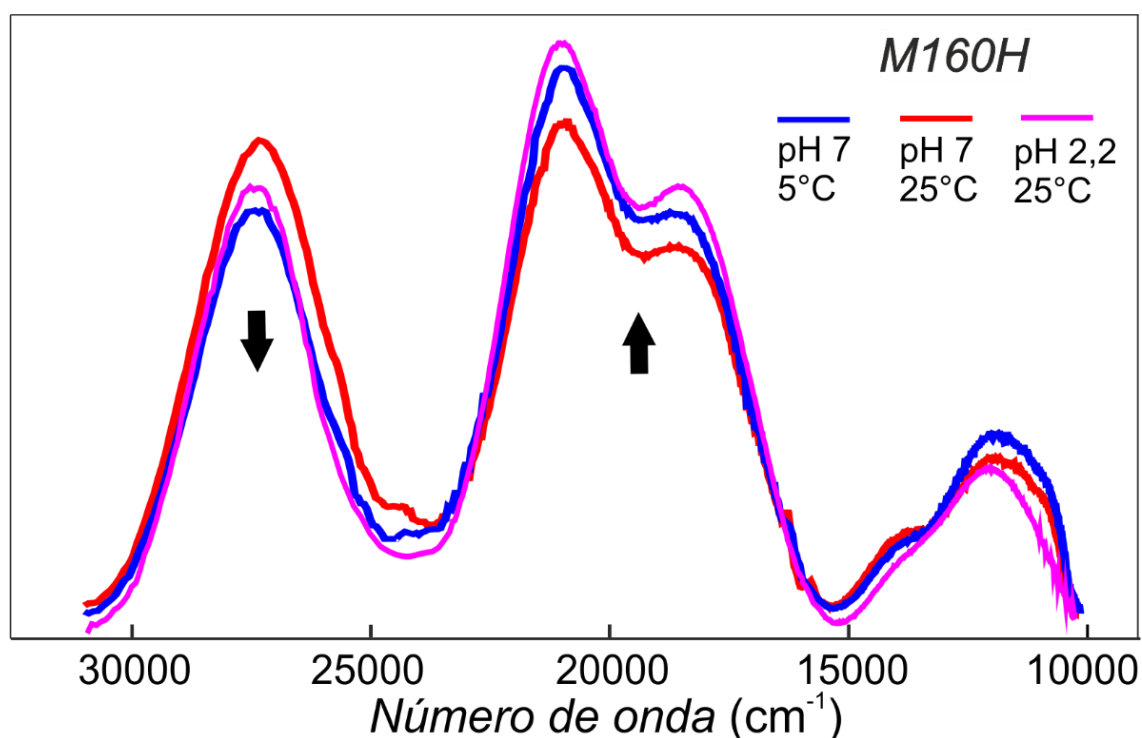


Figura 4-33. Espectros UV-Vis de M160H a pH 7 y 25 °C (rojo), a pH 7 y 5 °C (azul) y a pH 2,2 y 25 °C (rosa) normalizado. La disminución de la temperatura y del pH presentan perturbaciones análogas. Las flechas destacan los principales cambios de intensidades.

Con el objeto de constatar experimentalmente el cambio dependiente del pH en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ se estudió la dependencia del espectro de absorción UV-Vis de M160H con la temperatura a pH 2,6 y a pH 7, es decir, a cada lado de la transición observada espectroscópicamente y caracterizada en la figura 4-31 (figura 4-34). Como es esperable (según la ley de Boltzman), se observa un aumento poblacional del estado π_u con la temperatura para los dos valores de pH, pero este aumento no es de igual magnitud en ambos casos. La muestra medida a pH 2,6 exhibe una variación visiblemente menor que aquella medida a pH 7 ante los mismos cambios de temperatura, indicando un mayor valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Cabe destacar que en ambos casos se constató la reversibilidad térmica de los cambios observados, descartando que se produjera una degradación significativa de la muestra.

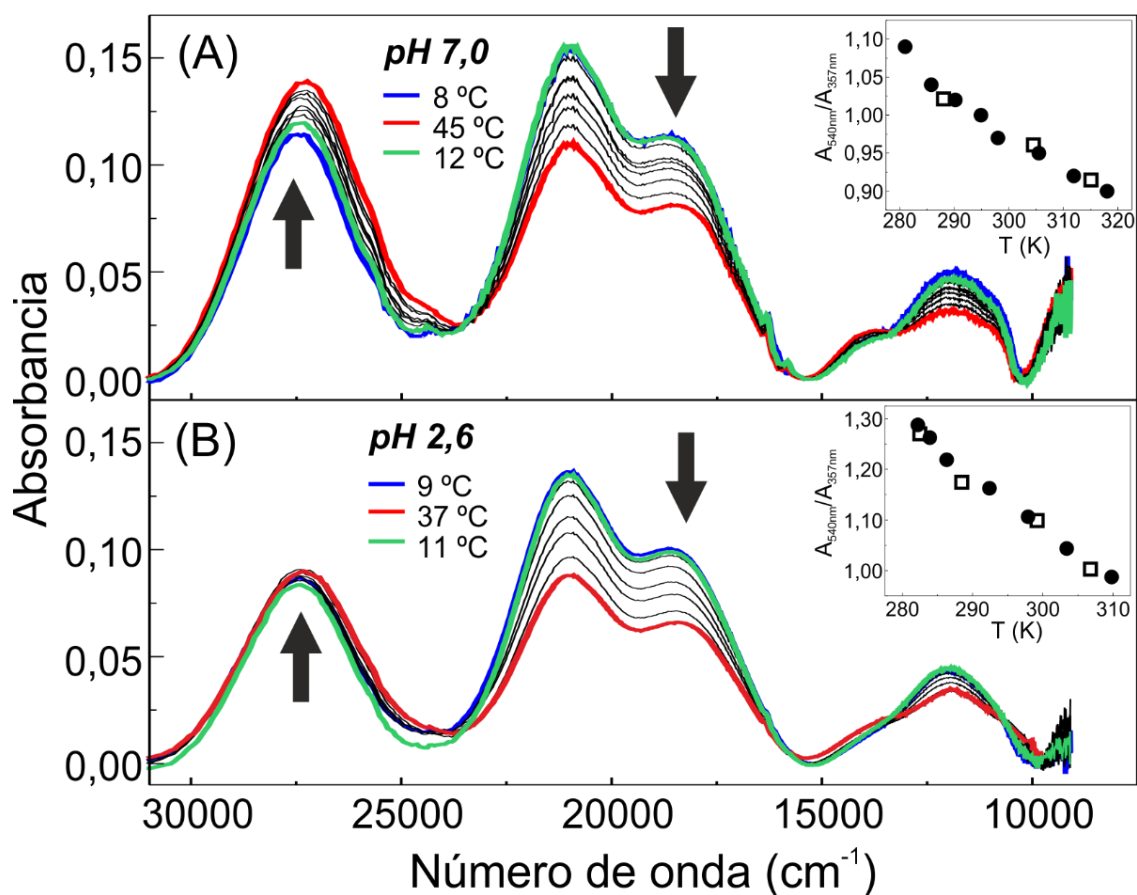


Figura 4-34. Espectros UV-Vis de M160H a (A) pH 7 y (B) pH 2,6 en función de la temperatura. Los espectros se obtuvieron partiendo de bajas temperaturas (azul) y, tras alcanzar el valor máximo (rojo), volviendo a enfriar (verde) para corroborar la reversibilidad del proceso, descartando así un proceso de desnaturalización. Las flechas señalan los principales cambios que se producen con el incremento de la temperatura. Los insets muestran la dependencia del cociente entre el máximo de absorbancia de las bandas de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ de los estados σ_u^* (A_{540nm}) y π_u (A_{357nm}) con la temperatura calentando la muestra (círculos llenos) y luego enfriándola (cuadrados vacíos).

A partir de estos resultados se calcularon las poblaciones relativas de los estados π_u y σ_u^* a cada temperatura, utilizando la ecuación (13). Se analizó la dependencia de estas poblaciones relativas con la temperatura según la ley de Boltzman, estimando de manera semicuantitativa el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de M160H en ambos pH (figura 4-35). Los resultados muestran un aumento del 25% en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ a pH 2,6 (125 cm^{-1}) respecto de lo registrado a pH 7 (100 cm^{-1}), corroborando que el pH modula este parámetro. Es importante señalar que el valor calculado por este método a pH 7 (100 cm^{-1}) difiere significativamente del que fue determinado mediante RMN a igual pH (200 cm^{-1}), lo cual es razonable teniendo en cuenta las diferencias metodológicas y más errores asociados. El aquí empleado es un método semicuantitativo que parte de asunciones que le quitan precisión, como tomar los coeficientes de extinción molar de

los espectros simulados (que suelen ser inexactos), o asumir que la banda de TCLM $N_{\text{His}} \rightarrow \text{Cu}$ del espectro σ_u^* es igual para M160H que para M160Q y en todo el rango de pH. Por su parte, las determinaciones realizadas por RMN paramagnético requieren ajustes que implican también una fuente de error importante, pero aun así se pueden considerar valores más confiables ^{59,122}. Amén de esto, los datos estimados en la figura 4-35 permiten un análisis comparativo entre ambos valores de pH de M160H, y la magnitud de la diferencia que presentan (25%) es significativa, lo cual responde a un cambio en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ con el pH.

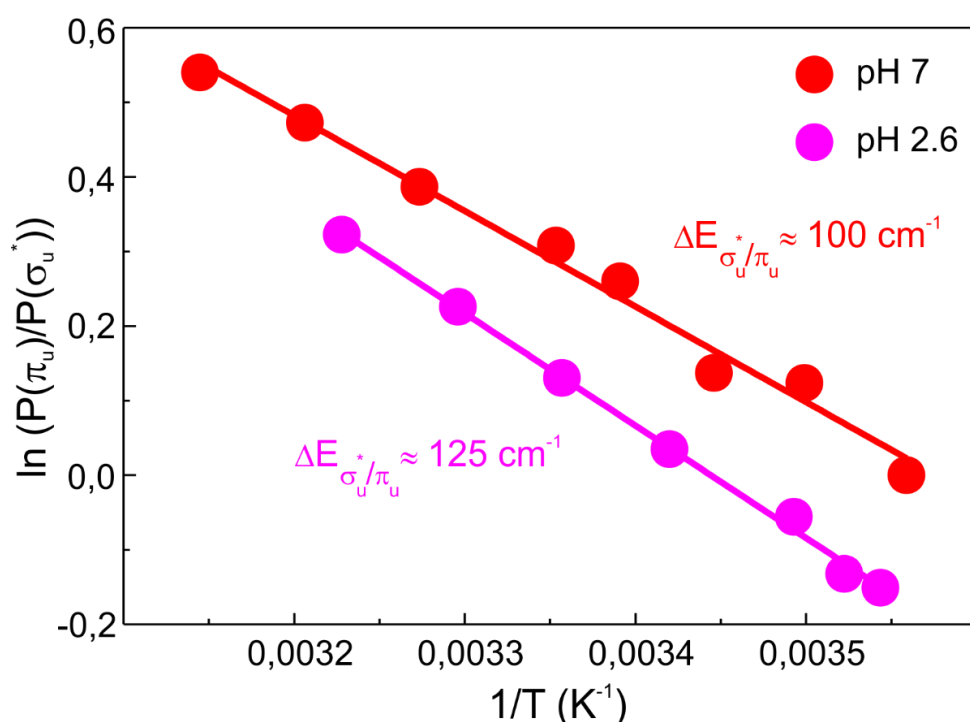


Figura 4-35. $\ln(P_{\pi_u}/P_{\sigma_u^*})$ en función de la inversa de la temperatura. P_{π_u} y $P_{\sigma_u^*}$ fueron calculados empleando la ecuación (14) a partir de los espectros UV-Vis de la figura 4-34 A (rojo) y 4-32 B (rosa). Las pendientes de los ajustes lineales constituyen una estimación del valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ a ambos pH, observándose un aumento del 25% a pH ácido.

Como fue desarrollado en capítulos anteriores, medidas de RMN paramagnético permiten cuantificar cambios poblacionales entre ambos estados fundamentales a partir del comportamiento anti Curie de desplazamientos químicos (δ) sensibles a ellos (ver detalles en las secciones 2.4.2 y 3.2.1). Pero los experimentos necesarios para tal cuantificación requieren tiempos largos de adquisición y muestras muy concentradas, condiciones incompatibles con los valores extremos de pH en los cuales ocurre la transición observada. No obstante, es posible estimar cualitativamente el cambio poblacional de los estados fundamentales a partir del corrimiento desplazamiento

químico de los protones β cisteínicos en los espectros ^1H RMN. Esta estrategia involucra la adquisición de un solo espectro para cada valor de pH, haciendo posible la medida en las condiciones que requiere la técnica. Así, se adquirieron espectros protónicos de M160H en función de la temperatura (a pH 6) y en función del pH (a 25 °C), monitoreando especialmente las señales correspondientes a los protones β cisteínicos (figura 4-36). Los resultados muestran que dichos desplazamientos químicos sufren los mismos corrimientos ante la disminución tanto de la temperatura como del pH, que son indicativos de un aumento de la población relativa del estado fundamental σ_u^* . El efecto de disminuir la temperatura responde a la ley de Boltzman, mientras que el efecto de la disminución del pH es compatible con un aumento en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Si bien esta estrategia experimental no permite cuantificar el cambio en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ o de la población relativa del estado fundamental σ_u^* (dado el carácter cualitativo de sus resultados), aporta evidencia consistente con la hipótesis planteada a partir de los resultados espectroscópicos desarrollados a lo largo de esta sección. Cabe señalar que la idea de este experimento y su resultado son análogos al presentado en la figura 4-33, donde la respuesta UV-Vis al enfriamiento y a la acidificación del medio resultan prácticamente iguales.

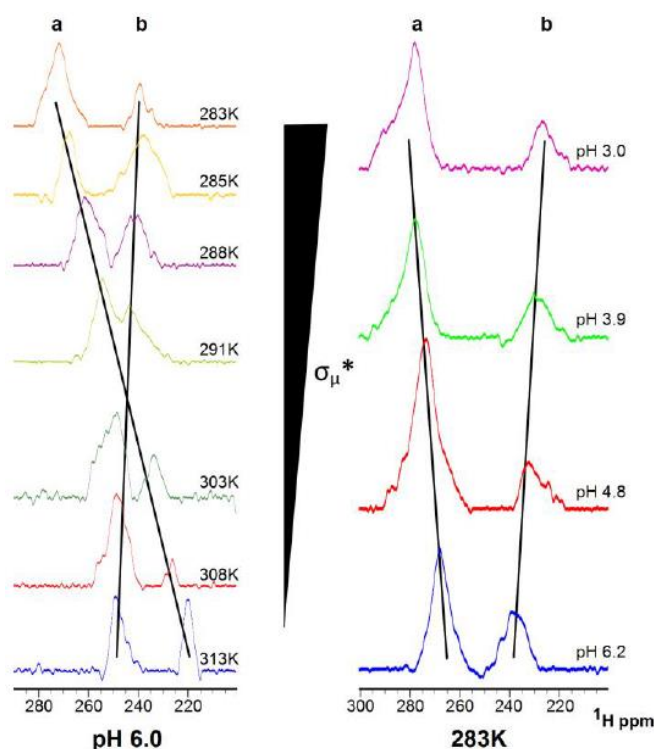


Figura 4-36. Medidas de ^1H RMN paramagnético de M160H en función de la temperatura (izquierda) y el pH (derecha). Se muestra el δ de los protones cisteínicos C153H β' (a y b), que muestran el mismo comportamiento ante la disminución de la temperatura y del pH, indicativo en ambos casos del aumento en la población del estado σ_u^* .

En resumen, los resultados electroquímicos muestran una transición dependiente del pH en los parámetros cinéticos de M160H, que consiste en una fuerte caída tanto de la k_{TE} y como del valor de λ para M160H cuando se acidifica el medio (figuras 4-21 y 4-22). Esta disminución de ambos parámetros cinéticos resulta *a priori* anti-intuitiva a la luz de la teoría de Marcus, aunque son consistentes con un *switch* funcional entre ambos estados fundamentales alternativos (ver sección anterior). Por su parte, los resultados de las medidas EPR y la ausencia de transiciones abruptas en el valor del E^0 permiten descartar una pérdida del carácter de VM (figuras 4-20 y 4-25, y tabla 4-6), mientras que los espectros RR sugieren que el estado fundamental σ_u^* mantiene prácticamente inalterada su descripción electrónica^{54,55} (figura 4-27). Esta última evidencia revela además una transición en la banda ν_2 de los espectros de Tt-Cu_A, M160Q y M160H (figura 4-26 y 4-28), consistente con un cambio en el entorno del ligando H157, previamente reportado a partir de resultados RMN⁵⁸ (figura 4-29). Sin embargo, la única variante que además presenta cambios dependientes de pH en su espectro UV-Vis (con el mismo pKa) es M160H, y estos cambios son compatibles con una modulación de la población relativa de ambos estados alternativos fundamentales (figuras 4-30 y 4-31). La comparación del efecto de la temperatura y del pH tanto mediante espectroscopia UV-Vis como RMN paramagnético corrobora un aumento de la población relativa del estado σ_u^* a pH ácido (figuras 4-33 y 4-36), consistente con un aumento en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (figuras 4-34 y 4-35). De acuerdo con los resultados electroquímicos de M160H, este cambio del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ resultaría suficiente para que a valores neutros de pH (donde se registra $\lambda = 0,6$ eV) sea π_u el estado redox activo, mientras que a valores de pH ácido (donde se registra $\lambda = 0,3$ eV) resulte σ_u^* el estado redox activo. Esta breve recapitulación recorre los resultados espectroscópicos y electroquímicos de esta sección y la anterior en términos del *switch* funcional dependiente del pH de la variante M160H. No obstante, algunos aspectos específicos de los resultados demandan una discusión más pormenorizada en términos de la hipótesis planteada.

En primer lugar, la modulación en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de M160H parece ser consecuencia del cambio en el entorno de la histidina 157 a pH ácido, según indican los resultados de RMN y RR⁵⁸. Sin embargo, estos mismos resultados indican que tal cambio también se observa en Tt-Cu_A y M160Q, variantes que no presentan cambios poblacionales pH-dependientes en sus espectros UV-Vis. Esta aparente inconsistencia no es tal, dado que el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de ambas variantes a pH 7 (600 cm⁻¹ y 900 cm⁻¹ respectivamente) es mucho mayor que el de M160H (200 cm⁻¹), lo cual implica una población relativa muy alta del estado σ_u^* (95% y 99% para Tt-Cu_A y M160Q respectivamente). Por esta razón, un aumento del 25% en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, tomando como referencia la estimación a partir de los espectros UV-Vis de M160H (figuras 4-34 y 4-35), generaría cambios indetectables en la población relativa de ambos estados, ya que serían menores al 2% según la ley de Boltzman. Tal aumento en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de M160H representa un cambio porcentual de casi el triple en la población relativa de

ambos estados fundamentales alternativos, lo cual sí resulta espectroscópicamente detectable. En otras palabras, el pH podría estar ejerciendo cualitativamente el mismo efecto sobre Tt-Cu_A y M160Q que el que ejerce sobre M160H, a saber, aumentar el valor de su $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ en al menos un 25%, pero en ambos casos el cambio estaría por debajo del límite de detección.

En segundo lugar, los resultados obtenidos a partir de la mutante Tt-3L podrían parecer a primera vista contradictorios con el argumento esgrimido en el párrafo anterior. Aun cuando el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de Tt-3L y de M160H son muy similares (240 cm⁻¹ y 200 cm⁻¹ respectivamente), no se detecta ningún cambio dependiente de pH en la población relativa de los estados alternativos de Tt-3L. No obstante, la comparación de los resultados tanto espectroscópicos como electroquímicos de Tt-3L con las otras tres variantes permiten entender tal discrepancia. Esta mutante no sólo no presenta cambios con el pH en su espectro UV-Vis, sino tampoco en su espectro RR ni en los parámetros cinéticos de la reacción de TE, lo cual marca una clara diferencia respecto de las demás variantes. La sensibilidad al pH está vinculada con el cambio en el entorno del ligando H157 y, como ya fue discutido, Tt-3L presenta un entorno modificado para este ligando. Los experimentos SPR sugieren que, en estado adsorbido, Tt-Cu_A y las mutantes puntuales sufren una reorientación pH dependiente que modifica el acoplamiento electrónico con el electrodo, repercutiendo en el valor de la k_{TE} . Si bien los experimentos SPR no fueron hechos sobre Tt-3L, el hecho de que el valor de su k_{TE} resulte también independiente del pH sugiere que tal reorientación no tiene lugar, lo cual es consistente con la insensibilidad al pH de la región superficial cercana al ligando H157, involucrada tanto en la adsorción al electrodo de trabajo como en la modulación del valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Es decir que Tt-3L, como consecuencia de las mutaciones que la constituyen, responde de diferente manera a la disminución del pH y en particular, carece de los fenómenos dependientes del pH (reorientación y modulación del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$) presentes en variantes con superficies nativas.

En tercer lugar, si bien tanto la evidencia espectroscópica como electroquímica es consistente con un equilibrio ácido-base que modula el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (y en consecuencia la relación poblacional σ_u^*/π_u) en M160H, existe una evidente discrepancia en los valores de pK_a aparente (pK_{aA}) de las transiciones en las distintas condiciones experimentales. A partir de las muestras en estado adsorbido se registró una transición en los parámetros cinéticos de la reacción de TE con un pK_{aA} alrededor de 5, mientras que los cambios observados sobre especies en solución mediante las distintas técnicas espectroscópicas (UV-Vis, RR, RMN) presentan valores de pK_{aA} ligeramente superiores a 3. Esta diferencia de casi 2 unidades de pK_{aA} podría racionalizarse en términos de las diferencias que existen entre el seno de la solución y la interfaz electroquímica tanto para el pH local como para la constante dieléctrica y la accesibilidad al solvente de los aminoácidos relevantes^{30,111}.

Se decidió abordar experimentalmente la hipótesis de que la discrepancia del valor de pK_{aA} es consecuencia directa de las diferencias entre el seno de la solución y la interfaz electroquímica. Las diferencias mencionadas entre ambos contextos experimentales deberían afectar no sólo el pK_{aA} de la transición discutida, sino otras propiedades dependientes del pH, como por ejemplo el valor aparente del punto isoelectrico (PI) de la proteína. Si la hipótesis planteada es correcta, las muestras proteicas arrojarán en estado adsorbido un valor de PI superior al medido en solución, dado que responderán a un pH local más bajo. Para constatar esta predicción se determinó la carga total de la proteína (q) a distintos valores de pH, estimando así el PI, y comparándolo con el valor reportado para Tt-Cu_A en solución. El diseño experimental consiste en la medición del valor de E^0 sobre las muestras adsorbidas en función de la fuerza iónica del medio y estimar q empleando el ajuste de Debye-Hückel extendido de la ecuación (4), como fue descripto en la sección 4.2.2 (figura 4-37). Se realizaron estas medidas sobre Tt-Cu_A y M160H en estado adsorbido y a 4 valores distintos de pH (4,6; 6; 7 y 8), estimándose un valor de PI de aproximadamente 7 en ambos casos (figura 4-38). Este resultado implica una diferencia de aproximadamente una unidad respecto al valor reportado previamente para Tt-Cu_A en solución (PI=6), consistente un pH local más ácido en la interfaz electroquímica ¹¹⁶. Así, el corrimiento del pK_{aA} de las muestras adsorbidas hacia valores superiores sería consecuencia (al menos en parte) del pH local, que también estaría corrido hacia valores superiores.

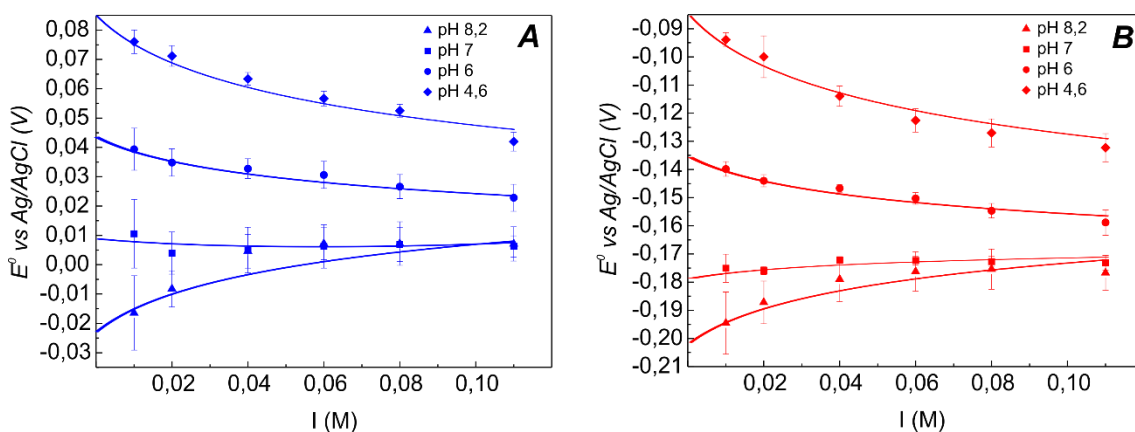


Figura 4-37. E^0 vs I para Tt-Cu_A (A) y M160H (B). Las curvas resultan del ajuste de la ecuación (4) para estimar la carga de las proteínas en estado adsorbido a valores de pH 8,2 (triángulos); 7 (cuadrados); 6 (círculos) y 4,6 (rombos).

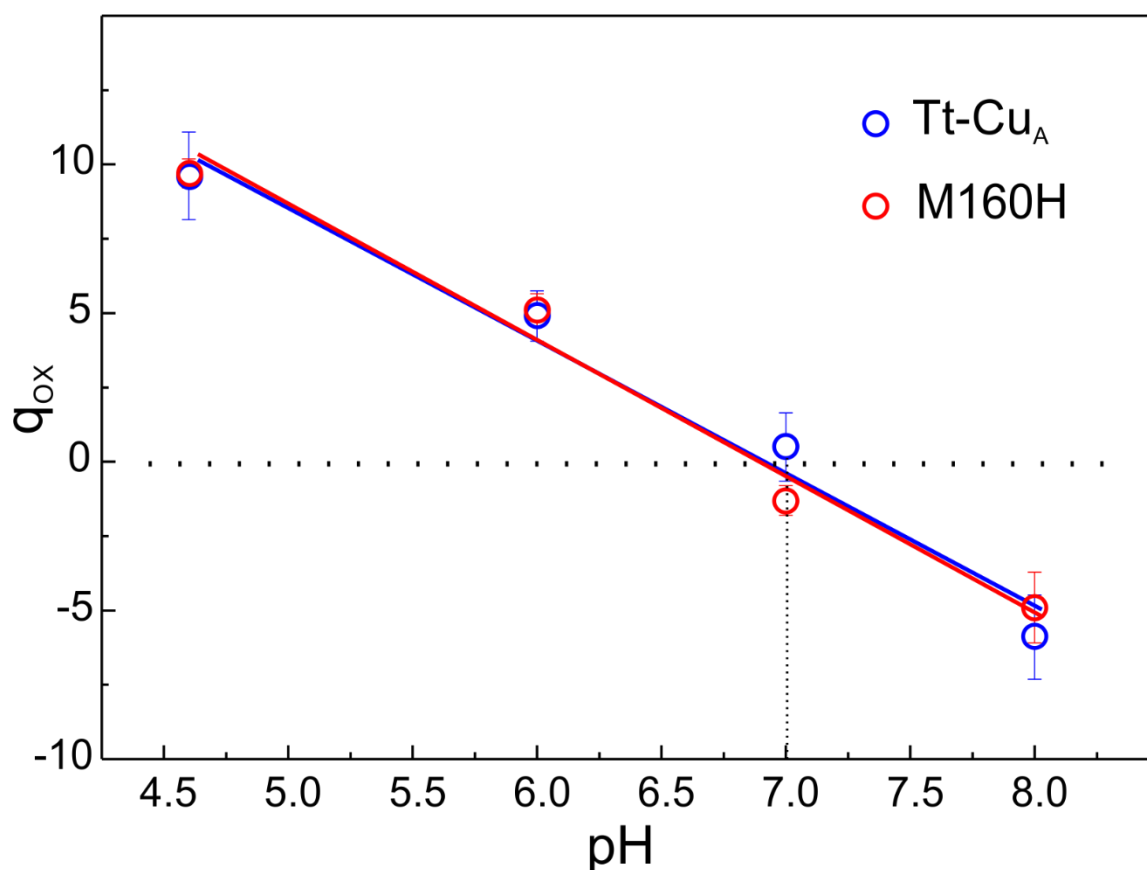


Figura 4-38. Valores de q para Tt-Cu_A (azul) y M160H (rojo) en estado oxidado, estimados a partir de los ajustes de la figura 4-37. Los ajustes lineales permiten estimar el valor de PI=7; un punto por encima del reportado para Tt-Cu_A en solución ¹¹⁶.

El desplazamiento del valor del PI de Tt-Cu_A tras la adsorción sobre el electrodo se produce en el mismo sentido que el del pK_{aA} (esto es, hacia valores más altos), aunque la magnitud de este corrimiento no es idéntica. Mientras el pK_{aA} de la transición observada aumenta casi dos puntos tras la adsorción (desde 3,1-3,5 hasta 5), el PI aumenta en una unidad (de 6 a 7). Esta diferencia sugiere que el cambio de accesibilidad de residuos relevantes para la transición observada podría estar afectando también el valor del pK_{aA}. Por otra parte, nada indica que el efecto de la superficie del electrodo en términos del pH local deba ser el mismo para cualquier valor de pH en el seno de la solución, de manera que, si este (por ejemplo) se acentuara en medio ácido, podría estar incidiendo en las magnitudes de los corrimientos. En suma, este resultado es un indicador del cambio que representa la adsorción a una superficie biocompatible en términos de pH “efectivo”. Según esta interpretación, para el caso particular de Tt-Cu_A y del tipo de electrodo empleado, la proteína estaría censando en estado adsorbido un pH menor que el que censa en solución (que es el pH medido convencionalmente), lo cual conciliaría la información obtenida en ambas condiciones experimentales con las distintas técnicas empleadas.

4.3- Conclusiones

A lo largo de este segundo capítulo experimental se han presentado principalmente resultados electroquímicos de Tt-Cu_A y las distintas variantes mutagénicas (presentadas en el capítulo anterior) adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados. Como ya fue comentado en el capítulo 1, los electrodos utilizados emulan algunas de las propiedades de las membranas biológicas, confiriendo cierto grado de biomimetismo a las condiciones experimentales. En este contexto, se estudió el efecto de distintas variables sobre el valor de E^0 , uno de los parámetros redox más relevantes. Los resultados indican que este parámetro es sensible a cambios en la composición del medio exhibiendo, por un lado, una modulación de 80 mV para valores de fuerza iónica entre 10 y 200 mM (ver figura 4-10), y por otro, una modulación de 100 mV para valores de pH entre 3 y 10 (ver figura 4-20). Si bien no es esperable que el entorno fisiológico del sitio de Cu_A presente cambios tan grandes en la fuerza iónica o en el pH, estas variaciones evidencian la sensibilidad del valor de E^0 a cambios en su atmósfera iónica, lo cual puede variar fuertemente *in vivo* con el contacto proteína-proteína. La interacción entre la subunidad de Cu_A de la CcO y el Cyt *c* (*partner* biológico) probablemente genere cambios en este sentido, y la proximidad de la región de interacción interproteica con el sitio de Cu_A sugiere que el impacto podría ser muy significativo. Este se reflejaría en una modulación del valor de E^0 y en consecuencia (según la teoría de Marcus) en la velocidad de la reacción de TE, razón por la cual esta sensibilidad del valor del E^0 del sitio de Cu_A podría ser un punto de control en la regulación del proceso de TE *in vivo*.

Esta conclusión, lejos de ser aplicable exclusivamente al caso particular de Tt-Cu_A, podría ser extensible a muchos sistemas proteicos con características comunes. Existen distintos trabajos sobre complejos de diversas cupredoxinas (generalmente proteínas azules de cobre) con sus *partners* biológicos, donde se observa una fuerte modulación del valor del E^0 tras la formación del complejo transiente^{12,13,123}. Por otra parte, como fue comentado en la sección introductoria, resultados previos en nuestro laboratorio señalan la importancia de pequeñas distorsiones en la geometría del sitio de Cu_A, especialmente en términos del espaciado energético entre los dos estados fundamentales alternativos⁶² (figura-4-6). Esto significa que la interacción proteína-proteína puede tener un rol fundamental en la regulación no sólo del valor de E^0 , sino también en la población del estado fundamental, lo cual tiene implicancias directas sobre otros parámetros de la reacción de TE, como el acoplamiento electrónico y la energía de reorganización (λ).

Como ha sido desarrollado en la sección introductoria de este capítulo, estudios previos en nuestro laboratorio sugieren que el sitio de Cu_A *in vivo* sería capaz de alternar entre ambos estados fundamentales para la reacción de TE. Según esta hipótesis, cada uno de ellos estaría optimizado para la entrada o para la salida del electrón, haciendo de este *switch* un mecanismo que no sólo permite la regulación del proceso en el

contexto fisiológico, sino también la direccionalidad de la velocidad de TE, conciliando una alta velocidad y una baja fuerza impulsora simultáneamente, previniéndose el proceso inverso de TE ⁶² (figura 4-6). Los estudios electroquímicos y espectroscópicos sobre la transición observada en el valor de k_{TE} de la mutante puntual M160H indicarían que es producto de un *switch* funcional entre ambos estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u . Este fenómeno convierte a M160H en el primer caso conocido de un modelo proteico que permite estudiar dos estados redox activos distintos en el mismo sitio activo. El cambio de estado redox activo (de π_u a σ_u^* hacia pH ácido) se refleja en un aumento del valor de λ , como había sido predicho en trabajos previos para el estado π_u , pero también en una sobrecompensación del término $|H_{DA}|$, ya que el valor de k_{TE} aumenta a pesar del alto λ . Esta sería una prueba directa del enorme impacto que puede tener sobre los parámetros cinéticos de la reacción de TE el intercambio entre ambos estados fundamentales alternativos. Además, confirma que ambos estados pueden ser funcionales en la misma proteína, y que su eficiencia resulta comparable a pesar de la significativa diferencia en el valor de λ .

La evidencia espectroscópica sugiere que este *switch* funcional está asociado a un cambio en el entorno de la histidina 157 (ligando de primera esfera), que aumenta su velocidad de intercambio protónico con el solvente a pH ácido, modificando la energía de un modo normal que involucra la vibración Cu-Cu. Esta perturbación menor alteraría el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ lo suficiente como para hacer del estado σ_u^* el RAMO a pH ácido, siendo el estado π_u el RAMO a pH neutro (figura 4-16). El hecho de que la mutante Tt-3L, de similar valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ que M160H a pH neutro, no presente transición en su valor de k_{TE} y tampoco muestre los cambios espectroscópicos asociados a la histidina 157, es consistente con la interpretación de los resultados. Las mutaciones de segunda esfera en Tt-3L estarían aboliendo la sensibilidad al pH de la histidina 157, eliminando así tanto el corrimiento detectado por RR (figura 4-28) como la transición en los parámetros cinéticos de la reacción de TE (figura 4-21).

Si bien no existe en la naturaleza ningún sitio de Cu_A con la coordinación que presenta M160H (la primera esfera de coordinación está absolutamente conservada en la naturaleza), esta mutante permite explorar ambos estados redox en el mismo sitio, y permite además probar que perturbaciones menores sobre este pueden actuar de interruptor entre ambos estados fundamentales alternativos. La ausencia de *switch* funcional en Tt- Cu_A sería entonces consecuencia del elevado valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, que hace insuficiente la perturbación producida por el cambio de pH para generar el cambio de estado activo. Sin embargo, el conjunto de las condiciones fisiológicas como el *crowding* molecular, las tensiones de la matriz proteica que impone el resto de la CcO o la interacción proteína-proteína con el Cyt c (entre otras) podrían ser suficientes para que se produzca tal efecto. En este sentido, es muy interesante el trabajo de Muresanu y colaboradores sobre el complejo transiente Cyt c_{552} -Tt- Cu_A , en el cual se realizaron experimentos de RMN bidimensional [¹⁵N,¹H] TROSY y se estudió el grado de perturba-

ción de la formación del complejo sobre los distintos aminoácidos de Tt-Cu_A ¹⁴. Sus resultados muestran que, si bien las perturbaciones generadas por la formación del complejo son leves, uno de los aminoácidos más afectados es justamente la histidina 157. Sería posible que esta perturbación generada por la formación del complejo transiente (en conjunto con las demás) produzca una modulación del valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ suficiente para cambiar el estado redox activo.

En suma, la formación del complejo transiente entre la subunidad de Cu_A de la CcO y su *partner* biológico tiene la capacidad de alterar los tres parámetros redox que definen la velocidad de la reacción de TE según el marco teórico de Marcus: E^0 , $|H_{DA}|$ y λ . El primero de ellos por los cambios que pueda generar en la atmosfera iónica del sitio de Cu_A, cuyo efecto puede superar los 100 mV, y los otros dos por el *switch* funcional del estado redox activo, cuyo efecto puede alterar a λ en un factor 2 y a $|H_{DA}|$ en casi un orden de magnitud. Modulando los tres parámetros, la reacción de TE puede pasar de estar prácticamente bloqueada (tiempos no compatibles con la vida) a ser muy rápida. Además, el hecho de que la alternancia entre ambos estados fundamentales alternativos también pueda ser modulada, permitiría regular la direccionalidad de la reacción de TE. El hecho de que existan tantos factores capaces de alterar los distintos parámetros, como la fuerza iónica, el pH, el potencial y el campo eléctrico interfaciales, el *crowding* molecular y la interacción proteína-proteína genera la posibilidad de múltiples efectos que actuando simultáneamente regulen finamente cada parámetro de la reacción de TE, y por lo tanto la respiración celular.

4.4- Referencias

- (1) Willner, null; Katz, null. Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2000**, 39 (7), 1180–1218.
- (2) Hammes-Schiffer, S.; Soudackov, A. V. Proton-Coupled Electron Transfer in Solution, Proteins, and Electrochemistry. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112 (45), 14108–14123.
- (3) Eckermann, A. L.; Feld, D. J.; Shaw, J. A.; Meade, T. J. Electrochemistry of Redox-Active Self-Assembled Monolayers. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254 (15–16), 1769–1802.
- (4) Udit, A. K.; Gray, H. B. Electrochemistry of Heme–thiolate Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338 (1), 470–476.
- (5) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. Novel Method for the Investigation of the Electrochemistry of Metalloproteins: Cytochrome *c*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, No. 21, 771b.
- (6) Yeh, P.; Kuwana, T. Reversible electrode reaction of Cytochrome *c*. *Chem. Lett.* **1977**, No. 10, 1145–1148.
- (7) Samanta, D.; Sarkar, A. Immobilization of Bio-Macromolecules on Self-Assembled Monolayers: Methods and Sensor Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (5), 2567.
- (8) Prime, K.; Whitesides, G. Self-Assembled Organic Monolayers: Model Systems for Studying Adsorption of Proteins at Surfaces. *Science* **1991**, 252 (5009), 1164–1167.
- (9) Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Recent Advances in Self-Assembled Monolayers Based Biomolecular Electronic Devices. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24 (9), 2810–2817.
- (10) Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4366–4469.
- (11) Sousa, F. L.; Alves, R. J.; Ribeiro, M. A.; Pereira-Leal, J. B.; Teixeira, M.; Pereira, M. M. The Superfamily of Heme–copper Oxygen Reductases: Types and Evolutionary Considerations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2012**, 1817 (4), 629–637.
- (12) Díaz-Moreno, I.; Díaz-Quintana, A.; Díaz-Moreno, S.; Subías, G.; De la Rosa, M. A. Transient Binding of Plastocyanin to Its Physiological Redox Partners Modifies the Copper Site Geometry. *FEBS Lett.* **2006**, 580 (26), 6187–6194.
- (13) Giudici-Orticoni, M.-T.; Guerlesquin, F.; Bruschi, M.; Nitschke, W. Interaction-Induced Redox Switch in the Electron Transfer Complex Rusticyanin–Cytochrome *c*₄. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (43), 30365–30369.
- (14) Muresanu, L.; Pristovsek, P.; Lohr, F.; Maneg, O.; Mukrasch, M. D.; Ruterjans, H.; Ludwig, B.; Lucke, C. The Electron Transfer Complex between Cytochrome *c*₅₅₂ and the Cu_A Domain of the *Thermus Thermophilus* *ba*₃ Oxidase: A Combined NMR and computational approach. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (20), 14503–14513.
- (15) Zhen, Y.; Hoganson, C. W.; Babcock, G. T.; Ferguson-Miller, S. Definition of the Interaction Domain for Cytochrome *Con* Cytochrome *c* Oxidase: I. Biochemical,

- spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit II of *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome aa_3 . *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (53), 38032–38041.
- (16) Williams, P. A.; Blackburn, N. J.; Sanders, D.; Bellamy, H.; Stura, E. A.; Fee, J. A.; McRee, D. E. The Cu_A Domain of *Thermus Thermophilus* ba_3 -Type Cytochrome c Oxidase at 1.6 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6 (6), 509–516.
 - (17) Millett, F.; Durham, B. Design of Photoactive Ruthenium Complexes To Study Interprotein Electron Transfer. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, 41 (38), 11315–11324.
 - (18) Soulimane, T. Structure and Mechanism of the Aberrant ba_3 -Cytochrome c Oxidase from *Thermus Thermophilus*. *EMBO J.* **2000**, 19 (8), 1766–1776.
 - (19) Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. Mimicking Protein–Protein Electron Transfer: Voltammetry of *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin and the *Thermus Thermophilus* Cu_A Domain at ω -Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (43), 13954–13961.
 - (20) Immoos, C.; Hill, M. G.; Sanders, D.; Fee, J. A.; Slutter, C. E.; Richards, J. H.; Gray, H. B. Electrochemistry of the Cu_A Domain of *Thermus Thermophilus* Cytochrome ba_3 . *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1 (6), 529–531.
 - (21) Roberts, V. A.; Pique, M. E. Definition of the Interaction Domain for Cytochrome Con Cytochrome c Oxidase: III. Prediction of the docked complex by a complete, systematic search. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (53), 38051–38060.
 - (22) Witt, H. Tryptophan 121 of Subunit II Is the Electron Entry Site to Cytochrome-c Oxidase in *Paracoccus Denitrificans*. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (9), 5132–5136.
 - (23) Witt, H.; Malatesta, F.; Nicoletti, F.; Brunori, M.; Ludwig, B. Cytochrome-c-Binding Site on Cytochrome Oxidase in *Paracoccus Denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 251 (1–2), 367–373.
 - (24) Drosou, V.; Malatesta, F.; Ludwig, B. Mutations in the Docking Site for Cytochrome c on the *Paracoccus* Heme aa_3 Oxidase: Electron Entry and Kinetic Phases of the Reaction. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269 (12), 2980–2988.
 - (25) Flöck, D.; Helms, V. Protein-Protein Docking of Electron Transfer Complexes: Cytochrome c Oxidase and Cytochrome c: Docking of Electron Transfer Complexes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2002**, 47 (1), 75–85.
 - (26) Gamelin, D. R.; Randall, D. W.; Hay, M. T.; Houser, R. P.; Mulder, T. C.; Canters, G. W.; de Vries, S.; Tolman, W. B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Spectroscopy of Mixed-Valence Cu_A -Type Centers: Ligand-Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (21), 5246–5263.
 - (27) DeBeer George, S.; Metz, M.; Szilagyi, R. K.; Wang, H.; Cramer, S. P.; Lu, Y.; Tolman, W. B.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. A Quantitative Description of the Ground-State Wave Function of Cu_A by X-Ray Absorption Spectroscopy: Comparison to Plastocyanin and Relevance to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (24), 5757–5767.
 - (28) Wang, K.; Zhen, Y.; Sadoski, R.; Grinnell, S.; Geren, L.; Ferguson-Miller, S.; Durham, B.; Millett, F. Definition of the Interaction Domain for Cytochrome Con Cytochrome c Oxidase: II. Rapid kinetic analysis of electron transfer from

- Cytochrome *c* to *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome oxidase surface mutant. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (53), 38042–38050.
- (29) Chidsey, C. E. D. Free Energy and Temperature Dependence of Electron Transfer at the Metal-Electrolyte Interface. *Science* **1991**, *251* (4996), 919–922.
 - (30) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Heterogeneous Electron Transfer of Cytochrome *c* on Coated Silver Electrodes. Electric Field Effects on Structure and Redox Potential. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (8), 1578–1586.
 - (31) Avila, A.; Gregory, B. W.; Niki, K.; Cotton, T. M. An Electrochemical Approach to Investigate Gated Electron Transfer Using a Physiological Model System: Cytochrome *c* Immobilized on Carboxylic Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (12), 2759–2766.
 - (32) Chi, Q.; Zhang, J.; Andersen, J. E. T.; Ulstrup, J. Ordered Assembly and Controlled Electron Transfer of the Blue Copper Protein Azurin at Gold (111) Single-Crystal Substrates. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (20), 4669–4679.
 - (33) El Kasmi, A.; Wallace, J. M.; Bowden, E. F.; Binet, S. M.; Linderman, R. J. Controlling Interfacial Electron-Transfer Kinetics of Cytochrome *c* with Mixed Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (1), 225–226.
 - (34) Wei, J.; Liu, H.; Khoshtariya, D. E.; Yamamoto, H.; Dick, A.; Waldeck, D. H. Electron-Transfer Dynamics of Cytochrome *c*: A Change in the Reaction Mechanism with Distance. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (24), 4700–4703.
 - (35) Niki, K.; Hardy, W. R.; Hill, M. G.; Li, H.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E.; Fujita, K.; Tanimura, R.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Richards, J. H.; Gray, H. B. Coupling to Lysine-13 Promotes Electron Tunneling through Carboxylate-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Cytochrome *c*. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (37), 9947–9949.
 - (36) Feng, J.-J.; Murgida, D. H.; Kuhlmann, U.; Utesch, T.; Mrogiński, M. A.; Hildebrandt, P.; Weidinger, I. M. Gated Electron Transfer of Yeast Iso-1 Cytochrome *c* on Self-Assembled Monolayer-Coated Electrodes. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (47), 15202–15211.
 - (37) Davis, K. L.; Waldeck, D. H. Effect of Deuterium Substitution on Electron Transfer at Cytochrome *c* /SAM Interfaces. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (39), 12498–12507.
 - (38) Xu, J.; Bowden, E. F. Determination of the Orientation of Adsorbed Cytochrome *c* on Carboxyalkanethiol Self-Assembled Monolayers by In Situ Differential Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (21), 6813–6822.
 - (39) Yue, H.; Khoshtariya, D.; Waldeck, D. H.; Grochol, J.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. On the Electron Transfer Mechanism Between Cytochrome *c* and Metal Electrodes. Evidence for Dynamic Control at Short Distances. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (40), 19906–19913.
 - (40) Molinas, M. F.; De Candia, A.; Szajnman, S. H.; Rodríguez, J. B.; Martí, M.; Pereira, M.; Teixeira, M.; Todorovic, S.; Murgida, D. H. Electron Transfer Dynamics of *Rhodothermus marinus* *caa3* Cytochrome *c* Domains on Biomimetic Films. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (40), 18088.
 - (41) Zuo, P.; Albrecht, T.; Barker, P. D.; Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Interfacial Redox Processes of Cytochrome *b*₅₆₂. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (34), 7430.

- (42) Kranich, A.; Naumann, H.; Molina-Heredia, F. P.; Moore, H. J.; Lee, T. R.; Lecomte, S.; de la Rosa, M. A.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. Gated Electron Transfer of Cytochrome *c*₆ at Biomimetic Interfaces: A Time-Resolved SERR Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (34), 7390.
- (43) Khoshtariya, D. E.; Wei, J.; Liu, H.; Yue, H.; Waldeck, D. H. Charge-Transfer Mechanism for Cytochrome *c* Adsorbed on Nanometer Thick Films. Distinguishing Frictional Control from Conformational Gating. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (25), 7704–7714.
- (44) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Shushanyan, M.; Davis, K. L.; Waldeck, D. H.; van Eldik, R. Fundamental Signatures of Short- and Long-Range Electron Transfer for the Blue Copper Protein Azurin at Au/SAM Junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (7), 2757–2762.
- (45) Paggi, D. A.; Martín, D. F.; Kranich, A.; Hildebrandt, P.; Martí, M. A.; Murgida, D. H. Computer Simulation and SERR Detection of Cytochrome *c* Dynamics at SAM-Coated Electrodes. *Electrochimica Acta* **2009**, *54* (22), 4963–4970.
- (46) Davidson, V. L. Protein Control of True, Gated, and Coupled Electron Transfer Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (6), 730–738.
- (47) Ly, H. K.; Marti, M. A.; Martin, D. F.; Alvarez-Paggi, D.; Meister, W.; Kranich, A.; Weidinger, I. M.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. Thermal Fluctuations Determine the Electron-Transfer Rates of Cytochrome *c* in Electrostatic and Covalent Complexes. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (6), 1225–1235.
- (48) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Proton-Coupled Electron Transfer of Cytochrome *c*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (17), 4062–4068.
- (49) Kranich, A.; Ly, H. K.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. Direct Observation of the Gating Step in Protein Electron Transfer: Electric-Field-Controlled Protein Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9844–9848.
- (50) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Disentangling Interfacial Redox Processes of Proteins by SERR Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 937.
- (51) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Redox and Redox-Coupled Processes of Heme Proteins and Enzymes at Electrochemical Interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7* (22), 3773.
- (52) Wei, J.; Liu, H.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y.; Waldeck, D. H. Direct Wiring of Cytochrome *c* 'S Heme Unit to an Electrode: Electrochemical Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (32), 9591–9599.
- (53) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Electron-Transfer Processes of Cytochrome *c* at Interfaces. New Insights by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (11), 854–861.
- (54) Xie, X.; Gorelsky, S. I.; Sarangi, R.; Garner, D. K.; Hwang, H. J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Perturbations to the Geometric and Electronic Structure of the Cu_A Site: Factors That Influence Delocalization and Their Contributions to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5194–5205.
- (55) Hwang, H. J.; Lu, Y. pH-Dependent Transition between Delocalized and Trapped Valence States of a Cu_A Center and Its Possible Role in Proton-Coupled Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (35), 12842–12847.

- (56) Hwang, H. J.; Berry, S. M.; Nilges, M. J.; Lu, Y. Axial Methionine Has Much Less Influence on Reduction Potentials in a Cu_A Center than in a Blue Copper Center. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7274–7275.
- (57) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 11884–11885.
- (58) Alvarez-Paggi, D.; Abriata, L. A.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Native Cu(A) Redox Sites Are Largely Resilient to pH Variations within a Physiological Range. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49* (47), 5381–5383.
- (59) Abriata, L. A.; Ledesma, G. N.; Pierattelli, R.; Vila, A. J. Electronic Structure of the Ground and Excited States of the Cu_A Site by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 1939–1946.
- (60) Gorelsky, S. I.; Xie, X.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Solomon, E. I. The Two-State Issue in the Mixed-Valence Binuclear Cu_A Center in Cytochrome c Oxidase and N₂O Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (51), 16452–16453.
- (61) Olsson, M. H. M.; Ryde, U. Geometry, Reduction Potential, and Reorganization Energy of the Binuclear Cu_A Site, Studied by Density Functional Theory. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (32), 7866–7876.
- (62) Abriata, L. A.; Alvarez-Paggi, D.; Ledesma, G. N.; Blackburn, N. J.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Alternative Ground States Enable Pathway Switching in Biological Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (43), 17348–17353.
- (63) Farrar, J. A.; Neese, F.; Lappalainen, P.; Kroneck, P. M. H.; Saraste, M.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. The Electronic Structure of Cu_A: A Novel Mixed-Valence Dinuclear Copper Electron-Transfer Center. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (46), 11501–11514.
- (64) Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. Structure at 2.8 Å Resolution of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus Denitrificans*. *Nature* **1995**, *376* (6542), 660–669.
- (65) Regan, J. J.; Ramirez, B. E.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Malmström, B. G. Pathways for Electron Tunneling in Cytochrome c Oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, *30* (1), 35–39.
- (66) Ramirez, B. E.; Malmstrom, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. The Currents of Life: The Terminal Electron-Transfer Complex of Respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (26), 11949–11951.
- (67) Hunsicker-Wang, L. M.; Pacoma, R. L.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Stout, C. D. A Novel Cryoprotection Scheme for Enhancing the Diffraction of Crystals of Recombinant Cytochrome *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61* (3), 340–343.
- (68) Farver, O.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Pecht, I. Electron Transfer among the Cu_A, Heme *b* and *a*₃ Centers of *Thermus thermophilus* Cytochrome *ba*₃. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (14), 3417–3421.
- (69) Brzezinski, P. Internal Electron-Transfer Reactions in Cytochrome c Oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35* (18), 5611–5615.
- (70) Allen J. Bard; Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*, Second edition.; John Wiley & Sons, INC.: Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin, 2001.

- (71) Honeychurch, M. J. Effect of the Interfacial Potential Distribution on the Measurement of the Rate Constant for Electron Transfer between Electrodes and Redox Adsorbates. *Langmuir* **1998**, *14* (21), 6291–6296.
- (72) Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (9), 702.
- (73) Heinze, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. New Analytical Methods(25). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23* (11), 831–847.
- (74) Chi, Q.; Farver, O.; Ulstrup, J. Long-Range Protein Electron Transfer Observed at the Single-Molecule Level: In Situ Mapping of Redox-Gated Tunneling Resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (45), 16203–16208.
- (75) Leopold, M. C.; Bowden, E. F. Influence of Gold Substrate Topography on the Voltammetry of Cytochrome *c* Adsorbed on Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18* (6), 2239–2245.
- (76) Millo, D.; Bonifacio, A.; Ranieri, A.; Borsari, M.; Gooijer, C.; van der Zwan, G. Voltammetric and Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopic Characterization of Cytochrome *c* Adsorbed on a 4-Mercaptopyridine Monolayer on Silver Electrodes. *Langmuir* **2007**, *23* (8), 4340–4345.
- (77) Armstrong, F. A.; Heering, H. A.; Hirst, J. Reaction of Complex Metalloproteins Studied by Protein-Film Voltammetry. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26* (3), 169.
- (78) Monari, S.; Battistuzzi, G.; Bortolotti, C. A.; Yanagisawa, S.; Sato, K.; Li, C.; Salard, I.; Kostrz, D.; Borsari, M.; Ranieri, A.; Dennison, C.; Sola, M. Understanding the Mechanism of Short-Range Electron Transfer Using an Immobilized Cupredoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (29), 11848–11851.
- (79) Monari, S.; Battistuzzi, G.; Dennison, C.; Borsari, M.; Ranieri, A.; Siwek, M. J.; Sola, M. Factors Affecting the Electron Transfer Properties of an Immobilized Cupredoxin. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (50), 22322–22329.
- (80) Tarlov, M. J.; Bowden, E. F. Electron-Transfer Reaction of Cytochrome *c* Adsorbed on Carboxylic Acid Terminated Alkanethiol Monolayer Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (5), 1847–1849.
- (81) Song, S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; Tarlov, M. J. Characterization of Cytochrome *c*/alkanethiolate Structures Prepared by Self-Assembly on Gold. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (24), 6564–6572.
- (82) Cortese, J. D. Ionic Strength of the Intermembrane Space of Intact Mitochondria as Estimated with Fluorescein-BSA Delivered by Low pH Fusion. *J. Cell Biol.* **1991**, *113* (6), 1331–1340.
- (83) Feldberg, S. W. Surprising Effect of Uncompensated Resistance on the Cyclic Voltammetric Responses for a Reversible Surface-Confined and Uniformly Accessible Redox Couple. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (15), 5851–5856.
- (84) Miller, C.; Cuendet, P.; Graetzel, M. Adsorbed ω -Hydroxy Thiol Monolayers on Gold Electrodes: Evidence for Electron Tunneling to Redox Species in Solution. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (2), 877–886.
- (85) Weast, A.; Beyer. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 1989.
- (86) Wolf, AV. *Aqueous Solutions and Body Fluids, Their Concentrative Properties and Conversion Tables.*; New York, **1966**.
- (87) Laviron, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of Diffusionless Electrochemical Systems. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, *101* (1), 19–28.

- (88) Smith, C. P.; White, H. S. Theory of the Interfacial Potential Distribution and Reversible Voltammetric Response of Electrodes Coated with Electroactive Molecular Films. *Anal. Chem.* **1992**, *64* (20), 2398–2405.
- (89) Honeychurch, M. J. Effect of Electron-Transfer Rate and Reorganization Energy on the Cyclic Voltammetric Response of Redox Adsorbates. *Langmuir* **1999**, *15* (15), 5158–5163.
- (90) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Electrostatic-Field Dependent Activation Energies Modulate Electron Transfer of Cytochrome *c*. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (49), 12814–12819.
- (91) Marcus, R. A.; Sutin, N. Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Bioenerg.* **1985**, *811* (3), 265–322.
- (92) Farid, R. S.; Moser, C. C.; Leslie Dutton, P. Electron Transfer in Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3* (2), 225–233.
- (93) Moser, C. C.; Keske, J. M.; Warncke, K.; Farid, R. S.; Dutton, P. L. Nature of Biological Electron Transfer. *Nature* **1992**, *355* (6363), 796–802.
- (94) Andrew, S. M.; Thomasson, K. A.; Northrup, S. H. Simulation of Electron-Transfer Self-Exchange in Cytochromes *c* and *b₅*. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (13), 5516–5521.
- (95) Dolidze, T. D.; Rondinini, S.; Vertova, A.; Waldeck, D. H.; Khoshtariya, D. E. Impact of Self-Assembly Composition on the Alternate Interfacial Electron Transfer for Electrostatically Immobilized Cytochrome *c*. *Biopolymers* **2007**, *87* (1), 68–73.
- (96) Fedurco, M.; Augustynski, J.; Indiani, C.; Smulevich, G.; Antalík, M.; Bánó, M.; Sedláč, E.; Glascock, M. C.; Dawson, J. H. Electrochemistry of Unfolded Cytochrome *c* in Neutral and Acidic Urea Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7638–7646.
- (97) Gray, H. B.; Winkler, J. R. Electron Tunneling through Proteins. *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36* (3), 341–372.
- (98) Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (24), 6302–6306.
- (99) Jeuken, L. J. C.; McEvoy, J. P.; Armstrong, F. A. Insights into Gated Electron-Transfer Kinetics at the Electrode–Protein Interface: A Square Wave Voltammetry Study of the Blue Copper Protein Azurin. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (9), 2304–2313.
- (100) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P.; Wei, J.; He, Y.-F.; Liu, H.; Waldeck, D. H. Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopic and Electrochemical Study of Cytochrome *c* Bound on Electrodes through Coordination with Pyridinyl-Terminated Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (7), 2261–2269.
- (101) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Tretyakova, T.; Waldeck, D. H.; van Eldik, R. Electron Transfer with Azurin at Au–SAM Junctions in Contact with a Protic Ionic Melt: Impact of Glassy Dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (39), 16515.
- (102) Goguadze, N. G.; Hammerstad-Pedersen, J. M.; Khoshtariya, D. E.; Ulstrup, J. Conformational Dynamics and Solvent Viscosity Effects in Carboxypeptidase-A-

- Catalyzed Benzoylglycylphenyllactate Hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200* (2), 423–429.
- (103) Malmberg, C. G.; Maryott, A. A. Dielectric Constants of Aqueous Solutions of Dextrose and Sucrose. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1950**, *45* (4), 299.
- (104) Fayer, M. D. Fast protein dynamics probed with infrared vibrational Echo experiments. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52* (1), 315–356.
- (105) Frauenfelder, H.; Wolynes, P. G.; Austin, R. H. Biological Physics. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71* (2), S419–S430.
- (106) Gray, H. B.; Malmström, B. G.; Williams, R. J. P. Copper Coordination in Blue Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5* (5), 551–559.
- (107) Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; DeBeer George, S.; Basumallick, L. Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 419–458.
- (108) Dennison, C. Investigating the Structure and Function of Cupredoxins. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (24), 3025–3054.
- (109) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Eicken, C.; Loschi, L.; Sola, M. Redox Chemistry and Acid–Base Equilibria of Mitochondrial Plant Cytochromes *c*. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38* (17), 5553–5562.
- (110) Garner, D. K.; Vaughan, M. D.; Hwang, H. J.; Savelieff, M. G.; Berry, S. M.; Honek, J. F.; Lu, Y. Reduction Potential Tuning of the Blue Copper Center in *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin by the Axial Methionine as Probed by Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15608–15617.
- (111) Rooth, M.; Shaw, A. M. Interfacial pH and Surface pKa of a Thiocytic Acid Self-Assembled Monolayer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (41), 4741.
- (112) Ashur, I.; Schulz, O.; McIntosh, C. L.; Pinkas, I.; Ros, R.; Jones, A. K. Transparent Gold as a Platform for Adsorbed Protein Spectroelectrochemistry: Investigation of Cytochrome *c* and Azurin. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2012**, *28* (13), 5861–5871.
- (113) Marmisollé, W. A.; Capdevila, D. A.; de la Llave, E.; Williams, F. J.; Murgida, D. H. Self-Assembled Monolayers of NH₂-Terminated Thiolates: Order, pKa, and Specific Adsorption. *Langmuir* **2013**, *29* (17), 5351–5359.
- (114) Andrew, C. R.; Lappalainen, P.; Saraste, M.; Hay, M. T.; Lu, Y.; Dennison, C.; Canters, G. W.; Fee, J. A.; Nakamura, N.; Sanders-Loehr, J. Engineered Cupredoxins and Bacterial Cytochrome *c* Oxidases Have Similar Cu_A Sites: Evidence from Resonance Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (43), 10759–10760.
- (115) Andrew, C. R.; Fraczkiewicz, R.; Czernuszewicz, R. S.; Lappalainen, P.; Saraste, M.; Sanders-Loehr, J. Identification and Description of Copper-Thiolate Vibrations in the Dinuclear Cu_A Site of Cytochrome *c* Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (43), 10436–10445.
- (116) Slutter, C. E.; Sanders, D.; Wittung, P.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Fee, J. A. Water-Soluble, Recombinant Cu_A-Domain of the Cytochrome *ba*₃ Subunit II from *Thermus Thermophilus*. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, *35* (11), 3387–3395.
- (117) Kroneck, P. M. H.; Antholine, W. A.; Riester, J.; Zumft, W. G. The Nature of the Cupric Site in Nitrous Oxide Reductase and of Cu_A in Cytochrome *c* Oxidase. *FEBS Lett.* **1989**, *248* (1–2), 212–213.

- (118) Neese, F.; Zumft, W. G.; Antholine, W. E.; Kroneck, P. M. H. The Purple Mixed-Valence Cu_A Center in Nitrous-Oxide Reductase: EPR of the Copper-63-, Copper-65-, and Both Copper-65- and [¹⁵N]Histidine-Enriched Enzyme and a Molecular Orbital Interpretation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (36), 8692–8699.
- (119) Slutter, C. E.; Gromov, I.; Richards, J. H.; Pecht, I.; Goldfarb, D. Mutations of the Weak Axial Ligand in the *Thermus* Cu_A Center Modulates Its Electronic Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (21), 5077–5078.
- (120) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 11884–11885.
- (121) Efremov, E. V.; Ariese, F.; Gooijer, C. Achievements in Resonance Raman Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *606* (2), 119–134.
- (122) Shokhirev, N. V.; Walker, F. A. Analysis of the Temperature Dependence of the ¹H Contact Shifts in Low-Spin Fe(III) Model Hemes and Heme Proteins: Explanation of “Curie” and “Anti-Curie” Behavior within the Same Molecule. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (50), 17795–17804.
- (123) Gray, K. A.; Davidson, V. L.; Knaff, D. B. Complex Formation between Methylamine Dehydrogenase and Amicyanin from *Paracoccus Denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (28), 13987–13990.

Estudio de la transferencia electrónica en centros T1 novedosos

Estudio de la transferencia electrónica en centros T1 novedosos

5.1- Introducción

El cobre es el segundo metal de transición más abundante en los sistemas biológicos, siendo el hierro el que ostenta el primer lugar ¹. Son numerosos y variados los sitios activos que se conforman a partir de estos átomos metálicos en la naturaleza, y la clasificación más común se plantea en función de las características generales de su coordinación, como ya ha sido presentado en la sección 1.2.1. Los sitios de cobre cumplen una gran cantidad de funciones fisiológicas, a partir de lo cual se pueden discriminar dos grandes grupos: los sitios que presentan actividad catalítica y aquellos que no la tienen, cumpliendo estrictamente un rol de intermediario en el transporte electrónico. El último es el que agrupa a los dos sitios de cobre protagonistas de esta tesis: los sitios de Cu_A, a los cuales se dedican íntegramente los capítulos 3 y 4, y los sitios Tipo 1 (T1), que se estudian en este capítulo. Aunque la terminología T1 refiera estrictamente a ciertos sitios de cobre, de aquí en más se llamarán también proteínas T1 a aquellas proteínas que contienen tales sitios.

5.1.1- Las proteínas azules de cobre

Los sitios de cobre T1 se encuentran mayoritariamente en las denominadas proteínas azules de cobre, que deben su nombre al típico color azul fuerte que exhiben. De los seis reinos biológicos de la clasificación tradicional, se las ha encontrado únicamente en tres, a saber, los reinos *Bacteria*, *Archea* y *Plantae*, y a pesar de que la variabilidad de secuencia entre las distintas proteínas T1 conocidas es mayor al 80%, presentan una estructura general de la matriz proteica conservada evolutivamente ² (figura 5-1). Este tipo de plegamiento (compartido con los sitios de Cu_A y algunas otras metaloproteínas) consiste básicamente en un barril- β formado por ocho laminas- β y una o dos hélices- α en la región superficial de la proteína, y se denomina plegamiento cupredoxina ³⁻⁵ (ver detalles en la sección 1.2.1). A lo largo de las últimas tres décadas (al menos) muchos estudios se han enfocado en entender la relación entre el plegamiento cupredoxina y la optimización de la transferencia electrónica (TE) que muestran las proteínas que lo presentan ^{3,6-13} (ver más adelante).

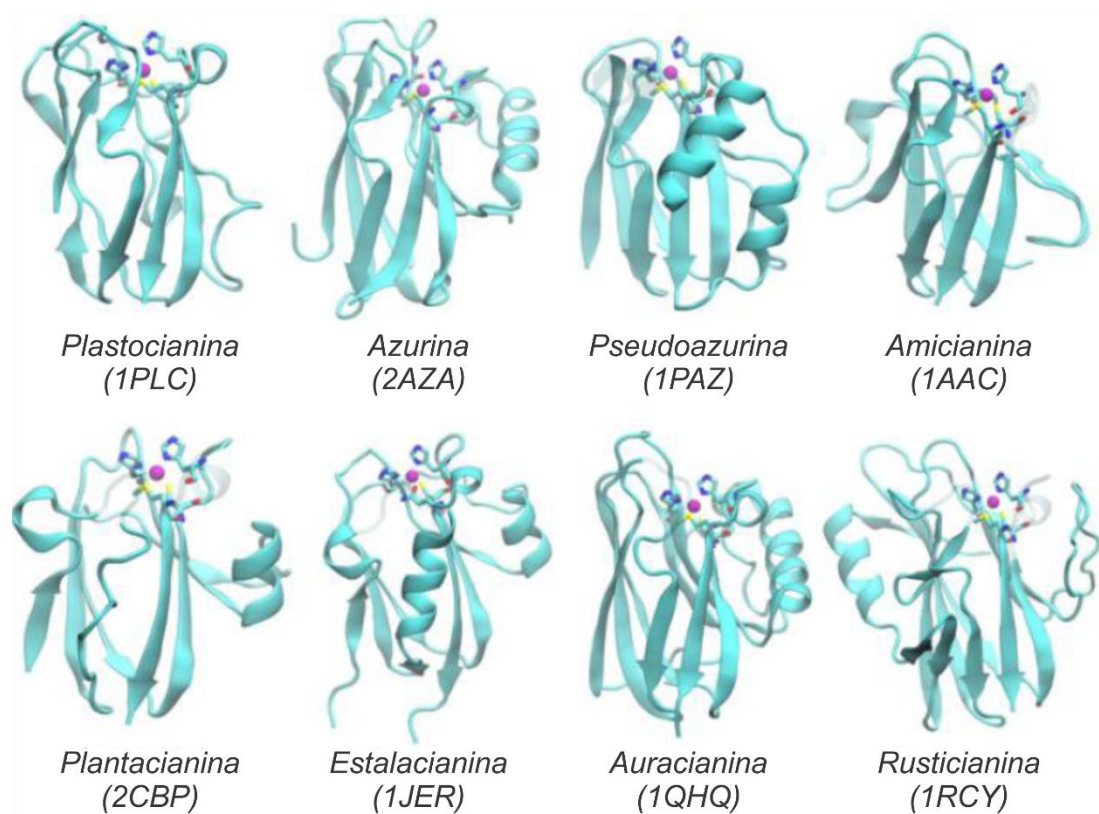


Figura 5-1. (figura adaptada de Liu et al. 2014 ¹⁴) Representación de la estructura cristalográfica de distintos ejemplos de proteínas T1 y entre paréntesis sus respectivos códigos de PDB. A simple vista se detecta una fisonomía común a todas las estructuras, a pesar de la alta variabilidad en la secuencia aminoacídica, como consecuencia del plegamiento cupredoxina conservado.

Si bien son abundantes y variados los ejemplos reportados de proteínas T1, sólo se conoce la función fisiológica de un grupo bastante limitado ³. En todos los casos, el sitio T1 se desenvuelve como intermediario electrónico de un proceso metabólico, y en este capítulo los estudios estarán concentrados en el sitio redox de dos de estas proteínas: la Azurina y la Amicianina. Esta última ha sido estudiada primordialmente a partir del modelo de *Paracoccus denitrificans*, y se ha establecido que en dicho organismo toma un electrón de la metilamina deshidrogenasa para luego transferirlo a un tipo de Citocromo c, el Cyt c-551i ¹⁵⁻¹⁹. El caso de la Azurina no ha llegado a ser descrito con tanta precisión, aunque diversos estudios sobre el modelo de *Alcaligenes faecalis* indican que es capaz de oxidar a algunas deshidrogenasas de aminas aromáticas para luego reducir a distintos tipos de Citocromo c presentes en su entorno celular ^{20,21}.

Las interacciones entre las proteínas T1 con sus *partners* biológicos son generalmente a partir de la formación de complejos transientes, como indican diversos estudios realizados en Azurina, Amicianina y Plastocianina ^{16,18,21-23}. En algunos casos se ha detectado la formación de complejos multimoleculares, como por ejemplo una

estructura cristalográfica de Azurina en complejo con cuatro amino deshidrogenasas, o un complejo ternario entre la molécula de Amicianina, una metilamina deshidrogenasa y un Cyt c-551i ^{24,25}. Sin embargo, el grado de conocimiento sobre los mecanismos para las reacciones de TE *in vivo* sigue siendo precario, y existe controversia aún acerca de la naturaleza de los complejos que presentan actividad redox. Sin ir más lejos, resultados recientes a partir de medidas de actividad redox entre Amicianina y ambos *partners* putativos en solución indican que no es mediante la formación de un complejo ternario, sino a partir de un mecanismo de “ping-pong” que la proteína T1 actuaría como intermediario electrónico *in vivo* ²⁶. Además, muchas de estas proteínas son promiscuas en cuanto a su actividad redox, habiendo reportes de reacciones de TE con otras proteínas (además de los *partners* putativos), diversos complejos inorgánicos y también algunas moléculas pequeñas ^{3,27-29}.

Son notables los avances que se han realizado sobre la caracterización de los sitios T1 en los últimos años, no obstante, su complejidad y variabilidad biológica han colaborado para mantener varios aspectos controversiales. La diversidad de organismos y rutas metabólicas donde se las encuentra, en conjunto con sus características estructurales y funcionales únicas (como se desarrollará en las siguientes secciones), convierte a estas proteínas en sistemas de gran atractivo para su estudio.

5.1.2- Características estructurales generales de los sitios T1

La primera estructura cristalográfica que se logró obtener de una proteína T1 fue la de la Plastocianina de *Populus nigra* (varietal *italica*), hace ya casi 40 años ³⁰. Desde entonces, muchas proteínas T1 se han sumado al grupo de las estructuras cristalográficas, y han permitido conocer en gran detalle los elementos comunes y los aspectos variables de sus sitios activos ³ (figura 5-1). Como ya fue mencionado, uno de los aspectos transversales a todas las proteínas T1 (pero no exclusivamente de ellas) es el esqueleto proteico que responde al plegamiento cupredoxina, y que conlleva la conservación de algunos de los residuos coordinantes del sitio activo ³⁻⁵ (figura 5-2 A). El ion cobre se encuentra en un extremo de la proteína T1, coordinado ecuatorialmente por un azufre cisteínico y dos nitrógenos correspondientes a histidinas. Típicamente la primera esfera de coordinación se completa con el azufre de una metionina axial y, menos comúnmente, por un carbonilo amídico axial del lado opuesto al de la metionina ^{3,30} (figura 5-2 B). A pesar de estar próximo a la superficie, la forma en la que las cupredoxinas se pliegan previene la entrada de ligandos exógenos al sitio redox, minimizando las posibilidades de reacciones secundarias que interfieran con el rol fisiológico de transportador de electrones que cumplen en todos los casos conocidos ³¹.

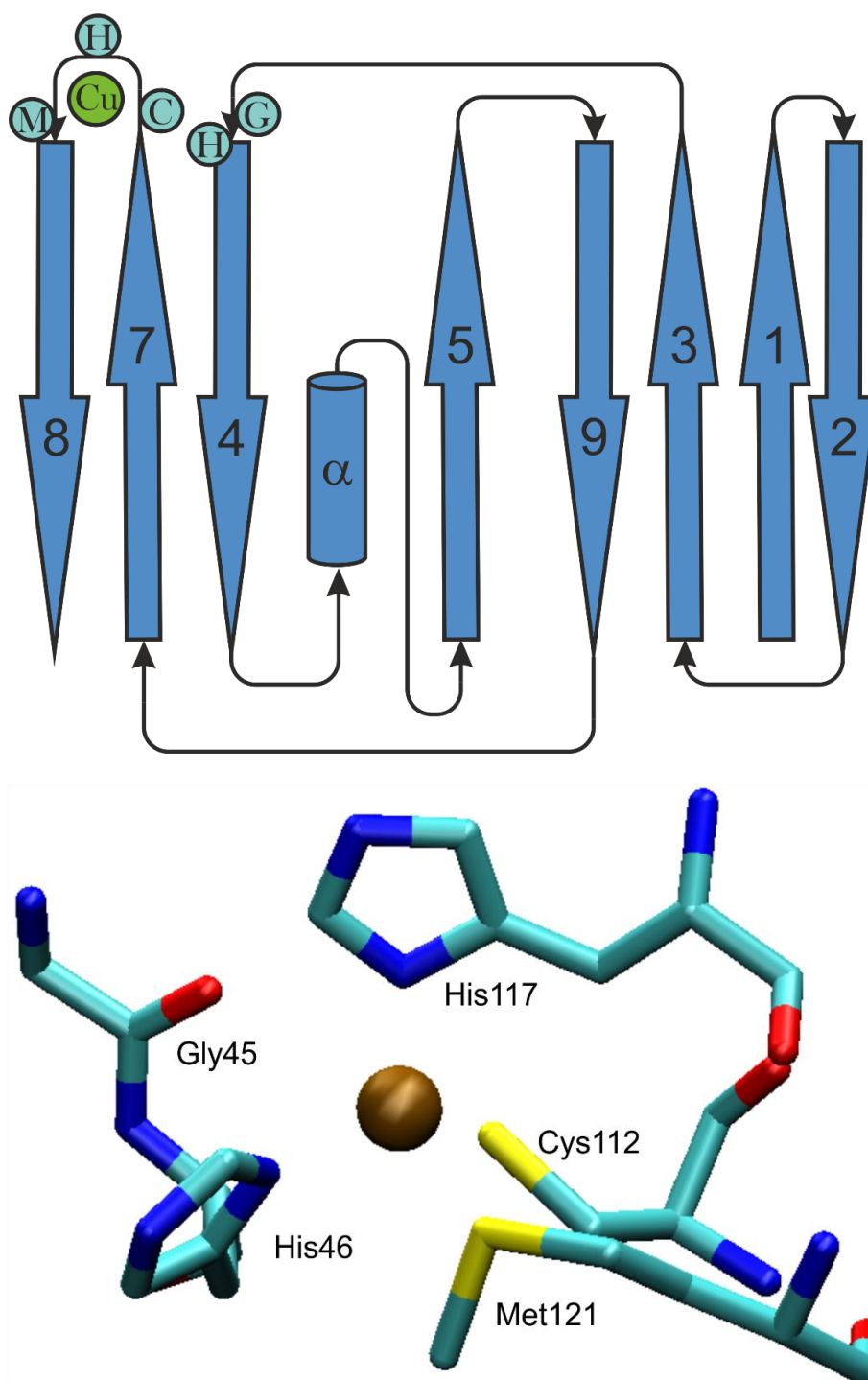


Figura 5-2. (Arriba) Representación esquemática de la topología de la estructura secundaria de Azurina, como modelo del plegamiento cupredoxina. El bucle entre las hojas- β 3 y 4 contiene una histidina ligante y el carbonilo amídico axial (de una glicina). El bucle C-terminal o bucle ligante, contiene a la cisteína y a la otra histidina ligante, además de la metionina axial. (Abajo) Representación del sitio T1 de la Azurina de *Alcaligenes Denitrificans* (como ejemplo canónico). El átomo de cobre (marrón) está coordinado ecuatorialmente por un azufre (amarillo) cisteínico y dos nitrógenos (azul) histidínicos. La coordinación se completa con un azufre metionínico y un oxígeno (rojo) del carbonilo amídico de una glicina, ambos ligandos axiales.

Los distintos ligandos coordinantes del sitio redox se ubican en posiciones internas o adyacentes a dos de los bucles comprendidos entre los elementos de estructura secundaria de la proteína (figura 5-2). Una de las histidinas coordinantes es el primer residuo (en sentido N-terminal → C-terminal) de la cuarta hoja-β, y en los casos donde un carbonilo amídico axial (generalmente de una glicina) se presenta como el quinto ligando del sitio activo, éste se ubica en la posición inmediata anterior, es decir, como el último residuo del bucle entre las hojas-β 3 y 4. El resto de los ligandos que coordinan al ion cobre se encuentran en el bucle de la región C-terminal que se define entre las hojas-β 7 y 8, denominado por algunos autores como “bucle ligante”. Este bucle se conforma con un motivo Cys-(Xxx)_n-His-(Xxx)_m-Met donde m y n pueden adoptar los números 2; 3 y 4 en la mayoría de las proteínas T1 ³² (figura 5-2). Por lo tanto, este bucle presenta variabilidad tanto en la identidad de sus residuos como en la cantidad, a diferencia de lo que ocurre con el bucle homólogo en sitios de Cu_A, cuya extensión se encuentra altamente conservada ^{33,34} (ver detalles en la sección 3.2.2). Es interesante comentar que existen proteínas T1 en las cuales los valores n y m del bucle ligante pueden ser mayores, como es el caso de la Nitrito reductasa (NiR), donde son ocho los aminoácidos que separan a la cisteína de la histidina (n=8) ^{32,35}. Este tipo de proteínas presentan sitios T1 con características espectroscópicas diferentes, lo cual será desarrollado en la siguiente sección.

Los tres ligandos ecuatoriales (una cisteína y dos histidinas) están absolutamente conservados en todas las proteínas T1 reportadas, pero no así el ligando axial débil metionina que, aunque es muy común, se encuentra ausente en algunos grupos. Entre ellos se conocen las estalcianinas y las diacinas, donde la metionina axial es reemplazada por una glutamina ^{12,36}. Existen otras proteínas T1 como algunas plantacianinas, celuropasminas o lacasas fúngicas, donde el lugar de la metionina es ocupado por una leucina, una valina o una fenilalanina, aunque en la mayoría de estos casos el residuo no coordina al ion metálico ³⁷⁻⁴⁴. El carbonilo amídico que actúa de segundo ligando axial débil es menos común, y se lo encuentra en algunas proteínas T1 como la Azurina ³.

Las geometrías que adoptan los sitios T1 se encuentran en un punto intermedio entre trigonal plana y tetraédrica, y el detalle de esta geometría depende de los ligandos axiales y de las restricciones estructurales que imparta la matriz proteica ^{3,4}. Generalmente los sitios que carecen de ligandos axiales se configuran en una geometría (pseudo) trigonal, donde los tres ligandos ecuatoriales definen un triángulo en torno al ion metálico. Los sitios que presentan una metionina (u otro ligando coordinante) axial presentan al ion cobre desplazado del plano trigonal formado por los ligandos ecuatoriales por el efecto de la coordinación del grupo tioéter, deformando tetraédricamente la geometría trigonal plana. Por último, aquellos sitios que presentan un segundo ligando axial (el carbonilo amídico) adoptan una geometría trigonal bipyramidal (no simétrica), donde el carbonilo contrarresta en cierta medida el efecto

del tioéter, lo que mantiene al ion cobre en el plano trigonal definido por los ligandos ecuatoriales (figura 5-3). Además, la geometría de tipo (pseudo) tetraédrica puede presentar distinto grado de distorsiones en las proteínas T1, acercándose en algunos casos a una geometría tetragonal distorsionada ^{3,11}. La proximidad a uno u otro tipo de geometría determina muchas de las propiedades espectroscópicas y funcionales de las proteínas, como será discutido en la siguiente sección.

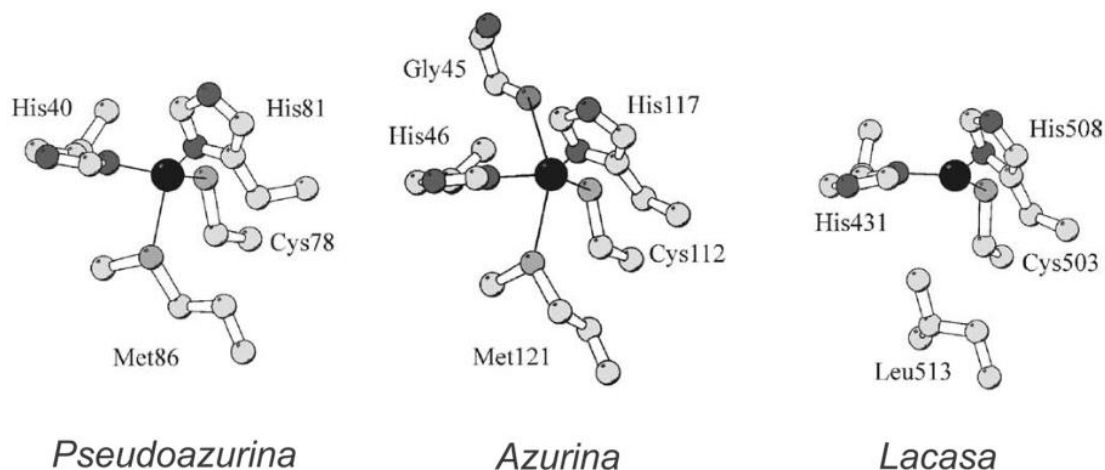


Figura 5-3. (figura adaptada de Dennison et al. 2005 ³) *Estructura de la primera esfera de coordinación de los sitios T1 de Pseudoazurina, Azurina y Lacasa, como ejemplo de coordinación por 3; 4 y 5 residuos respectivamente. En el caso tetra coordinado, el ligando axial es metionina y en el caso penta coordinado, el segundo ligando axial es el carbonilo amídico.*

Sin lugar a dudas, la característica estructural más destacada de los sitios T1 es la corta distancia $S_{Cys}-Cu$ (en comparación con lo observado en complejos inorgánicos), que fue determinada de manera precisa por primera vez a partir de medidas de absorción de rayos X extendida a la estructura fina (EXAFS) sobre la forma oxidada de la Azurina ⁴⁵. Esta distancia presenta valores entre 2,26 Å y 2,07 Å para las distintas proteínas T1 conocidas, y en particular es de 2,24 Å y 2,11 Å para las formas oxidadas de Azurina y Amicianina, respectivamente ⁴⁶. El hecho de que la distancia $S_{Cys}-Cu$ sea más corta de lo esperado (en función de los antecedentes en complejos inorgánicos y otras metaloproteínas) está vinculado con las restricciones estéricas impuestas por la matriz proteica, y diversos estudios sugieren que el entramado de puentes hidrógeno en la zona de la cisteína coordinante cumple un rol determinante en ese sentido ^{4,14}. Por su parte, las distancias $N_{His}-Cu$ suelen mostrar valores típicos para este tipo de interacciones, esto es, en torno a los 2,0 Å. Es interesante el hecho de que ambas histidinas ligantes coordinan al ion cobre a través del N_δ , en contraste con lo observado

en otros sitios de cobre (como por ejemplo los sitios T2) donde las histidinas coordinan al ion metálico típicamente a través del N ϵ . Finalmente, aunque no sea ubicua, la metionina es el ligando axial más común en sitios T1, y presenta distancias S_{Met}-Cu que pueden variar entre 2,6 Å y 3,2 Å ¹⁴.

Los dos átomos de nitrógeno y el átomo de azufre coordinantes forman un plano trigonal, con el ion metálico cerca del centro y más o menos por encima del plano dependiendo de los ligandos axiales y las restricciones impuestas por el resto de la proteína. Los ángulos del plano trigonal definidos como dos N-N-S y uno N-S-N presentan valores típicos de 101°, 117° y 134° respectivamente, según cálculos realizados a partir de estructuras cristalográficas con resolución de 2 Å ⁴⁷. A su vez, los ángulos diedros Cu-S γ -C β -C α and S γ -C β -C α -N (donde el N es el nitrógeno amídico de la cisteína) presentan valores cercanos a 180°, lo que implica una coplanaridad entre el enlace S_{Cys}-Cu, la cadena lateral de la cisteína y su orientación en el esqueleto proteico. Esta coplanaridad es consecuencia de las imposiciones estéricas antes comentadas sobre la cisteína ligante.

A partir de medidas EXAFS también pudieron ser determinadas las variaciones geométricas asociadas a la reducción del sitio, las cuales resultan sorprendentemente bajas, observándose en promedio un aumento de 0,08 Å en la distancia S_{Cys}-Cu y de 0,06 Å en ambas distancias N_{His}-Cu ^{9,12,48,49} (figura 5-4). Cambios geométricos tan pequeños entre ambas formas redox son consistentes con la evidencia cristalográfica e indicativos de un bajo valor de energía de reorganización (λ) asociado a la TE, factor determinante para la eficiencia en el rol fisiológico que desempeñan estas proteínas ¹¹ (ver detalles en la sección 1.3.1). Además, distintos estudios indican que la geometría del sitio tampoco presenta grandes cambios ante la inserción de otros metales de transición (como Hg, Cd o Zn), sugiriendo que es la matriz proteica la que impone la geometría del sitio redox ⁵⁰⁻⁵². Esta hipótesis, denominada de estado entático, pondera el rol de la matriz proteica en la determinación de la estructura del sitio activo, que en última instancia define las propiedades espectroscópicas y funcionales de la proteína ⁵³⁻⁵⁵. El hecho de que las estructuras reportadas de distintas apoproteínas T1 (sin el ion metálico) conserven la orientación y la geometría general de los ligandos del sitio activo, con cambios entre 0,1 Å y 0,3 Å, confirma el modelo de estado entático ^{51,56-59}.

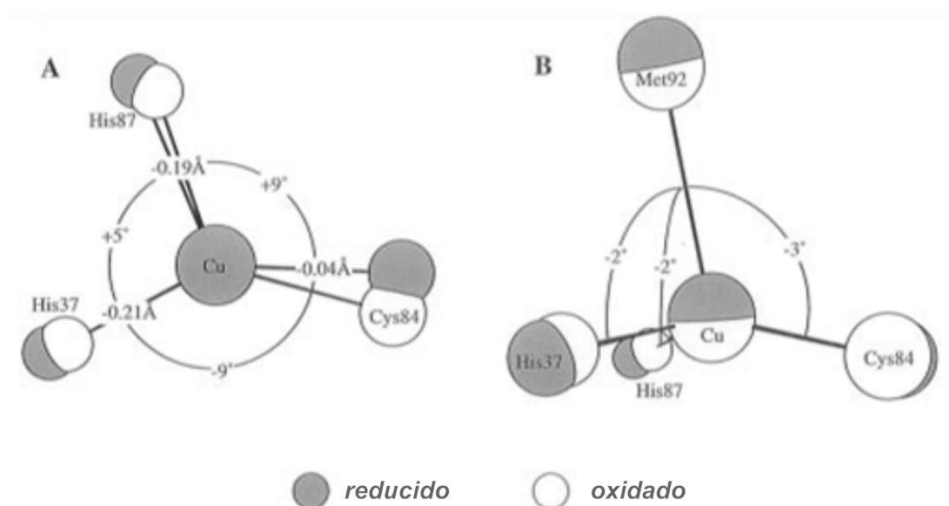


Figura 5-4. (figura adaptada de Holm et al. 1996 ⁹) *Diferencias geométricas de la primera esfera de coordinación del sitio T1 de la plastocianina entre su estado reducido (círculos llenos) y su estado oxidado (círculos vacíos). (A) Distancias de enlace y ángulos de los ligandos del plano ecuatorial. (B) Ángulos formados entre cada ligando ecuatorial y el azufre metionínico.*

5.1.3- Descripción electrónica de los sitios T1

A partir de lo desarrollado en la sección anterior queda de manifiesto, por un lado, el carácter asimétrico de los sitios T1, y por otro, que la matriz proteica impone sobre estos una geometría con características atípicas. Ambos hechos dotan a estos sitios de una gran complejidad en su descripción electrónica y, en consecuencia, de características espectroscópicas únicas ^{8,9}. El abordaje de sistemas cúpricos más simples, como complejos inorgánicos de cobre, ha representado una herramienta invaluable para la interpretación de los resultados experimentales de los sitios T1, y por lo tanto para una mejor caracterización.

En su descripción electrónica, el átomo de cobre posee 5 orbitales d en su capa de valencia, que en un campo ligando octaédrico se dividen en dos grupos de orbitales: tres t_{2g} y dos e_g . Este es por ejemplo el caso del complejo CuCl_4^{2-} , donde la degeneración orbital se rompe por el efecto Jahn-Teller, generando orbitales de distinta energía y simetría (figura 5-5 A). Tal efecto produce además una distorsión geométrica que, continuando con el ejemplo del CuCl_4^{2-} , se manifiesta como una elongación en el eje z (donde no hay coordinación) y una contracción ecuatorial (donde se disponen los cuatro cloros coordinados) generando una geometría plana tetragonal (figura 5-5 A). En el diagrama de orbitales atómicos del cobre, el OA $d_{x^2-y^2}$ es el nivel ocupado de mayor energía (parcialmente ocupado) ya que presenta sus cuatro lóbulos orientados en la dirección de los átomos de cloro, lo cual maximiza la interacción antiligante de tipo σ^* (figura 5-5 A). Por su parte, cada átomo de cloro posee un orbital p orientado en la

dirección del Cu, por lo que recibe el nombre de p_σ . Cálculos DFT indican que la descripción del HOMO de este complejo resulta de la combinación entre el orbital Cu $d_{x^2-y^2}$ con un peso del 61% y un 39% proveniente de la contribución efectiva de los cuatro orbitales p_σ de los átomos de Cl ¹¹ (figura 5-5 B).

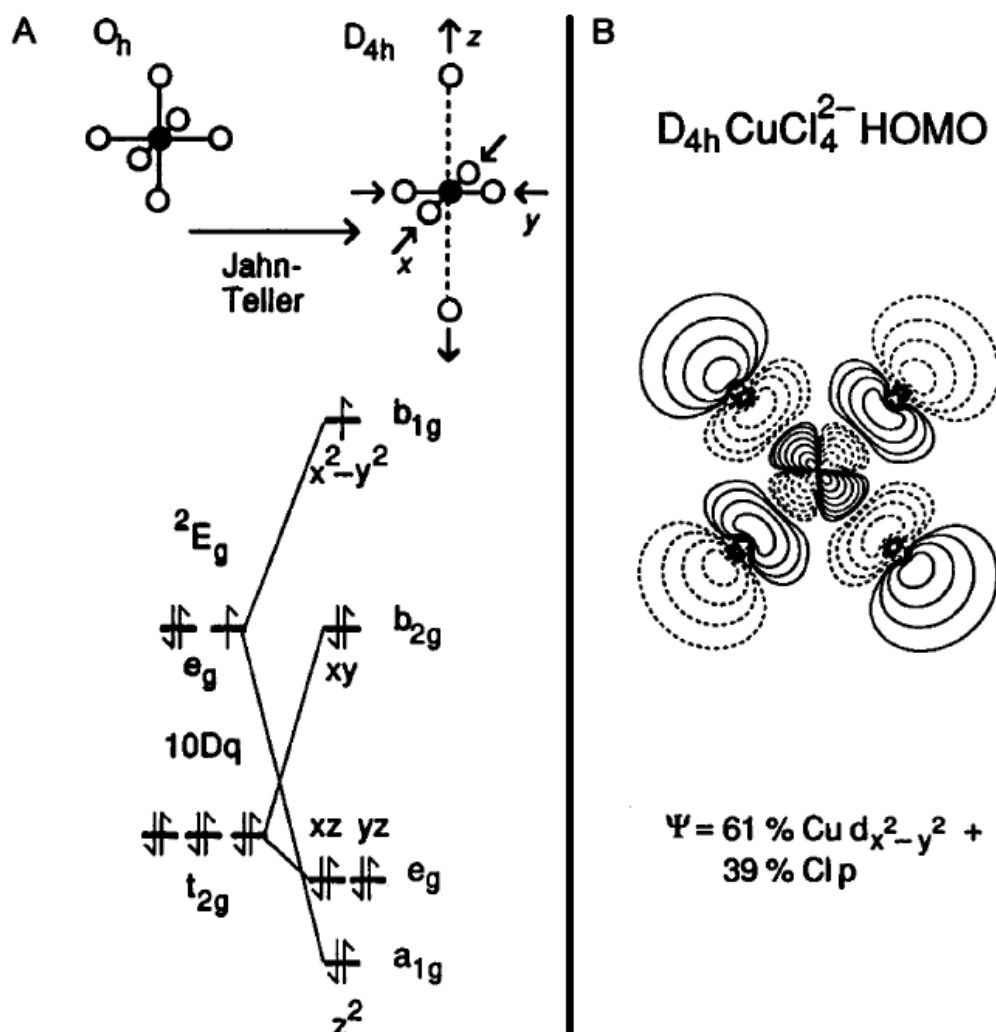


Figura 5-5. (figura adaptada de Solomon et al. 2006 ¹¹) (A) Efecto de la distorsión de Jahn-Teller sobre la geometría, simetría y energía de los OAs del cobre en un campo ligando octaédrico. (B) Representación esquemática de la combinación del OA Cu $d_{x^2-y^2}$ con los cuatro OA Cl p_σ en el complejo $CuCl_4^{2-}$, y la descripción electrónica del HOMO.

Los dos orbitales p restantes de cada átomo de Cl (2 Cl p_π) se encuentran orientados de manera perpendicular a la unión ligando-metal, razón por la cual experimentan una interacción de tipo π con el átomo de cobre ^{10,60,61} (figura 5-6 A). Ambas interacciones dan lugar a una transferencia de carga ligando metal (TCLM), que resulta en un caso de carácter σ (de mayor energía) y en el otro de carácter π (de menor energía). La

intensidad de tales transiciones es proporcional a la superposición de los OA involucrados en cada una, por lo tanto, en el espectro de absorción electrónica la banda de TCLM $\text{Cl}(p_\sigma) \rightarrow \text{Cu}(d_{x^2-y^2})$ es más intensa (y de mayor energía) que la banda de TCLM $\text{Cl}(p_\pi) \rightarrow \text{Cu}(d_{x^2-y^2})$ ⁶² (figura 5-6 B). En regiones menos energéticas se observan bandas correspondientes a transiciones de campo ligando ($d \rightarrow d$), es decir, de orbitales del cobre totalmente ocupados al orbital $d_{x^2-y^2}$ (de mayor energía) parcialmente ocupado. Estas bandas, además de ubicarse en regiones menos energéticas del espectro, presentan intensidades mucho menores que las bandas de TCLM, ya que corresponden a transiciones de baja probabilidad (figura 5-6 C).

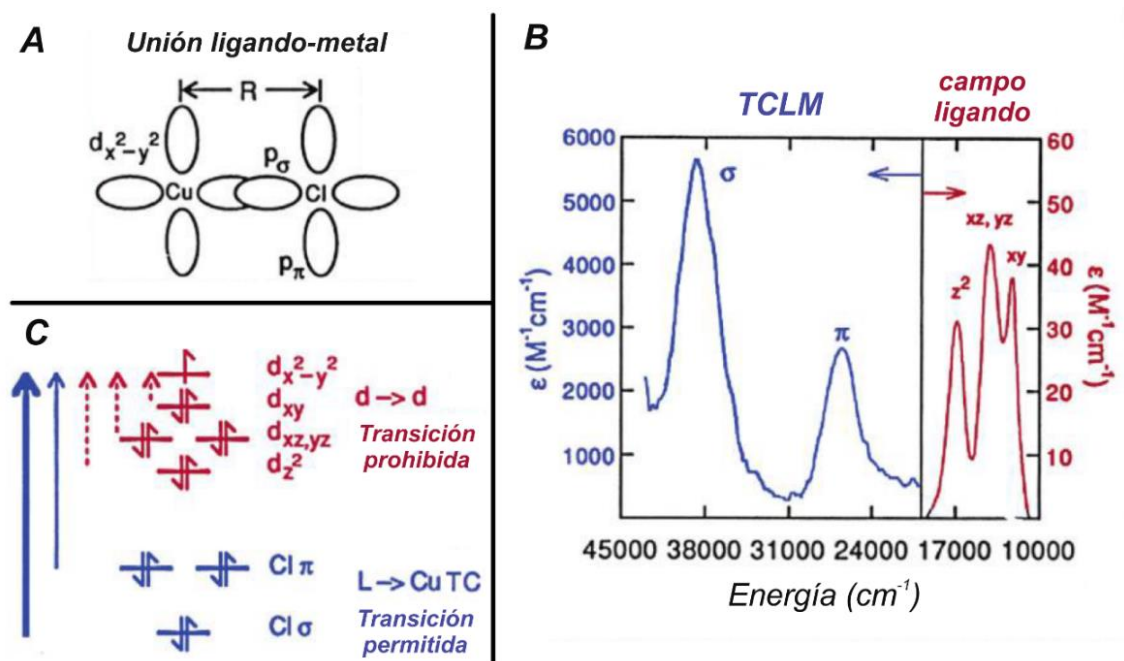


Figura 5-6. (figura adaptada de Solomon et al. 2004 ¹¹) (A) Representación esquemática de la interacción entre el OA Cu $d_{x^2-y^2}$ con un OA Cl p_σ y con un OA Cl p_π en el complejo CuCl_4^{2-} . (B) Espectro de absorción electrónica del CuCl_4^{2-} , donde se observan las bandas correspondientes a las (azul) TCLM $\text{Scys}(p) \rightarrow \text{Cu}(d_{x^2-y^2})$ y las (rojo) transiciones $d \rightarrow d$. (C) Representación esquemática de las transiciones de tipo (azul) TCLM $\text{Scys}(p) \rightarrow \text{Cu}(d_{x^2-y^2})$ y (rojo) $d \rightarrow d$ entre los distintos OAs. Las flechas más gruesas indican transiciones más probables y las flechas más largas indican transiciones más energéticas.

Como fue desarrollado en la sección anterior, los sitios T1 se muestran muy alejados de una geometría tetragonal plana como la del CuCl_4^{2-} . Si bien la cantidad e identidad de ligandos en la primera esfera de coordinación es variable, la mayoría de los sitios T1 tetracoordinados configuran una geometría tetraédrica más o menos distorsionada, con

los tres ligandos ecuatoriales (una cisteína y dos histidinas) y el ligando axial metionina en sus vértices (figura 5-3). Por su parte, la distancia $S_{Cys}-Cu$ particularmente corta implica una fuerte interacción de carácter covalente, lo que se traduce para su forma oxidada en una densidad de espín desapareado localizada mayoritariamente en ambos átomos. Dado que la plastocianina fue la primera estructura cristalográfica reportada de un sitio T1, muchos avances sobre la descripción electrónica de estos sitios se llevaron a cabo utilizándola como modelo ^{9,30}. A partir de estudios de absorción de rayos X (XAS) y resonancia paramagnética electrónica (EPR) en combinación con cálculos computacionales se determinó la contribución del cobre y los ligandos ecuatoriales al orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) para el sitio T1 de la plastocianina. Estos resultados indican contribuciones de 42%, 38%, 4% y 4% para los átomos Cu, S_{Cys} , y ambos N_{His} respectivamente, con un 12% restante correspondiente a contribuciones minoritarias de otros átomos próximos ^{11,62} (figura 5-7).

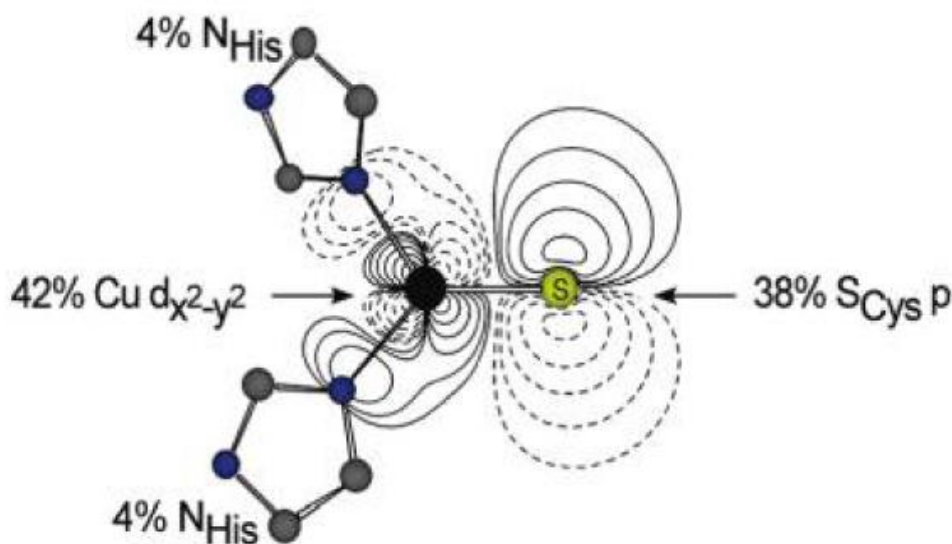


Figura 5-7. (figura adaptada de Solomon et al. 2006 ⁶²) *Superficie de isodensidad de la función de onda del HOMO en el sitio activo de la plastocianina y la contribución porcentual de cada átomo, obtenido a partir de cálculos DFT refinados con datos experimentales de XAS y EPR.*

En conjunto, la particular disposición espacial de los ligandos y la corta distancia $S_{Cys}-Cu$ resultan determinantes en la orientación relativa de los orbitales del átomo de cobre y del átomo de azufre cisteínico (su ligando más fuerte). Como puede verse en la figura 5-7, tal orientación dispone una superposición de los OA $Cu d_{x^2-y^2}$ y $S_{Cys} p$ casi enteramente por fuera de la dirección que contiene a ambos núcleos, lo que implica una interacción $S_{Cys}-Cu$ de carácter primordialmente π . Esto implica que la TCLM

$S_{Cys}(p\sigma) \rightarrow Cu(d_{x^2-y^2})$ ($S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$) será menos intensa que la TCLM $S_{Cys}(p\pi) \rightarrow Cu(d_{x^2-y^2})$ ($S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$), al contrario de lo observado en el complejo $CuCl_4^{2-}$, y por lo tanto la relación de intensidades entre ambas bandas será también inversa. Las proteínas T1 reciben históricamente el nombre de proteínas azules de cobre, dado el característico color azul de la mayoría de ellas. Esta cualidad distintiva es consecuencia de la intensa banda ($\epsilon_{max} \approx 5000$) que presentan hacia los 600 nm ($\approx 16700\text{ cm}^{-1}$) y domina el espectro de absorción UV-Vis ⁶³⁻⁶⁵ (figura 5-8). Esta es precisamente la banda correspondiente a la TCLM $S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$, mientras que las correspondientes a las demás transiciones observables en regiones energéticas comparables (como las de TCLM $S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$ y $d \rightarrow d$) presentan intensidades mucho menores, perdiéndose por debajo de la banda dominante (figura 5-8).

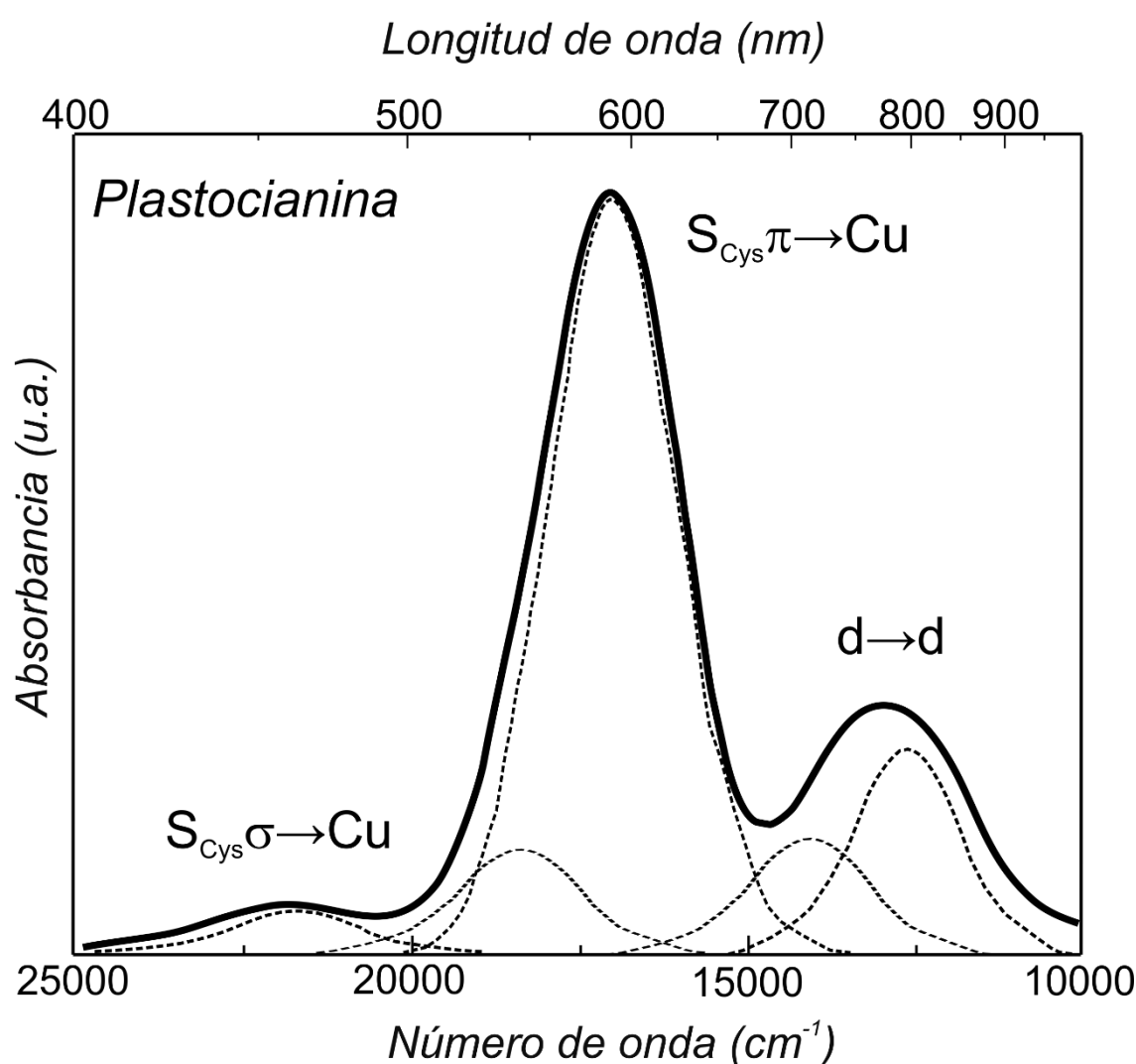


Figura 5-8. Espectro UV-Vis de la Plastocianina (línea llena) y su deconvolución (línea punteada). La banda dominante hacia los 17000 cm^{-1} corresponde a la TCLM $S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$, la débil banda hacia los 22000 cm^{-1} corresponde a la TCLM $S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$ y la banda a mayores energías corresponde a la superposición de bandas $d \rightarrow d$.

5.1.4- El modelo de distorsión acoplada

El color azul característico que presentan tantas proteínas T1, o lo que es lo mismo, su espectro UV-Vis dominado por una banda a aproximadamente 600 nm, es la consecuencia directa de la descripción electrónica de su sitio metálico, que es a su vez consecuencia de la geometría de la primera esfera de coordinación (como se desarrolló en la sección anterior). Sin embargo, existen diversos ejemplos de proteínas T1 con el mismo grupo de ligandos coordinantes, pero que exhiben un color verde o una tonalidad distinta de azul, como los casos de la Pseudoazurina (PAz), Plantacianina (o CBP), NiR, etc.^{7,35,62,66-69}. El color diferente de estas proteínas es consecuencia de la presencia de una banda hacia los 450 nm en el espectro UV-Vis, de intensidad similar o superior a la banda de TCLM $S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$ que es típica de las proteínas que presentan un color azul intenso (figura 5-9). A partir del análisis comparativo con la asignación del espectro UV-Vis de la plastocianina (figura 5-8) se desprende que la banda en 450 nm corresponde a la TCLM $S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$, lo cual fue confirmado por múltiples estudios espectroscópicos en diversas proteínas T1⁶². La orientación relativa de los OA involucrados en la TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ está directamente vinculada con la relación de intensidades entre ambas bandas de TCLM, sugiriendo que en los sitios no azules el orbital parcialmente ocupado $Cu d_{x^2-y^2}$ está rotado, incrementando el carácter σ de la interacción (en detrimento del carácter π). Esta conclusión fue apoyada por cálculos computacionales, confirmando el cambio en la orientación del orbital $Cu d_{x^2-y^2}$ como responsable de las diferencias espectrales^{7,70}.

Por otra parte, fueron reportados estudios Raman resonante (RR) sobre distintas proteínas T1 nativas y mutantes puntuales donde se observaron, entre otras cosas, diferentes valores para la energía vibracional del enlace $S_{Cys}-Cu$. Estas diferencias mostraron una excelente correlación con la relación de intensidades de las bandas de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$ de los espectros UV-Vis, observándose que el enlace $S_{Cys}-Cu$ tiene una menor energía vibracional a medida que aumenta su carácter σ a lo largo de las distintas variantes estudiadas^{71,72}. Esto significa que, por ejemplo, la NiR presenta un enlace $S_{Cys}-Cu$ más débil (según los resultados RR) y de mayor carácter σ (según los espectros UV-Vis) que la plastocianina. A partir del análisis de estos y otros resultados sobre sitios T1 y T2 se propuso inicialmente que la perturbación geométrica asociada a estos cambios espectrales para los sitios T1 verdes radica en una disposición espacial de los ligandos de la primera esfera más próxima a un tetraedro regular, con un consecuente aumento de la distancia $S_{Cys}-Cu$ ^{71,72}. Sin embargo, análisis más rigurosos realizados posteriormente, complementando la información disponible con resultados obtenidos mediante dicroísmo circular magnético (DCM), determinaron que la perturbación geométrica involucrada consiste en una tendencia del sitio T1 a una disposición tetragonal, y no tetraédrica⁷³.

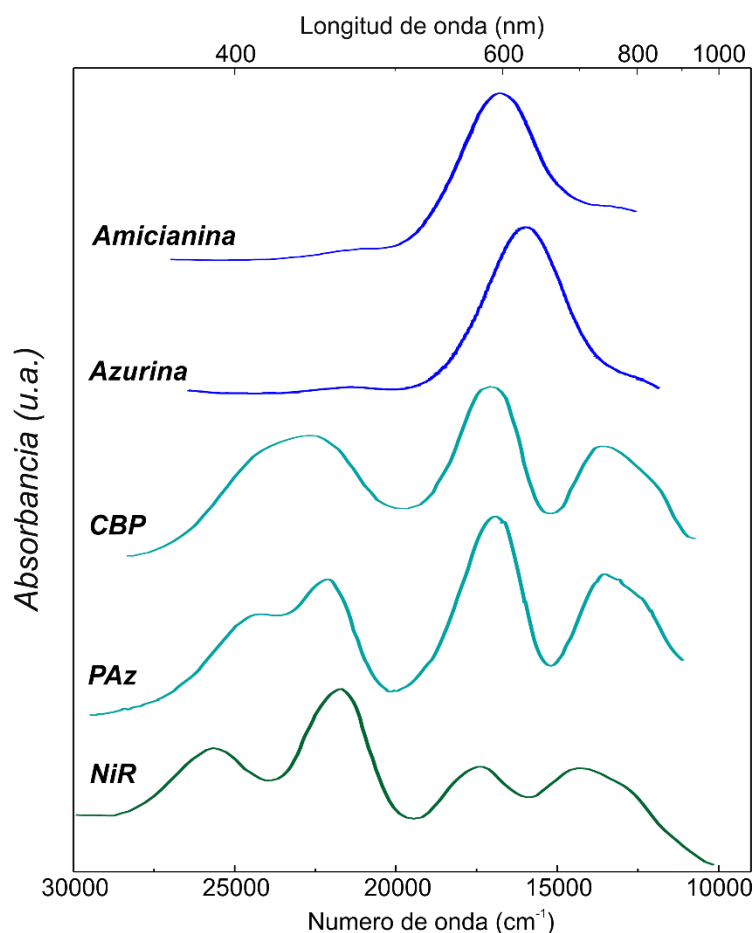


Figura 5-9. Espectro UV-Vis de distintas proteínas T1, ejemplificando las distintas distorsiones espectrales que dan lugar a las proteínas de color azul, las de color verde y las de color intermedio. De arriba hacia abajo se muestran los espectros de Amicianina, Azurina, CBP, PAz y NiR.

Los diversos resultados espectroscópicos señalan una estrecha vinculación de la descripción electrónica de distintos sitios T1 con su detalle estructural. En particular, los sitios T1 tendientes a una geometría tetragonal, mencionados también como sitios rómbicos (o verdes) en contraposición a los sitios axiales (o azules) por algunos autores, presentan enlaces $S_{Cys}-Cu$ más débiles y de mayor carácter σ . Esta tendencia fue correlacionada con las estructuras cristalográficas de distintas proteínas T1, dando lugar a una interpretación generalizada de los factores estructurales que determinan las propiedades espectroscópicas de estos sitios ^{35,73-76}. Se observó que el cambio simultáneo de tres parámetros estructurales particulares correlaciona con la tendencia descrita. Tomando a la plastocianina como el sitio T1 canónico (axial) y a la NiR como el caso de mayor perturbación geométrica (tetragonal o rómbico), la distancia $S_{Cys}-Cu$ aumenta más de 0,1 Å, la distancia $S_{Met}-Cu$ disminuye más de 0,3 Å y el plano $Cu-S_{Cys}-S_{Met}$ y sufre una rotación hacia el plano $Cu-N_{His}-N_{His}$ superior a los 30° (figura 5-10 A). La mayor proximidad del azufre metionínico al átomo de cobre debilita la unión $S_{Cys}-Cu$,

aumentando su distancia y llevando al sitio hacia una geometría tetragonal. Es a partir del cambio en la disposición espacial del sitio que se produce la rotación del orbital $\text{Cu } d_{x^2-y^2}$, con el consecuente cambio en la relación de intensidades de las bandas de TCLM $\text{S}_{\text{Cys}} \rightarrow \text{Cu}$ en los espectros UV-Vis (figura 5-10 B). Este modelo en el cual distintas características estructurales y electrónicas están estrechamente vinculadas se denomina “modelo de distorsión acoplada”⁷³.

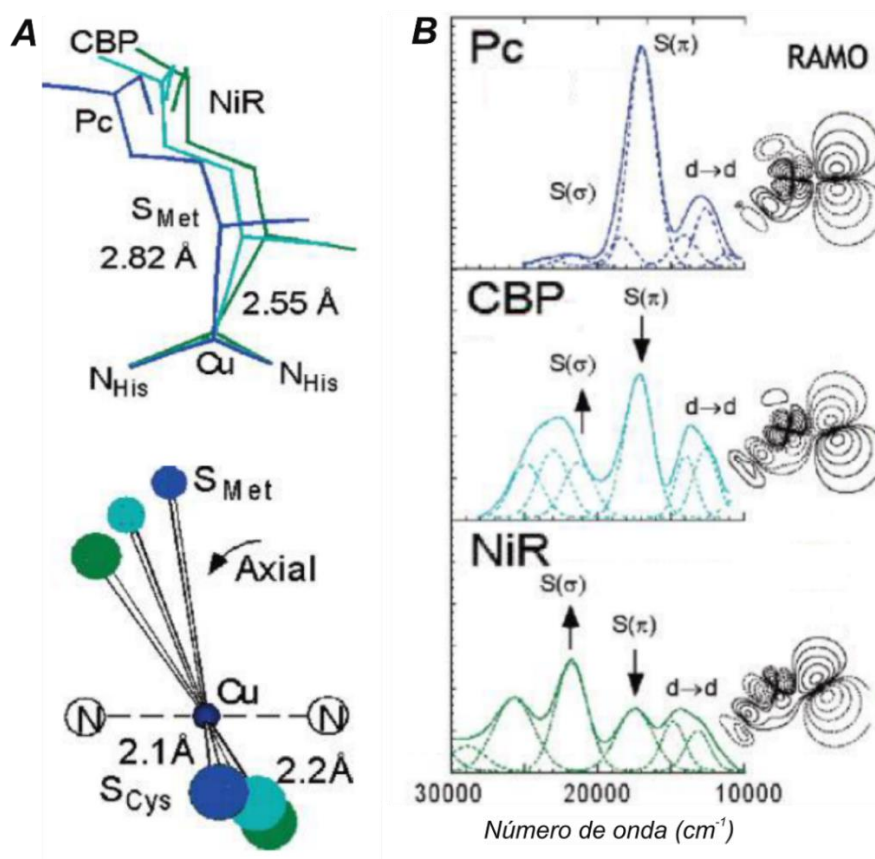


Figura 5-10. (figura adaptada de Solomon y Hadt et al. 2011⁶) Características del modelo de distorsión acoplada a partir de la comparación de datos experimentales de plastocianina (azul), CBP (celeste) y NiR (verde). (A) Geometría de los tres sitios T1; se ve un aumento de la distancia $\text{S}_{\text{Cys}}\text{-Cu}$ y un acortamiento de la distancia $\text{S}_{\text{Met}}\text{-Cu}$ acoplados a una rotación de la posición de la metionina axial. (B) Efecto de las distorsiones geométricas en los espectros UV-Vis, con un aumento de la intensidad banda de TCLM $\text{S}_{\text{Cys}}\sigma \rightarrow \text{Cu}$ acoplado a una disminución de la intensidad de la banda de TCLM $\text{S}_{\text{Cys}}\pi \rightarrow \text{Cu}$, y su correlato en la orientación de los orbitales.

Según este modelo, un sitio T1 axial (azul) presentará un espectro UV-Vis dominado por una banda de TCLM $\text{S}_{\text{Cys}}\pi \rightarrow \text{Cu}$ en torno a los 600nm ($\approx 16700 \text{ cm}^{-1}$), mientras que el espectro de un sitio T1 tetragonal (verde) estará dominado por una banda de TCLM

$S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$ próxima a los 450nm ($\approx 22200\text{ cm}^{-1}$)^{11,62}. Así, la relación de intensidades entre ambas bandas de TCLM $A_{\epsilon \approx 450}/A_{\epsilon \approx 600}$ (R_L) resulta indicativa de la tetragonalidad del sitio T1. Para el caso de la Azurina, Amiciana o Plastocianina, los sitios se pueden catalogar como axiales, de geometría pseudo tetraédrica con un característico color azul y un $R_L \approx 0,1$. El sitio T1 de la plantacianina (o CBP) es definido por algunos autores como sitio T1 perturbado, ya que presenta una geometría tetraédrica distorsionada y un color azul pardo con un $R_L < 1$; aunque mayor que 0,1. En cuanto al sitio activo de proteínas verdes como la NiR, hay quienes sugieren denominarlos T1,5 en alusión a que su geometría tetragonal distorsionada y su espectro UV-Vis alterado (que cumple $1 < R_L < 2$) se pueden interpretar como un punto medio entre los sitios T1 típicos (azules) y los sitios T2 (rojos)⁶². Sin embargo, en esta tesis se utilizará el término T1 para los sitios de cobre azules y verdes, designando a los primeros como axiales o azules y a los segundos como tetragonales, rómbicos o verdes.

Dada la injerencia del ligando axial débil metionina en la distorsión acoplada del sitio T1, se realizaron estudios en variantes mutagénicas de la NiR donde dicho ligando fuera reemplazado⁷⁷. Estos demostraron que cuando la interacción entre el ligando axial y el átomo de cobre se elimina, el sitio presenta las propiedades espectroscópicas típicas de un sitio T1 azul. Tales resultados fueron apoyados por cálculos computacionales realizados a partir del sitio T1 sin y con la metionina axial. La geometría óptima calculada sin restricciones de este último presenta una distancia $S_{Met}-Cu$ corta y una interacción $S_{Cys} \rightarrow Cu$ de tipo σ , características del sitio T1 verde. Pero tras la eliminación de la metionina axial y reoptimización geométrica se recuperan las características del sitio T1 azul. Todos estos resultados contribuyen a ponderar, no sólo el rol del ligando axial metionina en las propiedades de los sitios T1, sino principalmente el rol de la matriz proteica. El hecho de que muchos de los sitios T1 azules cuenten con la metionina axial débil en su primera esfera de coordinación da cuenta del estado entáctico de estas proteínas, es decir, que la matriz proteica impone restricciones estructurales fuertes a los ligandos del sitio activo^{53,55}.

Algunos autores trataron de racionalizar estas diferencias en términos del largo del llamado bucle ligante, que contiene tres de los cinco ligando de la primera esfera de coordinación (ver detalles en la sección 5.1.2). Este bucle se conforma con un motivo $Cys-(Xxx)_n-His-(Xxx)_m-Met$ y mientras en la mayoría de las proteínas T1 azules n adopta valores entre 2 y 4, en distintas variantes de la NiR vale 7 u 8³². Esto propició el diseño de distintas mutantes de proteínas T1 con distinto largo en el bucle ligante, cuyos resultados señalan que el largo de este bucle es uno de los principales determinantes de las propiedades estructurales del sitio^{13,78-81}. No obstante, aún quedan muchos interrogantes acerca de los determinantes estructurales de los sitios T1, que en última instancia determinan sus propiedades espectroscópicas y funcionales. En este capítulo se presenta un abordaje diferente de los que hasta ahora han sido reportados para el estudio de proteínas T1.

5.2- Resultados

Tanto la introducción de este capítulo como lo desarrollado en los capítulos previos da cuenta del rol crucial que cumple la matriz proteica sobre las propiedades del sitio activo de las cupredoxinas, en particular de los sitios de Cu_A y los sitios T1. En este último caso, distintas variantes silvestres con idénticos ligandos de primera esfera presentan importantes diferencias espectroscópicas a partir de perturbaciones geométricas impuestas justamente por la matriz proteica⁶² (ver detalles en la sección 5.1.4). Esto sugiere que el estado entático en las cupredoxinas puede representar un mecanismo evolutivo para el control fino de las propiedades de los centros redox de cobre^{11,62}. Por otra parte, y no menos importante, el plegamiento conservado cupredoxina ha brindado una invaluable herramienta para el estudio de sitios de Cu_A. Ha sido posible la reconstrucción del sitio de Cu_A en distintas proteínas T1 mediante ingeniería de bucles gracias a que ambos grupos de proteínas comparten este tipo de estructura, siendo los más conocidos los casos de Cu_A-Ami y Cu_A-Azu^{82,83} (ver detalles en la sección 3.1.3). Estos modelos permitieron sortear los principales obstáculos experimentales que presentaban los sitios nativos conocidos de Cu_A (estar inmersos en proteínas voluminosas, transmembrana y con múltiples sitios metálicos) preservando a su vez las principales características espectroscópicas. A partir especialmente del modelo Cu_A-Azu se realizaron enormes avances en la caracterización de los sitios de Cu_A, siendo a la fecha el más estudiado de los modelos de Cu_A¹⁴.

Sin embargo, estudios sobre modelos nativos de Cu_A han demostrado que muchas de las propiedades resultan notablemente distintas a lo reportado a partir de Cu_A-Azu. El rol del ligando axial metionina o el efecto del pH sobre la determinación del valor del E⁰ son dos antecedentes que muestran a las claras que ambos modelos, a pesar de compartir ciertas características espectroscópicas generales, distan mucho de ser equivalentes⁸⁴⁻⁸⁹. Los resultados desarrollados a lo largo de los dos capítulos previos no sólo contribuyen a la comprensión del modelo nativo Tt-Cu_A, sino que además suman evidencia a las diferencias de éste con Cu_A-Azu^{90,91}. Además, las diferencias entre ambos modelos señalan nuevamente el rol determinante de la matriz proteica sobre las propiedades del sitio activo en cupredoxinas.

A lo largo de este capítulo se desarrollarán distintos estudios espectroscópicos, computacionales y electroquímicos realizados sobre dos proteínas T1 quiméricas novedosas. El objetivo principal que se persigue es el de obtener información relevante que permita entender en mayor profundidad el efecto de la matriz proteica sobre las propiedades espectroscópicas y funcionales de los sitios redox. En segundo lugar, se busca, a partir de un entendimiento más profundo de la relación entre estructura tridimensional y función, generar un aporte en cuanto a la manipulación racional de sitios de cobre.

5.2.1- Desarrollo y caracterización espectroscópica de sitios T1 novedosos

Los antecedentes antes comentados motivaron el diseño de proteínas mutantes originales a partir de la lógica inversa al de los modelos Cu_A-Azu y Cu_A-Ami, para su posterior expresión y estudio. Mediante la estrategia de ingeniería de bucles se reconstruyeron los sitios activos de la Amicianina y de la Azurina en el esqueleto proteico del fragmento soluble de la subunidad II de la oxidasa *ba*₃ de *Thermus thermophilus* (Tt-Cu_A), dando como resultado dos modelos novedosos para el estudio de sitios T1: Ami-Cu_A y Az-Cu_A (figura 5-11 A). En particular, la mutación consiste en el reemplazo de la secuencia aminoacídica del bucle que conforma el sitio redox de Tt-Cu_A (Cys149, Asn150, Gln151, Tyr152, Cys153, Gly154, Leu155, Cys156, His157, Gln158, Asn159 y Met160), denominado por algunos autores como bucle ligante, por la secuencia correspondiente al bucle C-terminal (homólogo) de la Amicianina (Cys92, Thr93, Pro94, His95, Pro96, Phe97, Met98) y la Azurina (Cys112, Thr113, Phe114, Pro115, Gly116, His117, Ser118, Ala119, Leu120 y Met121), dando lugar a Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente^{92,93} (figura 5-11 B). Los detalles experimentales de la expresión y purificación de ambas quimeras se encuentran desarrollados en la sección 2.2.

A simple vista, las muestras proteicas de los dos modelos tienen una diferencia de color notable con sus pares nativos: mientras Amicianina y Azurina son proteínas azules, Ami-Cu_A y Az-Cu_A presentan dos tonalidades distintas de verde (figura 5-11). Los espectros UV-Vis de ambas quimeras presentan grandes diferencias respecto de los de Azurina y Amicianina nativas^{18,63-65} (figura 5-12). En ambos casos la deconvolución espectral evidencia un mínimo de 5 bandas gaussianas, numeradas en orden energético ascendente, cuya asignación se basa en aquellas reportadas para otras proteínas T1 y es idéntica para ambas quimeras (comentadas en la sección 5.1.4). Las bandas 1 y 2 se superponen en una banda ancha de relativamente baja intensidad en la región espectral de menores energías, atribuible a la superposición de bandas correspondientes a transiciones de tipo d→d (figura 5-12 y tabla 5-1)^{11,62} (ver sección 5.1.3). La posición de la banda 3 sugiere que se trata de la típica banda de TCLM S_{Cys}π→Cu, aunque en ambos casos se observa cierto grado de desplazamiento hacia el violeta (energías mayores) respecto de los sitios T1 nativos. Las bandas 4 y 5 se ubican en la región más energética del espectro y presentan una intensidad inusualmente alta, análogo a lo observado en el espectro de la NiR (figuras 5-10 y 5-12). En base a este antecedente (entre otros), las asignaciones de las bandas 4 y 5 corresponden a la TCLM S_{Cys}σ→Cu y a la TCLM S_{Met}→Cu respectivamente.

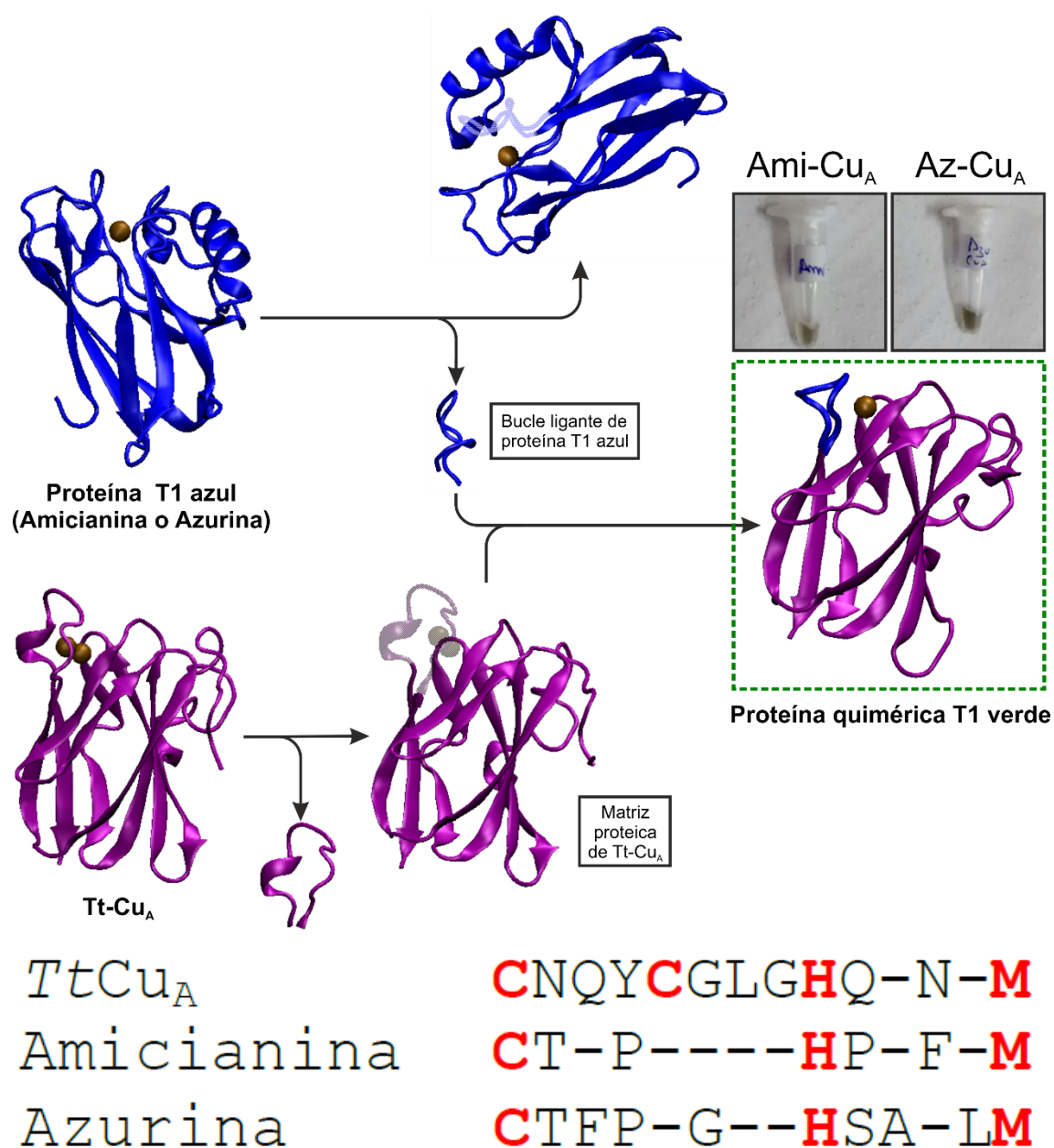


Figura 5-11. Representación esquemática de la construcción de Ami-Cu_A y Az-Cu_A a partir de reemplazar el bucle ligante de Tt-Cu_A por el de Amicijanina y Azurina respectivamente. Se muestran fotografías de muestras proteicas de ambas especies, que presentan un evidente cambio de color. Abajo se detalla el bucle ligante de cada proteína, marcando en rojo los ligandos de primera esfera de coordinación.

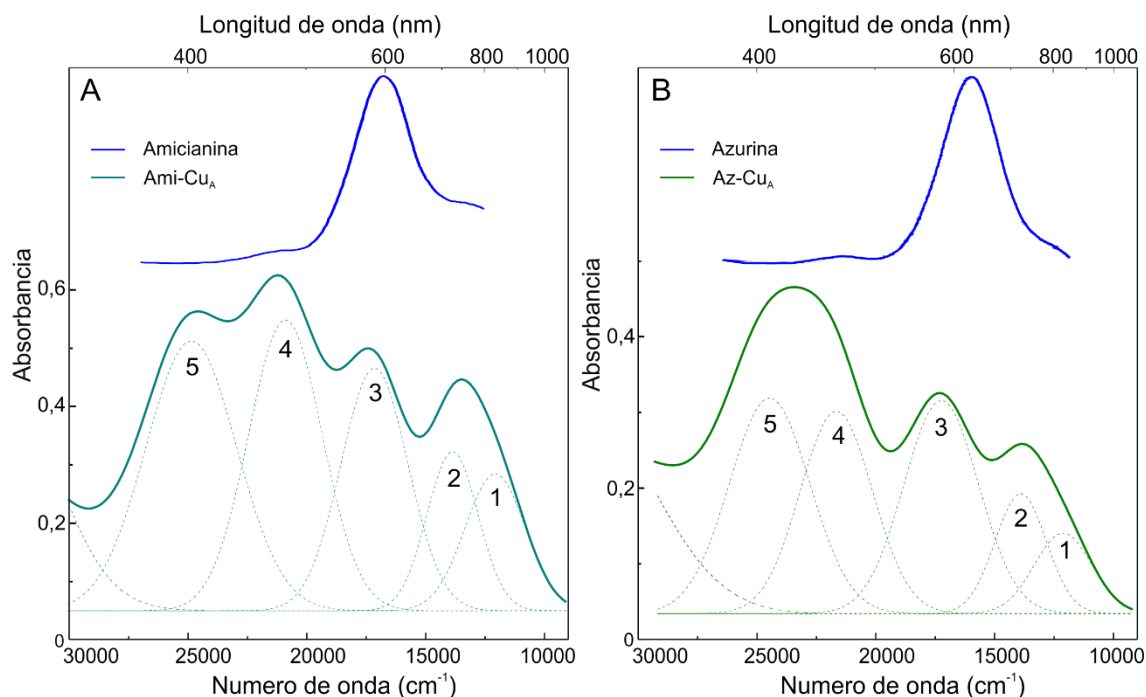


Figura 5-12. Espectros UV-Vis de (A) Ami-Cu_A y (B) Az-Cu_A. En ambos paneles se muestra en la parte superior el espectro de los correspondientes sitios T1 nativos: (A) Amicianina de *Paracoccus denitrificans*⁶⁵ y (B) Azurina de *Paracoccus Aeruginosa*. En línea punteada se presentan las gaussianas (numeradas en orden energético ascendente) de la deconvolución de los espectros UV-Vis de ambas quimeras.

Ambas quimeras presentan un fuerte descenso de la intensidad de la banda de TCLM $S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$ a $\approx 16700\text{ cm}^{-1}$, concomitante con un importante aumento de intensidad de las bandas de TCLM $S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$ y $S_{Met} \rightarrow Cu$, en la región comprendida entre 21000 cm^{-1} y 27000 cm^{-1} . Estas diferencias pueden racionalizarse en términos del modelo de distorsión acoplada, asociando los cambios espectroscópicos a perturbaciones geométricas respecto de los sitios T1 nativos (ver sección 5.1.4). Según este modelo, el valor R_L resulta indicativo de la tetragonalidad del sitio T1 y para el caso de Ami-Cu_A y Az-Cu_A los espectros UV-Vis presentan claras distorsiones espectrales en este sentido. R_L adopta valores de aproximadamente 0,1 para los sitios T1 azules, mientras que para Ami-Cu_A y Az-Cu_A esta relación adopta valores de 1,2 y 0,95 tomando las deconvoluciones o 1,5 y 1,6 tomando los máximos del espectro crudo, respectivamente (Tabla 5-1). Estos valores sugieren que ambas quimeras presentan una distorsión geométrica tetragonal en su sitio activo respecto de los sitios T1 nativos (azules). De hecho, la asignación de la banda de TCLM $S_{Met} \rightarrow Cu$ en el espectro UV-Vis de la NiR se realizó a partir del análisis conjunto con resultados de DC y DCM, interpretado según los autores como una mayor interacción entre la metionina axial y el átomo de cobre propia de los sitios T1 tetragonales más distorsionados respecto de los sitios axiales⁷.

Tabla 5-1. Deconvolución de los espectros de Ami-Cu_A (experimental), Az-Cu_A (experimental), NiR (literatura) y Azurina (literatura). Las bandas están ordenadas numéricamente (n) en orden ascendente de energía e indicadas en los espectros de la figura 5-12. Cada gaussiana se encuentra asignada a una transición, su posición se expresa en número de onda y su intensidad esta relativizada en cada caso a la banda asignada a la TCLM S_{Cys}π→Cu (ν).

n	Asign.	Ami-Cu _A		Az-Cu _A		Nir ⁷		Azu ^{94,95}	
		ν (cm ⁻¹)	I _{rel}	ν (cm ⁻¹)	I _{rel}	ν (cm ⁻¹)	I _{rel}	ν (cm ⁻¹)	I _{rel}
-	d→d	-	-	-	-	11900	0,21	-	-
1	d→d	12082	0,56	12121	0,38	13500	0,64	12830	0,18
2	d→d	13877	0,66	13902	0,56	14900	0,78	-	-
3	S _{Cys} π→Cu	17165	1	17245	1	17550	1	15850	1
4	S _{Cys} σ→Cu	20918	1,20	21659	0,95	21900	1,72	17650	0,13
-	N _{His} →Cu	-	-	-	-	-	-	20790	0,05
5	S _{Met} →Cu	24882	1,11	24466	1,01	25650	1,17	-	-

Con el objeto validar las conclusiones derivadas de los espectros UV-Vis y de profundizar la caracterización espectroscópica, se realizaron medidas de EPR y resonancia magnética nuclear (RMN) paramagnética sobre Ami-Cu_A y Az-Cu_A (figuras 5-13 y 5-14). Los espectros de EPR de sitios T1 presentan típicamente cuatro bandas en la región entre 2 y 2,3 del factor de desdoblamiento (g), debido al acoplamiento hiperfino del electrón desapareado con el núcleo del átomo de cobre. A partir de la anisotropía propia de los sitios T1, y en particular del enlace S_{Cys}→Cu, la constante del acoplamiento hiperfino (A) y el valor g presentan también anisotropía, con valores que responden en el caso de este último a la relación $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,002$ ^{7,62}. Según los estudios comparativos que derivaron en el modelo de distorsión acoplada, los sitios tetragonales y los sitios axiales presentan espectros EPR muy similares, con valores del $g_{\parallel}$ ligeramente menores cuanto más se acerque el sitio a una geometría tetragonal^{11,73,96}. Los resultados de EPR de Ami-Cu_A y Az-Cu_A son consistentes con las características típicas de sitios T1, mostrando valores de $g_{\parallel}$, $g_{\perp}$, $A_{\parallel}$ y $A_{\perp}$ similares a los de Amicianina y Azurina, lo cual permite descartar cambios significativos en la estructura o en la coordinación del sitio activo con las mutaciones, apoyando así la interpretación de los resultados espectroscópicos bajo el modelo de distorsión acoplada (figura 5-13 y tabla 5-2). Además, el hecho de que los valores $g_{\parallel}$ sean menores que los reportados para Azurina y Amicianina es indicativo de una geometría de mayor carácter tetragonal, como sugieren también los espectros UV-Vis (tabla 5-2).

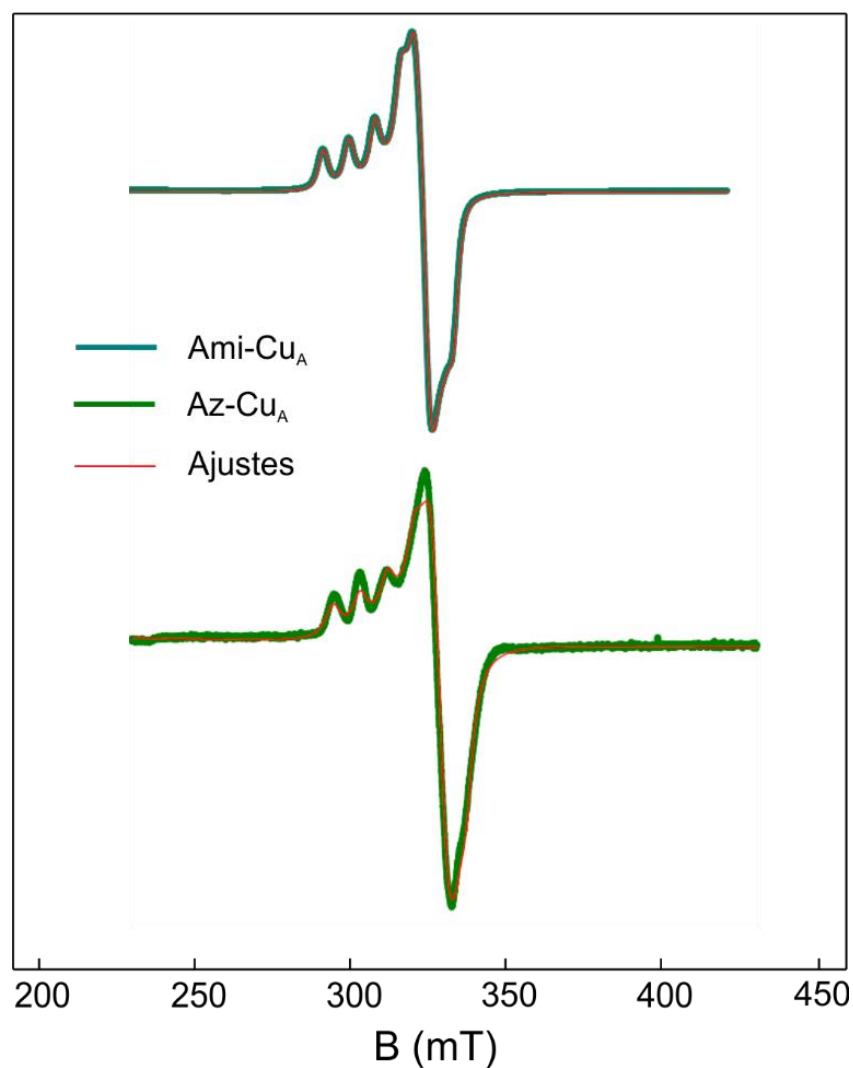


Figura 5-13. Espectros EPR de Ami-Cu_A (arriba) y Az-Cu_A (abajo). A partir del espectro simulado (rojo) que mejor ajusta para cada espectro experimental se obtuvieron los parámetros g y A detallados en la tabla 5-2.

Tabla 5-2. Valores de los parámetros $g_{\perp}$, $g_{\parallel}$, $A_{\perp}$ y $A_{\parallel}$ obtenidos de los ajustes realizados a partir de los espectros EPR de Ami-Cu_A y Az-Cu_A (figura 5-13).

Parámetro	Ami-Cu _A	Az-Cu _A	Amicianina	Azurina
$g_{\perp}$	2,019	2,032	2,032	2,035
	2,066	2,059	2,047	2,054
$g_{\parallel}$	2,195	2,198	2,235	2,261
$A_{\perp}$ (mT)	2,4	2,8	0,6	1,4
	0,7	0,4	0,8	1,4
$A_{\parallel}$ (mT)	8,6	8,7	5,4	5,3

Por otra parte, los desplazamientos químicos (δ) y los anchos de banda observados en los espectros de RMN paramagnético son también similares a los reportados para proteínas T1^{97,98} (figura 5-14). A partir de experimentos diferenciales de transferencia de saturación realizados sobre Ami-Cu_A y Az-Cu_A, tanto en sus formas oxidada como reducida, fue posible asignar algunas de las señales del espectro. Además, se adquirieron espectros con distintas proporciones de agua deuterada (D₂O) en la solución de medida, lo que permite estudiar el intercambio con el solvente de los distintos protones cercanos al sitio. En particular, se observa una disminución fuerte de la señal *c* en los espectros obtenidos de muestras en medio saturado de D₂O. Esta es la señal que corresponde al protón H _{ϵ} de alguna de las histidinas coordinantes en ambas proteínas (sin haberse podido discriminar cuál de ellas) según las asignaciones realizadas. Tal comportamiento se ha observado en otros sitios T1 para los H _{ϵ} imidazólicos, y refleja un intercambio protónico con el solvente indicativo de un sitio redox con cierto grado de accesibilidad.

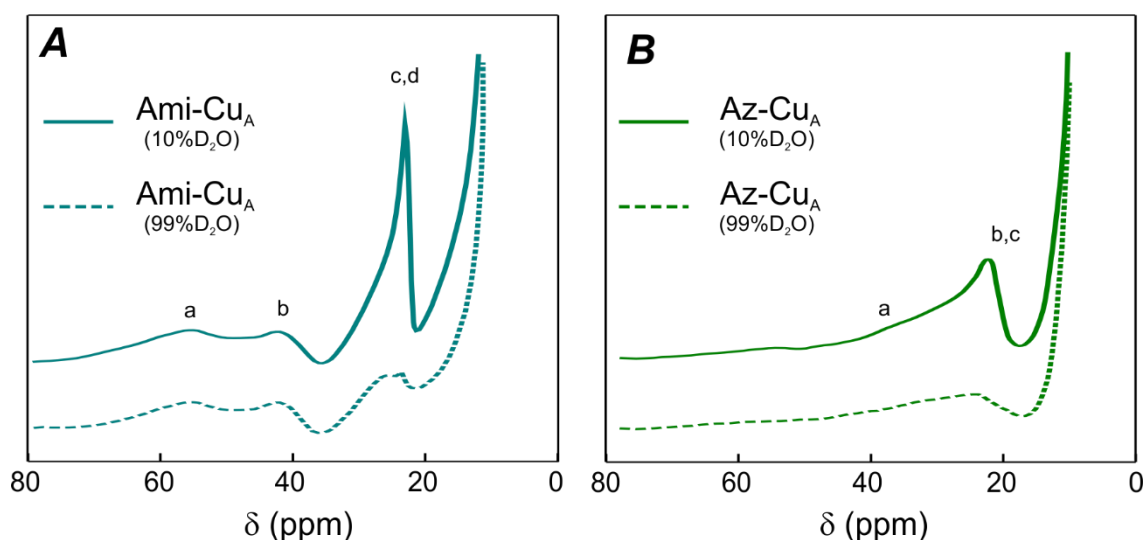


Figura 5-14. Espectros RMN paramagnético de (A) Ami-Cu_A y (B) Az-Cu_A, en un medio con 10% de D₂O (línea llena) y en otro con 99% de D₂O (línea punteada). La desaparición de la señal *c* en ambos es indicativa del intercambio del H _{ϵ} de alguna de las dos histidinas coordinantes.

Hasta aquí, Ami-Cu_A y Az-Cu_A corroboran los rasgos espectroscópicos generales típicos de las proteínas T1, pero con algunas características particulares distintas de los sitios nativos. Los resultados obtenidos a partir de los espectros EPR y especialmente los espectros UV-Vis indican que ambos modelos presentan sitios T1 “perturbados”, es decir, con una geometría de mayor carácter tetragonal, en contraste a la geometría de tipo axial de la Azurina y la Amicianina. Sin embargo, ninguna de las técnicas empleadas

permite acceder de manera directa a parámetros estructurales del sitio activo. Por el contrario, las conclusiones sobre su geometría se desprenden del modelo de distorsión acoplada que, si bien se apoya sobre sólidas bases teóricas y antecedentes experimentales, cuenta con ejemplos controversiales y modelos alternativos que plantean la posibilidad de otros mecanismos operando sobre las propiedades espectroscópicas de algunos sitios T1^{6,66,99}.

5.2.2- Ami-Cu_A: Estructura cristalográfica y cálculos computacionales

Para determinar la estructura tridimensional de las quimeras mediante difracción de rayos X se obtuvieron cristales tanto de Ami-Cu_A como de Az-Cu_A (ver detalles en la sección 2.4.4). Mientras que los cristales de Az-Cu_A resultaron de calidad insuficiente, los resultados a partir de Ami-Cu_A fueron exitosos. Se logró obtener una estructura cristalográfica compuesta por ocho proteínas de Ami-Cu_A, que confirman el plegamiento del sitio T1, aunque presentando ciertas variaciones geométricas entre los ocho ejemplares (figura 5-15). A raíz de esta leve variabilidad estructural, los valores geométricos serán reportados como rangos de valores entre el mínimo y el máximo registrado para las ocho estructuras.

Como se resume en la tabla 5-3, las estructuras de Ami-Cu_A presentan distancias N_{His}-Cu en torno a los 2 Å, similares a las que exhiben los demás sitios T1. Las distancias S_{Cys}-Cu y S_{Met}-Cu, sin embargo, son más inusuales. Mientras que la proteína nativa Amicianina presenta una distancia S_{Cys}-Cu de 2,10 Å y una distancia S_{Met}-Cu de 2,91 Å, las distancias determinadas para Ami-Cu_A son de 2,28-2,49 Å (mayores) y 2,37-2,44 Å (menores), respectivamente⁹². Estos datos concuerdan con las conclusiones obtenidas de los resultados espectroscópicos bajo el modelo de distorsión acoplada, que plantea que los sitios tetragonales, perturbados y/o verdes presentan una elongación de la distancia S_{Cys}-Cu acompañada de una contracción de la distancia S_{Met}-Cu. Según este modelo, un tercer parámetro geométrico se vería modificado: el plano S-Cu-S se desplazaría hacia el plano N-Cu-N, aumentando el ángulo que conforman y llevando el sitio T1 hacia una disposición tetragonal¹¹. Este ángulo puede reducirse al ángulo S_{Met149}-Cu-N_{His152} (S_M-Cu-N_H), que es mayor en sitios tetragonales que en sitios axiales, y que mientras adopta un valor de 100° en Amicianina⁹², asciende a valores entre 120° y 130° en la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A (tabla 5-3).

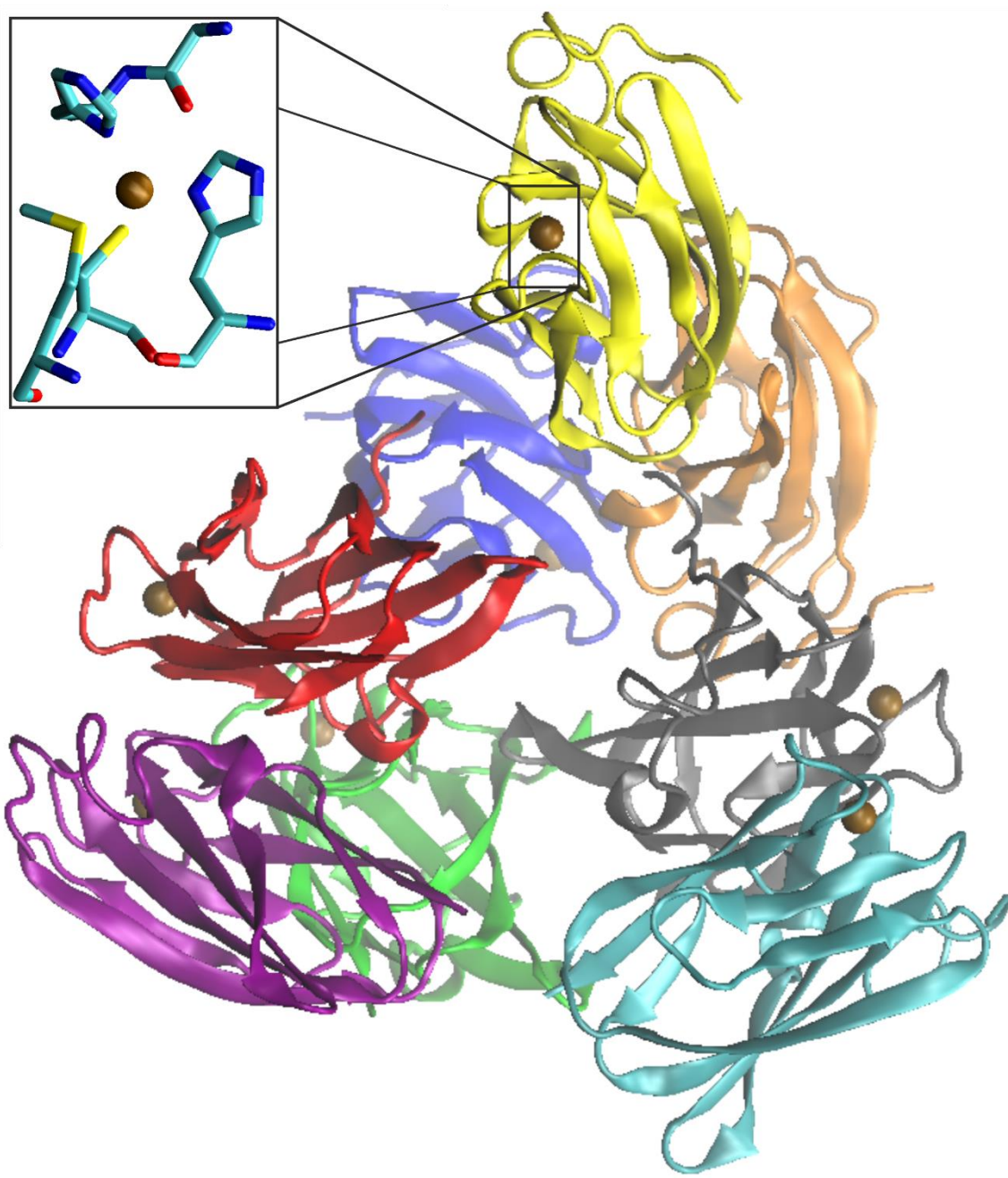


Figura 5-15. Imagen representativa de la estructura cristalográfica resuelta para Ami-Cu_A. Se distinguen con distintos colores las 8 moléculas de la proteína en el motivo repetitivo del cristal (celeste, violeta, verde, gris, rojo, rosa, azul, naranja y amarillo) y el átomo de cobre (bronce) en el sitio redox de cada una.

Tabla 5-3. Valores de distancias y ángulos relevantes del sitio T1 de Ami-Cu_A (experimental), Amicianina (literatura) y NiR (literatura). ^{Ct}N_{His} se refiere al N_δ (ligante) de la histidina C-terminal, es decir, la que está en el bucle ligante (His152 en Ami-Cu_A), y ^{Nt}N_{His} al N_δ (ligante) de la histidina N-terminal (His114 en Ami-Cu_A). Los valores para Ami-Cu_A están expresados como rangos entre los valores extremos de los ocho ejemplares que conforman la estructura cristalográfica.

Parámetros	Ami-Cu _A	Amicianina ⁹²	NiR ³⁵
S _{Cys} -Cu (Å)	2,28 - 2,49	2,10	2,17
S _{Met} -Cu (Å)	2,37- 2,44	2,91	2,57
^{Ct} N _{His} -Cu (Å)	1,91 - 2,08	2,03	2,06
^{Nt} N _{His} -Cu (Å)	2,16 - 2,26	1,95	2,00
S _M -Cu-N _H (°)	120 - 128	100	131

El sitio T1 reportado de mayor carácter tetragonal es el de la NiR, razón por la cual fue utilizado como caso extremo para el desarrollo del modelo de distorsión acoplada¹¹. Los resultados aquí presentados no sólo confirman la distorsión del sitio T1 de Ami-Cu_A respecto del de Amicianina hacia un sitio tetragonal, sino que la señalan como un caso aún más extremo que la NiR. Esta última presenta distancias S_{Cys}-Cu y S_{Met}-Cu de 2,17 Å y 2,57 Å respectivamente, lo que se encuentra a mitad de camino entre la Amicianina silvestre y la Ami-Cu_A, mientras que el ángulo S_M-Cu-N_H resulta similar al de Ami-Cu_A^{7,35} (tabla 5-3). Sin embargo, el correlato del detalle estructural sobre los espectros UV-Vis señala que el R_L, que vale 0,1 para los sitios azules, adopta valores de 1,7 para la NiR y 1,2 para Ami-Cu_A (ver figura 5-10, figura 5-12 y tabla 5-3). Este dato debe ser considerado cuidadosamente, ya que estudios realizados sobre la NiR indican que a temperatura ambiente coexisten dos especies, con distinta descripción estructural del sitio activo y por lo tanto distintas propiedades espectroscópicas, siendo su espectro UV-Vis la suma de los espectros de ambas especies⁶⁶. Por otra parte, la variabilidad entre las ocho proteínas de la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A señala la posibilidad de que las distancias y ángulos observados no sean representativos de la proteína en equilibrio y/o respondan a más de un mínimo estructural. Más aún, se han reportado estudios sobre una mutante de segunda esfera de la Amicianina, que presenta características espectroscópicas de un sitio T1 distorsionado tetragonalmente, pero que fueron racionalizadas por los autores en términos del poblamiento de un estado excitado accesible, en el cual la TCLM adopta un carácter σ⁹⁹. La información brindada por la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A no permite distinguir si configura un caso similar a alguno de los antecedentes mencionados, o si representa un sistema novedoso en este sentido. Con el objeto de profundizar en la descripción estructural del sitio de Ami-Cu_A se decidió abordar a este sistema desde la química computacional. Todos las simulaciones y cálculos computacionales desarrollados a partir de este punto y a lo largo

de la sección, fueron llevados a cabo en colaboración interna del laboratorio con el Dr. Damián Álvarez-Paggi.

En primer lugar, se seleccionaron tres de las ocho estructuras disponibles con el fin de minimizar la utilización innecesaria de recursos computacionales y de tiempo de trabajo. El criterio utilizado para la selección fue el de tomar dos casos extremos y uno intermedio en cuanto a las distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$, de manera que se eligió la estructura con mayor distancia $S_{\text{Cys-Cu}}$, la estructura con mayor distancia $S_{\text{Met-Cu}}$ y una estructura que presentara valores similares para ambas distancias. Esta selección también permitió explorar la totalidad de la amplitud de ángulos $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ de la estructura cristalográfica. Los modelos reducidos sobre los cuales se realizaron los cálculos cuánticos (QM) incluyen sólo los ligandos de primera esfera (His 114, Cys149, His152 y Met155) y el átomo de cobre de cada estructura, descartando el resto de la proteína. Se realizaron para los tres casos dos minimizaciones u optimizaciones de energía distintas: en una se aplicaron restricciones a la posición de los carbonos α ($\text{C}\alpha$) de los cuatro ligandos, emulando las imposiciones estéricas de la matriz proteica (estado entático), mientras que en la otra minimización no fue aplicada restricción alguna (ver detalles en la sección 2.4.5). Los resultados indican que, para las tres estructuras iniciales, e incluso indistintamente de la presencia o ausencia de restricciones en los cálculos de minimización, todas las estructuras obtenidas presentan distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$ y ángulos $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ similares, con variaciones inferiores a los 0,04 Å y 10 ° (tabla 5-4). El hecho de que las distintas estructuras iniciales converjan a la misma geometría aún en ausencia de restricciones es un indicio de que posiblemente correspondan a un mismo mínimo estructural. No obstante, son necesarias simulaciones más costosas (dinámica molecular, Monte Carlo, etc.) para una caracterización de la superficie de energía potencial, lo que permitiría descartar (o encontrar) otro mínimo térmicamente accesible. Actualmente se llevan a cabo esfuerzos en nuestro laboratorio para profundizar este aspecto de la caracterización computacional de Az-Cu_A.

En una segunda instancia, se decidió estudiar el efecto de perturbaciones geométricas impuestas arbitrariamente al sitio T1 de Ami-Cu_A. La estrategia utilizada consiste en fijar el valor de un parámetro estructural seleccionado (una distancia o un ángulo), aplicar una restricción que lo mantenga inalterable y minimizar la energía del sistema en esas condiciones (ver detalles en la sección 2.4.5). Así, se fijaron distintos valores para las distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$, y para el ángulo $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (por separado), monitoreándose la geometría del sitio tras cada minimización (tabla 5-5). Según el modelo de distorsión acoplada, el acercamiento de la metionina produciría un alejamiento de la cisteína en similar medida y *vice versa*, esperándose una inversión en la relación de distancias^{11,62}. Sin embargo, los resultados obtenidos no reproducen las predicciones que se desprenden del modelo, ya que ambas distancias S-Cu no parecen estar acopladas. El fuerte acortamiento de la distancia $S_{\text{Met-Cu}}$ (a menos de 2 Å) produce un tenue aumento de la distancia $S_{\text{Cys-Cu}}$ (de 0,06 Å), mientras que el aumentar esta

última en 1 Å tiene un efecto muy leve sobre la distancia $S_{\text{Met-Cu}}$ (de 0,13 Å). Del mismo modo, llevar el ángulo $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ hasta casi 180° genera una elongación de ambas distancias S-Cu, pero de baja magnitud (tabla 5-5). Cambios tan pequeños en estas distancias y ángulos son del orden de las variaciones observadas en la literatura para estructuras reportadas de la misma proteína, como por ejemplo los distintos reportes estructurales de la NiR, por lo que no resultan significativos ^{35,100}. Por lo tanto, según estos resultados la corta distancia $S_{\text{Met-Cu}}$ se debería a una imposición de la matriz proteica sobre la estructura del sitio redox.

Tabla 5-4. Valores de las distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$ y el ángulo $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ de tres estructuras cristalográficas de Ami-Cu_A (las cadenas F, G y H del archivo PDB) antes y después de las optimizaciones (Opt) hechas con restricciones (CR) y sin ellas (SR).

Cadena F	Inicial	Opt SR	Opt CR
$S_{\text{Cys-Cu}}$ (Å)	2,28	2,22	2,22
$S_{\text{Met-Cu}}$ (Å)	2,44	2,37	2,40
$S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (°)	127	117	126

Cadena G	Inicial	Opt SR	Opt CR
$S_{\text{Cys-Cu}}$ (Å)	2,49	2,21	2,22
$S_{\text{Met-Cu}}$ (Å)	2,37	2,38	2,41
$S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (°)	121	122	127

Cadena H	Inicial	Opt SR	Opt CR
$S_{\text{Cys-Cu}}$ (Å)	2,37	2,22	2,22
$S_{\text{Met-Cu}}$ (Å)	2,37	2,39	2,42
$S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (°)	125	127	128

Tabla 5-5. Valores de las distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$ y el ángulo $S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ tras la minimización con tres restricciones geométricas forzadas y una cuarta minimización sin restricciones (replicando un resultado de la tabla 5-4) utilizando la cadena G. Se destacan en rojo los valores fijados en las optimizaciones.

Parámetro fijo	$S_{\text{Cys-Cu}}$ (Å)	$S_{\text{Met-Cu}}$ (Å)	$S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (°)
$S_{\text{Cys-Cu}}$ (3,21 Å)	3,21	2,25	145
$S_{\text{Met-Cu}}$ (1,98 Å)	2,27	1,98	126
$S_{\text{M-Cu-N}_\text{H}}$ (179,9°)	2,31	2,42	179,9
Sin restricciones	2,21	2,38	122

A partir de cada la minimización del sitio activo con restricciones en los distintos parámetros geométricos se simuló su espectro UV-Vis, para lo cual se empleó TD-DFT (ver detalle en la sección 2.4.5). Estos espectros se calcularon a distintos valores fijos de las distancias S_{Cys-Cu} y S_{Met-Cu} y en dos series distintas: en una de ellas se elongó sistemáticamente la distancia S_{Cys-Cu} , y en la otra se contrajo sistemáticamente la distancia S_{Met-Cu} (figura 5-15). Los resultados muestran claras tendencias sobre la posición de la banda de TCLM $S_{Cys} \rightarrow Cu$, que se desplaza hacia menores energías ante el alejamiento de la cisteína (y disminuye progresivamente su intensidad) y a mayores energías ante el acercamiento de la metionina axial. En este último caso se observa además un corrimiento de las bandas $d \rightarrow d$ hacia energías mayores y la aparición de una nueva banda cercana a 400 nm, como la observada en los espectros de Ami-Cu_A y de NiR, asignada en el caso de esta última a la TCLM $S_{Met} \rightarrow Cu$ por los autores⁷ (figura 5-15 B). Esta asignación es consistente con la perturbación que provoca la aparición de la banda, a saber, el acercamiento de la metionina axial. A su vez, el aumento de energía de las bandas $d \rightarrow d$ es consistente con lo observado en otros sitios T1 verdes^{11,62}.

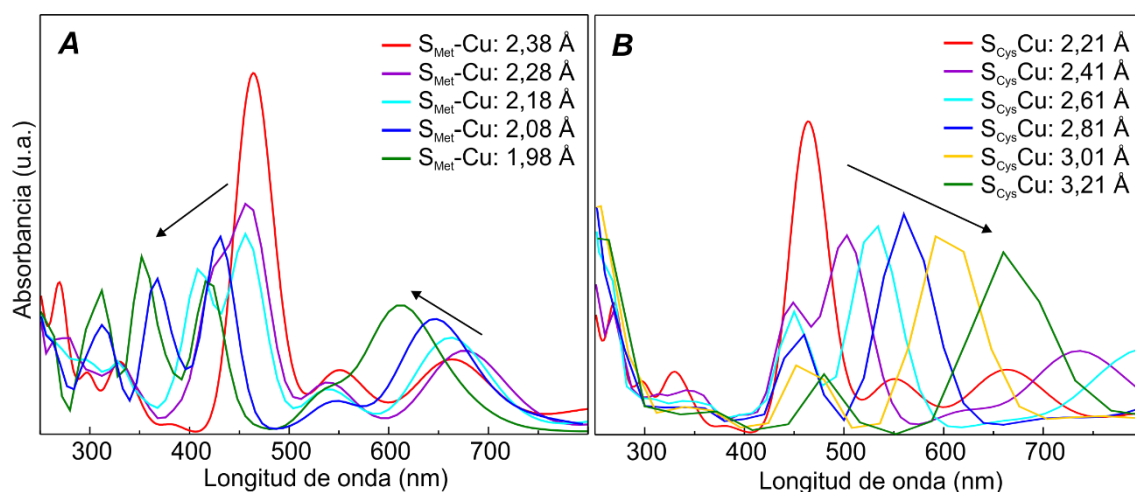


Figura 5-15. Espectros simulados a partir de la estructura del sitio T1 de Ami-Cu_A optimizada bajo distintas restricciones geométricas: (A) valores entre 0,38 y 1,98 Å de la distancia S_{Met-Cu} y (B) valores entre 2,21 y 3,21 Å de la distancia S_{Cys-Cu} . Las flechas indican la tendencia observada en cada caso.

Los resultados computacionales indican, en primer lugar, que es la matriz proteica la que impone la geometría del sitio T1 (estado entático), y en particular las distancias y ángulos más relevantes para sus propiedades espectroscópicas. De hecho, el espectro generado a partir de la geometría obtenida de la minimización sin restricciones (figura 5-15 rojo) no reproduce ningún resultado experimental, sin embargo, el alejamiento de la cisteína produce un espectro UV-Vis similar al de Amicianina, mientras que el

acercamiento de la metionina produce un espectro UV-Vis con las características generales del de Ami-Cu_A. En segundo lugar, estos resultados sugieren que tales distancias y ángulos no están acoplados entre sí, al menos para el caso de Ami-Cu_A, ya que fuertes cambios en cada uno de ellos repercuten tenuemente en los demás (tabla 5-5). En tercer lugar, la comparación de los espectros UV-Vis simulados con los experimentales muestra que en Ami-Cu_A la distancia S_{Met}-Cu se encuentra comprimida (por efecto de la matriz proteica) respecto del equilibrio irrestricto. No obstante, las comparaciones son cualitativas y en ningún caso se logra recrear el espectro experimental con precisión. Claramente, se requiere para ello un estudio computacional más exhaustivo.

5.2.3- Caracterización electroquímica de Ami-Cu_A y Az-Cu_A

Se llevaron a cabo VCs en solución de Ami-Cu_A y Az-Cu_A utilizando el mismo armado experimental que para las medidas electroquímicas de Tt-Cu_A en solución, esto es, un electrodo de trabajo de oro policristalino recubierto con una monocapa de 6-mercaptop-1-hexanol (SH-(CH₂)₆-OH), un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl 3,5M en una celda electroquímica no isotérmica (ver detalles en las secciones 2.2 y 3.2.3). Las dos quimeras presentaron señales voltamétricas nítidas sin la presencia de cuplas espurias, con las características típicas de una respuesta electroquímica reversible en solución ¹⁰¹⁻¹⁰⁴ (figura 5-16).

En ambos voltagramas se pueden apreciar picos de corriente faradaica con decaimientos típicamente difusionales. Tanto la intensidad de corriente en el máximo de los picos anódico y catódico como el área de cada uno de ellos (I_{pa} , I_{pc} , A_{pa} y A_{pc} respectivamente) resultan levemente asimétricos en los dos casos (tabla 5-6). Este bajo grado de asimetría permite descartar la degradación o la aparición de reacciones secundarias para alguna de las formas redox (en cuyo caso se esperarían asimetrías más pronunciadas y la no recuperación de la señal), aunque es un diagnóstico cualitativo de un proceso no completamente reversible. La separación entre picos de corriente (ΔE_p) en ambos casos es ligeramente mayor que los 57 mV esperables para una reacción ideal y totalmente reversible (tabla 5-6). Los parámetros presentados en la tabla 5-6 fueron obtenidos a una velocidad de barrido (v) de 50 mV/s, pero el valor de ΔE_p no disminuye significativamente a velocidades menores. El ancho de pico a media altura (FWHM) presenta valores de ≈ 120 mV en ambos voltagramas, es decir, unos 30 mV por encima del valor ideal para una reacción de TE completamente reversible (tabla 5-6).

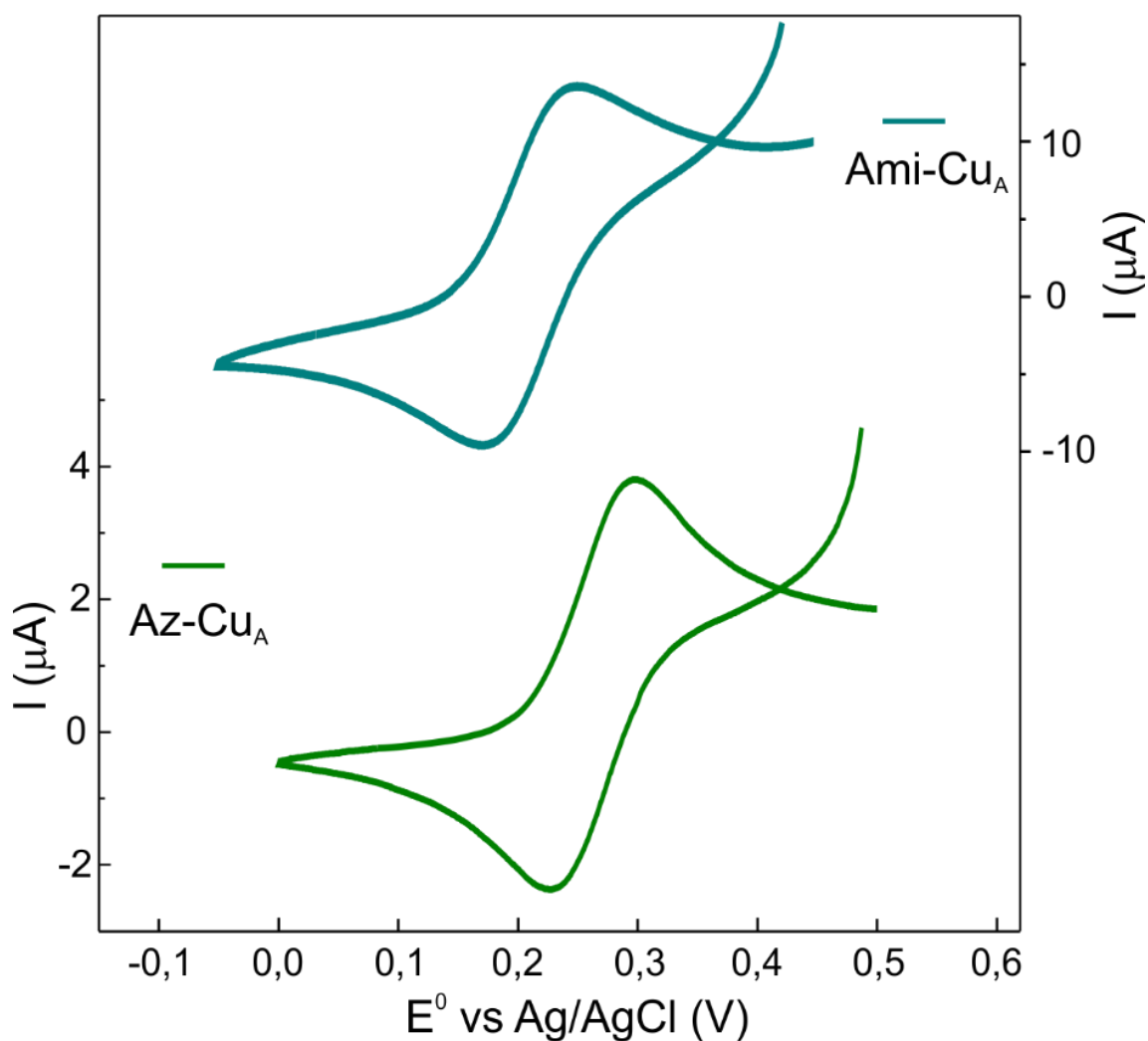


Figura 5-16. Voltagramas de Ami-Cu_A (arriba) y Az-Cu_A (abajo) medidos a 50 mV/s en buffer fosfato 10 mM (con 500 mM de KNO₃ como electrolito soporte) a pH 7,0 y a 298 K. Los parámetros relevantes de ambos voltagramas se detallan en la tabla 5-6.

Tabla 5-6. Valores de I_{pa}/I_{pc} , A_{pa}/A_{pc} , ΔE_p , FWHM de los picos anódico y catódico y E^0 estimado como el promedio de ambos picos. Los distintos valores fueron obtenidos a partir de los voltagramas preliminares de Ami-Cu_A y Az-Cu_A (figura 5-16).

Parámetro	Ami-Cu _A	Az-Cu _A
I_{pa}/I_{pc}	1,051	1,118
A_{pa}/A_{pc}	1,255	1,124
ΔE_p (mV)	69	68
FWHM (mV)	125 - 122	119-116
E^0 vs Ag/AgCl (mV)	217	282

En resumen, tanto Ami-Cu_A como Az-Cu_A muestran respuestas electroquímicas cuasi reversibles, lo cual valida la utilización de la VC para obtener información relevante de la reacción de TE. Un aspecto destacable es que los valores de E^0 se encuentran significativamente por encima de los que presentan los respectivos sitios nativos. Los E^0 se estimaron como el promedio entre E_{pa} y E_{pc} , obteniéndose valores de 217 mV y 282 mV (vs Ag/AgCl) para Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente, lo cual representa un aumento en torno a los 200 mV respecto del sitio nativo en cada caso ^{64,105–107} (tabla 5-6). Con el objetivo de discriminar las contribuciones entálpica y entrópica al valor de E^0 (ΔH^0 y ΔS^0 respectivamente), se realizaron VCs en función de la temperatura en el rango de 5 a 40 °C. Se adquirieron voltagramas a distintas v para cada valor de temperatura ensayado, obteniendo así valores promediados de E^0 . En todos los casos se verificó la reversibilidad térmica de los voltagramas obtenidos, descartando fenómenos de histéresis y degradación térmica dentro del rango estudiado (figura 5-17).

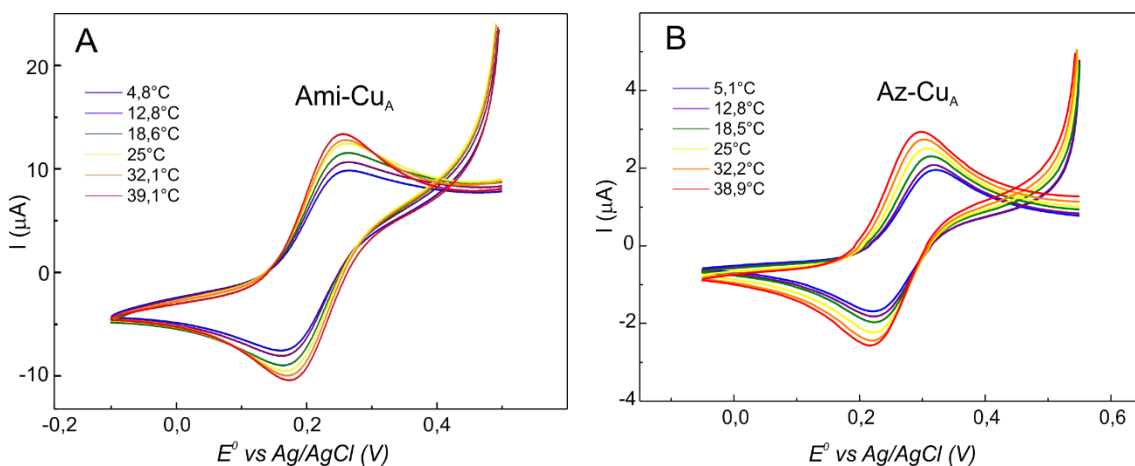


Figura 5-17. Voltagramas de (A) Ami-Cu_A y (B) Az-Cu_A medidos a 100 mV/s en buffer fosfato 10 mM (con 500 mM de KNO₃ como electrolito soporte) a pH 7,0 y a temperaturas entre 278 K y 312 K. El orden de las medidas fue aleatorio, descartándose así cualquier fenómeno de histéresis térmica.

Los valores de ΔH^0 y ΔS^0 fueron obtenidos mediante regresiones lineales realizadas a partir de los datos experimentales, empleando las siguientes ecuaciones (figuras 5-18 y 5-19):

$$\Delta H^0 = -nF \frac{\partial(E^0/T)}{\partial(1/T)} \quad (1)$$

$$\Delta S^0 = nF \left(\frac{\partial E^0}{\partial T} \right) \quad (2)$$

donde F es la constante de Faraday y n es la cantidad de electrones intercambiados en la reacción de TE, que en todas las proteínas de cobre reportadas vale 1 (ver detalles en la sección 3.2.3). Los valores obtenidos se presentan en la tabla 5-7. Es importante señalar que existe abundante evidencia que demuestra una tendencia generalizada de las cupredoxinas a presentar un aumento del E^0 con la disminución del pH^{3,11,13,33,87,105}. Por lo tanto, todas las medidas en solución reportadas en esta sección, al igual que aquellas citadas de literatura para los análisis comparativos, corresponden a pH7,0.

Tabla 5-7. Valores de ΔH° y ΔS° expresados en su forma típica y también en mV a 25°C para evaluar la contribución al E^0 . Los datos de Ami-Cu_A y Az-Cu_A (destacados en verde) se obtuvieron a partir de los ajustes presentados en las figuras 5-18 y 5-19 sobre las medidas electroquímicas en función de la temperatura. Se presentan además datos termodinámicos extraídos de bibliografía sobre Amicianina de *P. denitrificans*⁶⁴ y *P. versutus*¹⁰⁷; y también sobre Azurina de *P. aeruginosa*¹⁰⁵, *P. denitrificans*¹⁰⁸ y *P. faecalis*¹⁰⁶.

Proteína	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-\Delta H^\circ/nF$ (mV)	$T\Delta S^\circ/nF$ (mV)	E° (NHE) (mV)	E° (Ag/AgCl) (mV)
Ami-Cu _A	-37 (<u>+1</u>)	10 (<u>+1</u>)	387 (<u>+5</u>)	31 (<u>+3</u>)	418 (<u>+8</u>)	213 (<u>+8</u>)
Amicianina (<i>P. denitrificans</i>)	-	-	-	-	294	89
Amicianina (<i>P. versutus</i>)	-29	-13	296	-41	255	50
Az-Cu _A	-60 (<u>+1</u>)	-48 (<u>+2</u>)	618 (<u>+5</u>)	-148 (<u>+4</u>)	470 (<u>+9</u>)	265 (<u>+9</u>)
Azurina (<i>P. aeruginosa</i>)	-50	-68	517	-210	307	102
Azurina (<i>P. denitrificans</i>)	-36	-32	375	-99	276	71
Azurina (<i>P. faecalis</i>)	-43	-58	445	-179	266	61

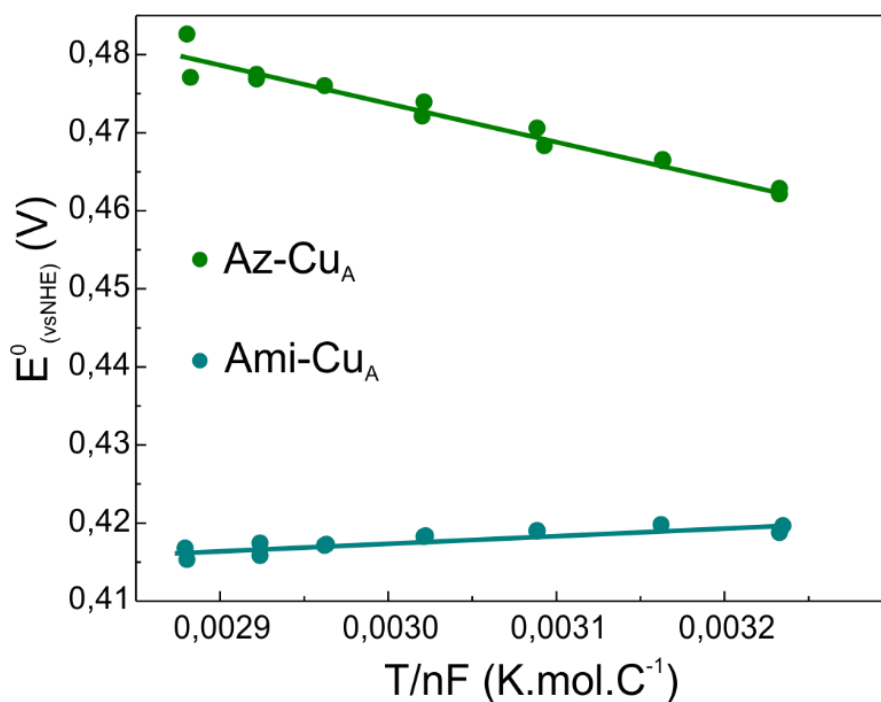


Figura 5-18. E^0 en función de la temperatura para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde) a partir de los datos obtenidos de la figura 5-17. El valor de las pendientes de los ajustes lineales corresponde a la entropía de la reacción de TE según la ecuación (2).

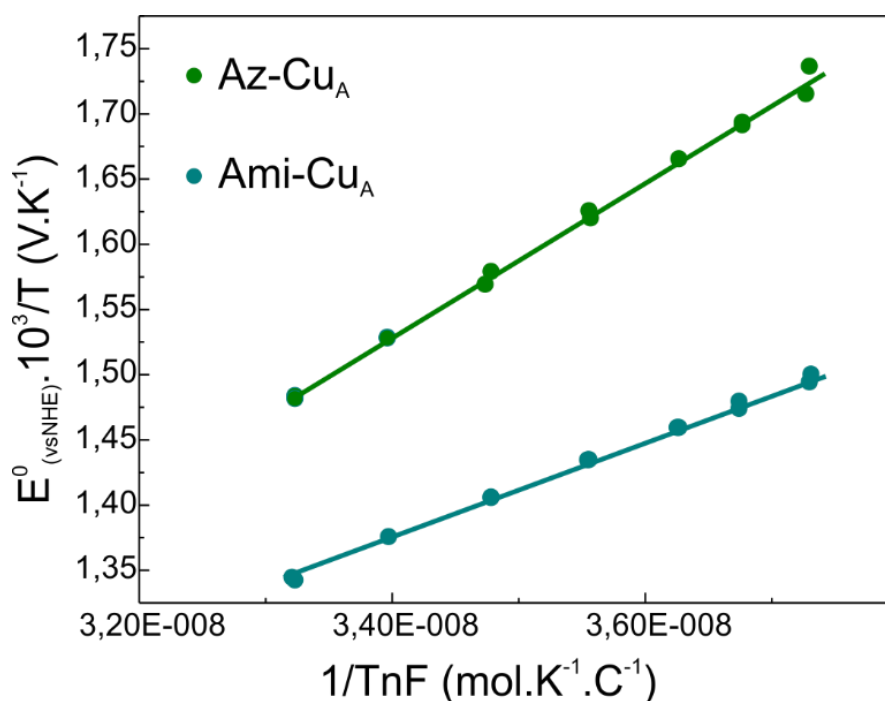


Figura 5-19. E^0/T en función de la inversa de la temperatura para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde) a partir de los datos obtenidos de la figura 5-17. El valor de las pendientes de los ajustes lineales corresponde a la entalpía de la reacción de TE según la ecuación (1).

Como se muestra en la tabla 5-7 por algunos ejemplos extremos tomados de literatura, las Amicianinas y Azurinas nativas provenientes de diferentes organismos presentan cierta variabilidad en el valor del E^0 . Notablemente, el valor de E^0 para la quimera Ami-Cu_A se encuentra entre 124 mV y 163 mV por encima de los reportados para distintas Amicianinas, mientras que Az-Cu_A presenta un E^0 entre 163 mV y 204 mV superior a los de cualquier Azurina silvestre ^{64,105,107,109} (tabla 5-7). Este es un resultado particularmente interesante teniendo en cuenta que en ambos casos se preserva la primera esfera de coordinación (y gran parte de la segunda esfera) intacta y que la matriz proteica conserva las mismas características generales que las presentes en las variantes nativas. La azurina ha sido un modelo muy utilizado para la generación de mutantes puntuales de primera y segunda esfera de coordinación con el objetivo de manipular sus propiedades funcionales ^{110,111}. Los trabajos más recientes han conseguido, a partir de mutaciones puntuales combinadas y cambios de pH, una amplitud de valores del E^0 mayor a los 700 mV ¹¹². Sin embargo, no existe reporte alguno de variantes mutagénicas de azurina que, con su primera esfera de coordinación intacta, presenten un E^0 tan elevado como el de Az-Cu_A (tabla 5-7). Efectos tan pronunciados sólo han sido logrados a partir de la combinación de mutaciones de segunda esfera con algunas mutaciones puntuales de la metionina axial. Estos resultados ponen en evidencia un claro rol protagónico de la matriz proteica en la modulación del valor del E^0 , que puede ser incluso de magnitud similar a la ejercida por los ligandos del ion metálico y de segunda esfera.

La evidencia acumulada sobre distintas cupredoxinas indica que la contribución mayoritaria al valor de E^0 es la entálpica, no obstante, la contribución entrópica suele ser también significativa ^{105,107}. Los valores de ΔH° y ΔS° obtenidos para ambas proteínas quiméricas muestran que esta característica general se preserva, siendo en ambos casos muy superior en módulo el término entálpico del E^0 (tabla 5-7). En el caso de Ami-Cu_A, el aumento del E^0 en 163 mV respecto de amicianina de *P. versutus* es producto de aumentos en ambas contribuciones, siendo mayor el de la entálpica (91 mV) que el de la entrópica (72 mV). El alto valor de E^0 en Az-Cu_A también responde a ambas contribuciones, con un ΔH° mayor en módulo y un ΔS° menos negativo que para las Azurinas silvestres (a excepción del ΔS° de la Azurina de *P. denitrificans*). Cabe señalar que, en este caso, la preponderancia de la contribución entálpica en el valor de E^0 es más pronunciada que en Ami-Cu_A. Tomando el ejemplo de la Azurina de *P. faecalis*, la contribución entálpica al valor de E^0 de Az-Cu_A ($-\Delta H^\circ/nF$) resulta 173 mV mayor, mientras que el de la contribución entrópica ($T\Delta S^\circ/nF$) es sólo 31 mV menor en módulo.

Los resultados revelan que tanto en Ami-Cu_A como en Az-Cu_A hay una mayor estabilización relativa de la forma reducida respecto de la oxidada y que esta

estabilización relativa es tanto de carácter entálpico como entrópico, aunque el primero es más pronunciado. Los estudios desarrollados en la sección anterior muestran que la distancia $S_{Met}-Cu$ en $Ami-Cu_A$ es menor que la observada en otras proteínas T1, lo que implica una mayor interacción entre ambos átomos, mientras que la distancia $S_{Cys}-Cu$ es mayor, disminuyendo su interacción. Esta diferencia respecto de otros sitios T1 tiene una repercusión directa en la componente entálpica de la reacción de TE, ya que implica una desestabilización relativa del estado oxidado frente al reducido. Así, la reducción de los sitios T1 quiméricos resulta entálpicamente más favorecida que en los sitios T1 nativos.

En cuanto al ΔS° , en la mayoría de las proteínas T1 reportadas, como Azurina y Amicianina, la reducción del sitio activo se encuentra entrópicamente desfavorecida, lo cual se atenúa en $Az-Cu_A$ y se revierte en $Ami-Cu_A$. Se ha reportado para distintos modelos de Citocromo *c* que la forma reducida presenta una rigidez estructural mayor que la forma oxidada, lo cual desfavorece entrópicamente la reducción del sitio activo¹¹³. Resultados similares en proteínas azules de cobre han sido interpretados en términos análogos, trazando un paralelismo con dicho fenómeno^{107,114}. Una hipótesis posible a partir de los datos experimentales es que, como resultado de la reconstrucción quimérica de ambos sitios T1, el sistema resulte más lábil, relajando al menos parcialmente la rigidez estructural de su forma reducida. Esta interpretación es consistente con la presencia de ocho estructuras similares en la estructura cristalográfica de $Ami-Cu_A$, que puede ser resultado de una menor rigidez respecto de la Amicianina nativa (figura 5-15). Sin embargo, son múltiples los factores que afectan la formación de cristales viables a partir de muestras proteicas, por lo que este fenómeno no es más que un indicio.

Por otro lado, se ha postulado que valores altos (o menos negativos) de ΔS° están asociados a sitios de mayor exposición a solvente en distintos grupos de proteínas redox,^{105,109}. En particular, se ha reportado que proteínas T1 con el sitio menos expuesto al solvente, como Plastocianina, Azurina o Amicianina presentan valores de ΔS° más negativos que otras con el sitio redox más expuesto, como Plantacianina, SBP o algunas lacasas. Como se desarrolló en la sección 5.2.1, los resultados obtenidos por RMN paramagnético a partir de medidas adquiridas con proporciones variables de D_2O en el medio sugieren que los sitios T1 de $Ami-Cu_A$ y $Az-Cu_A$ cuentan con sitios redox accesibles. A partir de estos resultados, resulta interesante el estudio de la accesibilidad al solvente de ambos sitios T1.

5.2.4- Coordinación reversible de un ligando exógeno

La estrategia utilizada para comprobar la accesibilidad del sitio activo de Ami-Cu_A y Az-Cu_A consistió en el agregado de una molécula pequeña que sea un potencial ligando del átomo de cobre en el sitio activo. La idea subyacente es que, si el sitio se encuentra suficientemente accesible a esta molécula de prueba, su coordinación al ion metálico generará un cambio espectral detectable. La molécula seleccionada fue el imidazol, por ser el grupo funcional de la cadena lateral de la histidina, partícipe de la primera esfera de coordinación de todos los sitios de cobre conocidos^{2,11,34,115–121}(ver sección 1.2.1).

El agregado de exceso de imidazol a ambas quimeras en sus estados oxidados en una relación molar de aproximadamente 100 a 1 (pH = 8,0) produce un inmediato y drástico cambio de color, del verde opaco característico a un amarillento más traslúcido. Estos cambios de color observables a simple vista se evidencian en los espectros UV-Vis como corrimientos generales de las bandas a energías mayores y por un claro aumento del valor del R_L (figura 5-20). La coordinación del imidazol al centro metálico de Ami-Cu_A para generar Ami-Cu_A(Imi) se caracteriza por un corrimiento de la banda d→d y de las bandas de TCLM S_{Cys}π→Cu y S_{Cys}σ→Cu hacia valores mayores de energía de 13950 cm⁻¹, 18900 cm⁻¹ y 23280 cm⁻¹, respectivamente. Por su parte, Az-Cu_A(Imi) muestra similares cambios respecto de Az-Cu_A: las bandas d→d y de TCLM S_{Cys}π→Cu y S_{Cys}σ→Cu se desplazan también a valores mayores, de 14650 cm⁻¹, 19490 cm⁻¹ y 24250 cm⁻¹, respectivamente. Además, en ambos casos desaparece la distintiva banda de TCLM S_{Met}→Cu y aumenta significativamente el cociente R_L, que adopta un valor de 2,5.

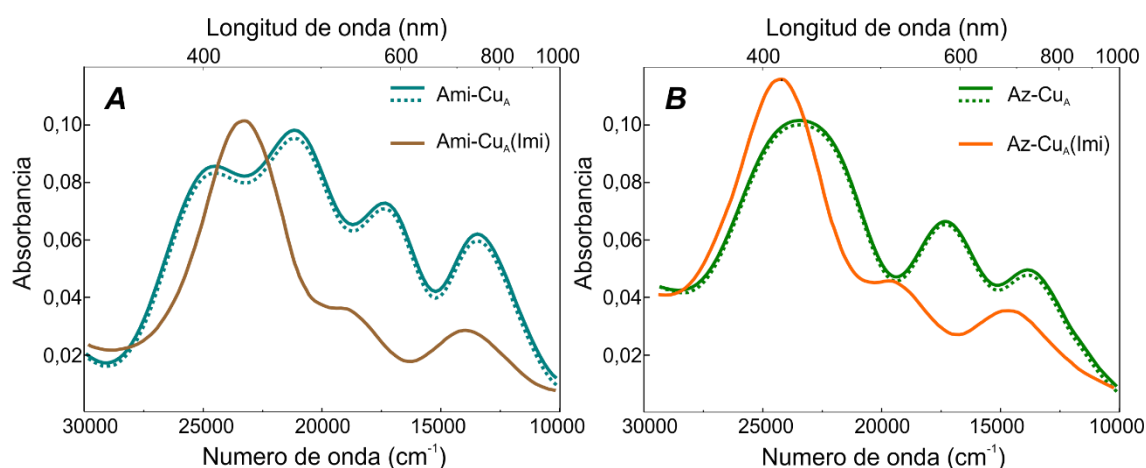


Figura 5-20. Espectros UV-Vis de (A) Ami-Cu_A y (B) Az-Cu_A antes (jade y verde respectivamente) y después (marrón y naranja respectivamente) del agregado de Imidazol al medio, hasta una concentración final de 50 mM. Las líneas punteadas corresponden a los espectros UV-Vis de ambas proteínas tras la remoción del imidazol en la solución, mostrando la reversibilidad de la entrada del ligando exógeno a la coordinación del sitio T1.

Se comprobó la reversibilidad de la entrada y coordinación del ligando exógeno al sitio activo de ambas quimeras removiendo el imidazol del medio por diálisis y volviendo a registrar el espectro UV-Vis de la muestra (figura 5-20). En primer lugar, no hay diferencias entre los espectros registrados antes del agregado del imidazol y después de su eliminación, por lo tanto, la entrada y salida del ligando exógeno se encuentra en un equilibrio dinámico, propio de un proceso reversible. En segundo lugar, no es esperable a priori que efectos de segunda esfera de coordinación o sobre la matriz proteica produzcan cambios espectrales de tal magnitud, razón por la cual estos resultados sugieren que el ligando exógeno se está incorporando efectivamente a la primera esfera de coordinación. Esto corrobora una mayor accesibilidad del solvente al sitio activo de ambas quimeras respecto de sus pares nativos (Amicianina y Azurina), como fue propuesto en la sección anterior a partir de las elevadas contribuciones entrópicas a la reducción del sitio. Sin embargo, es importante señalar que esta conclusión es únicamente válida para la proteína en su estado oxidado, ya que la ausencia de bandas en la región espectral del visible para las especies reducidas imposibilita su estudio mediante esta técnica simple.

Es notable que los espectros de Ami-Cu_A(Imi) y Az-Cu_A(Imi) se muestren tan similares entre sí, pero es aún más destacable su parecido con el de una proteína silvestre roja de cobre en particular: la Nitrosocianina ¹²² (figura 5-21 A). Esta proteína, aislada por primera vez de la bacteria *Nitrosomonas europaea*, es el primer caso conocido de un sitio de cobre T2 que presenta las características estructurales típicas del plegamiento conservado de las cupredoxinas. La primera esfera de coordinación difiere de la de los sitios T1, presentando un carbonilo amídico de una glutamina como ligando axial (en lugar del tioéter metionínico) y una molécula de agua exógena como cuarto ligando ecuatorial (además de las dos histidinas y la cisteína) ¹¹⁵. Así, la geometría del sitio activo de la Nitrosocianina se describe como una pirámide cuadrada, cuya base la componen dos histidinas, una cisteína y una molécula de agua, mientras que la glutamina axial se ubica en la cima (figura 5-21 B).

Esta proteína roja constituye un ejemplo muy útil para la interpretación de las características espectroscópicas de Ami-Cu_A(Imi) y Az-Cu_A(Imi). La particular geometría de su sitio activo produce una orientación del orbital Cu $d_{x^2-y^2}$ distinta de la que adopta en los sitios T1, generando una superposición de tipo σ con un orbital p del S_{Cys}. Además, la cuarta coordinación ecuatorial (la molécula de agua) produce un aumento de energía de los OAs del cobre, aumentando la energía tanto de las transiciones $d \rightarrow d$ como de las bandas de TCLM $S_{Cys}\pi \rightarrow Cu$ y $S_{Cys}\sigma \rightarrow Cu$ ^{62,115,122,123}. Esta descripción es consistente con lo observado en los espectros de ambos aductos, sugiriendo que el imidazol es capaz de introducirse en el sitio activo y coordinar al átomo de cobre, modificando así su geometría a una de tipo piramidal cuadrada.

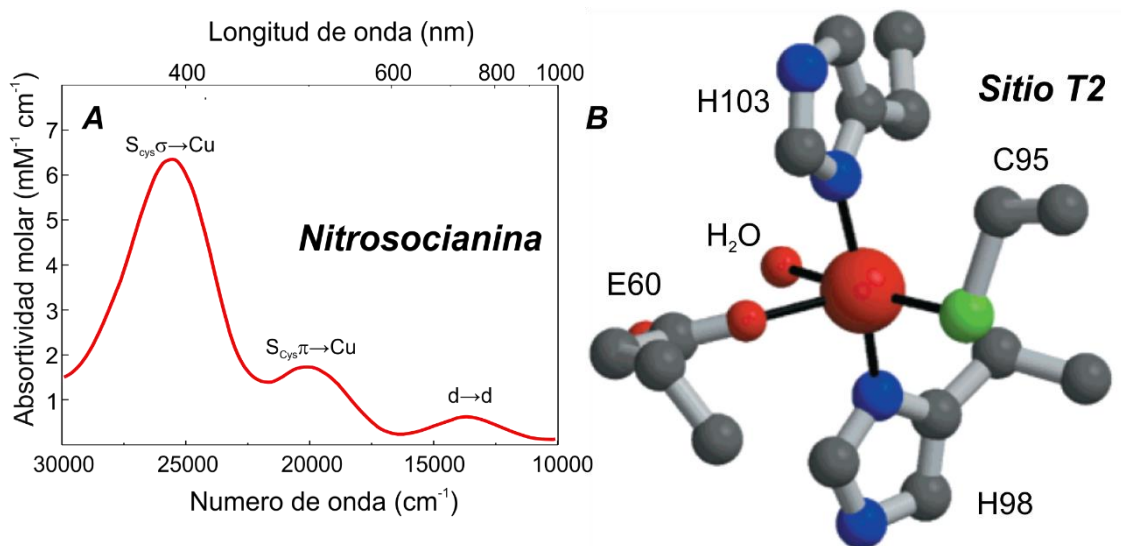


Figura 5-21. (figura adaptada de Arciero et al. 2002 ¹²² y Lieberman et al 2001 ¹¹⁵). (A) Espectro UV-Vis de la Nitrosocianina. (B) Estructura tridimensional de la primera esfera de coordinación de la Nitrosocianina.

El EPR es una técnica útil para el escrutinio del sitio activo de Ami-Cu_A(Imi) y Az-Cu_A(Imi), y en particular, para su comparación con el de la Nitrosocianina. Esta última, al igual que las proteínas T1, presenta en su espectro EPR las típicas bandas en la región de valores de g entre 2 y 2,3 debido al acoplamiento hiperfino del electrón desapareado con el núcleo del átomo de cobre, aunque presenta un valor de $A_{\parallel}$ significativamente mayor que los observados en proteínas T1 (y que se refleja en una mayor separación de las bandas) ^{122,123}. Dadas sus características estructurales y espectroscópicas, se inscribe (parcialmente) en el modelo de distorsión acoplada, por lo que no sólo responde a la relación $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,002$ sino que además presenta valores de $g_{\parallel}$ ligeramente superiores a los observados en sitios T1 verdes ^{122,123}. Estas características espectrales son indicativas de una geometría piramidal cuadrada, que la estructura cristalográfica de su forma oxidada corrobora ¹¹⁵. Los espectros EPR de Ami-Cu_A(Imi) y Az-Cu_A(Imi), al igual que los espectros UV-Vis, se presentan análogos a los reportados para la Nitrosocianina, recreando cualitativamente sus rasgos distintivos. En comparación con los espectros adquiridos de las quimeras en ausencia de imidazol, se observa el típico patrón de cuatro bandas más separadas que en los sitios T1 (figura 5-22). Los parámetros obtenidos muestran un aumento significativo tanto en los valores de $A_{\parallel}$ como de $g_{\parallel}$, corroborando la geometría piramidal cuadrada del sitio activo de ambas quimeras tras la incorporación del imidazol exógeno (tabla 5-8). Al igual que con los espectros UV-Vis, esta conclusión es únicamente válida para la proteína en su estado oxidado, dado que la ausencia de paramagnetismo en las especies reducidas inhabilita el empleo del EPR para su estudio.

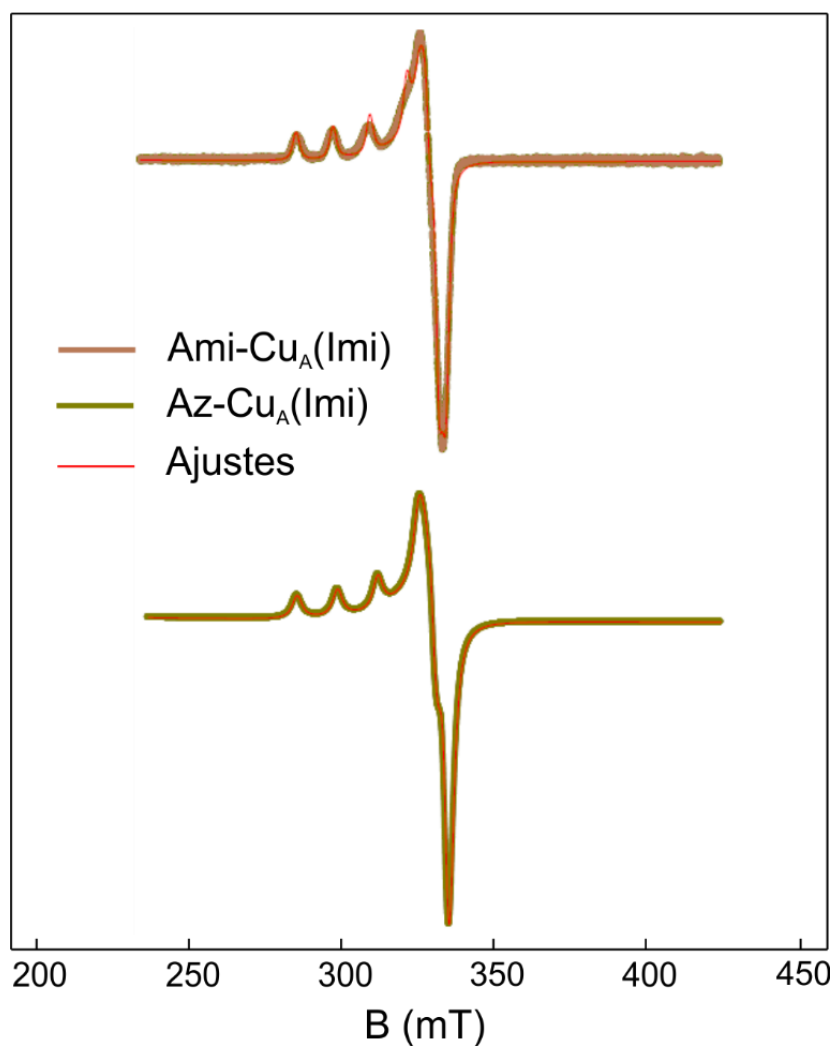


Figura 5-22. Espectros EPR de Ami-Cu_A(Imi) (arriba) y Az-Cu_A(Imi) (abajo). A partir del espectro simulado (rojo) que mejor ajusta para cada uno de los espectros experimentales se obtuvieron los parámetros g y A detallados en la tabla 5-8.

Tabla 5-8. Valores de los parámetros $g_{\perp}$, $g_{\parallel}$, $A_{\perp}$ y $A_{\parallel}$ obtenidos de los ajustes realizados a partir de los espectros EPR de Ami-Cu_A(Imi) y Az-Cu_A(Imi) (figura 5-20). Se incluyen también los valores obtenidos para Ami-Cu_A y Az-Cu_A de la figura 5-13 y presentados en la tabla 5-2 y los valores de literatura de la Nitrosocianina (NiCi) ¹²².

Parámetro	Ami-Cu _A (Imi)	Az-Cu _A (Imi)	Ami-Cu _A	Az-Cu _A	NiCi ¹²²
$g_{\perp}$	2,036	2,041	2,019	2,032	2,023
	2,058	2,053	2,066	2,059	2,067
$g_{\parallel}$	2,233	2,228	2,195	2,198	2,245
$A_{\perp}$ (mT)	0,8	0,9	2,4	2,8	-
	0,9	1,4	0,7	0,4	1,9
$A_{\parallel}$ (mT)	12,7	15,5	8,6	8,7	13,8

Para evaluar las propiedades redox de las formas $\text{Ami-Cu}_A(\text{Imi})$ y $\text{Az-Cu}_A(\text{Imi})$, y eventualmente de sus equilibrios de coordinación, se realizaron experimentos de VC en condiciones análogas a las desarrolladas en la sección anterior (ver detalles en las secciones 5.2.3 y 3.2.3). La solución de medida en este caso incluye imidazol 100 mM, asegurando un exceso de dos órdenes de magnitud respecto de la proteína, empleada en una concentración aproximada de 1 mM. Dado que el pKa del imidazol es 7,05; la solución de medida fue ajustada a pH 8,0 empleando K_2HPO_4 , de modo de favorecer la forma no protonada del ligando ¹²⁴. Se realizaron VCs comenzando la rampa voltamétrica tanto a potenciales oxidativos como a potenciales reductores (figura 5-23). Estabilizada en ambos casos la celda durante 10 segundos al potencial inicial fijo, se adquirieron voltagramas a 100 mV/s y a 25°C, observándose dos cuplas redox tanto para $\text{Ami-Cu}_A(\text{Imi})$ como para $\text{Az-Cu}_A(\text{Imi})$ (figura 5-23).

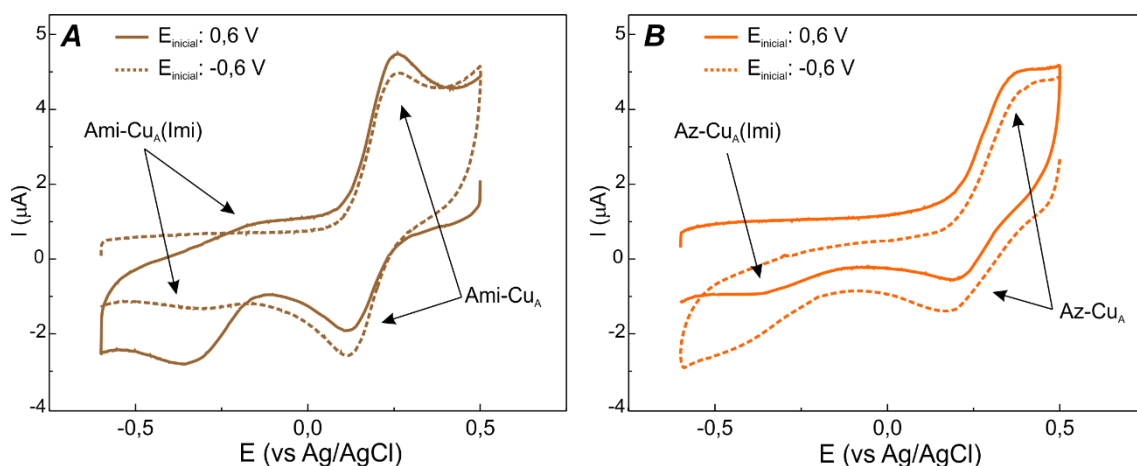


Figura 5-23. Voltagramas de (A) $\text{Ami-Cu}_A(\text{Imi})$ y (B) $\text{Az-Cu}_A(\text{Imi})$ adquiridos comenzando la rampa voltamétrica a potenciales 0,6 (línea continua) y -0,6 (línea punteada).

Estos resultados responden a la presencia de dos especies redox activas en la muestra, a saber, la quimera T1 con y sin el imidazol coordinando al Cu^{2+} . Una de las cuplas presenta un valor de E^0 de 0,19 y 0,24 V (vs Ag/AgCl) para Ami-Cu_A y Az-Cu_A , respectivamente, y corresponde a la proteína sin el ligando exógeno incorporado. En ambos casos, el valor del E^0 es menor al informado en la sección anterior, simplemente por efecto del pH, que en este caso es una unidad superior. Como ya ha sido comentado, en todas las cupredoxinas conocidas el aumento del pH genera una disminución en el valor del E^0 ^{3,11,13,33,87,105} (ver sección 5.2.3). La otra cupla redox corresponde a la proteína con el ligando exógeno incorporado, cuyo valor estimado de E^0 es -0,25 V para $\text{Ami-Cu}_A(\text{Imi})$, mientras que la ausencia de pico anódico impide tal estimación para $\text{Az-Cu}_A(\text{Imi})$. Por otra parte, la cupla correspondiente al aducto presenta una marcada asimetría en ambos casos, caracterizada por un valor de I_c muy superior al valor de I_a .

Esta asimetría sugiere que, una vez reducido el aducto, se libera rápidamente el ligando exógeno debido a la menor afinidad del centro metálico en estado reducido. Además, la cupla de la especie sin imidazol también presenta una asimetría en las intensidades de picos, aunque de menor magnitud y en sentido opuesto al de los aductos, es decir, con el pico anódico más intenso que el catódico ($I_c < I_a$). Esto es consecuencia de que ambos estados redox de las quimeras presentan distinta afinidad por el imidazol, por lo tanto, la cantidad total de proteína oxidada en las inmediaciones del electrodo de trabajo estará compuesta por una proporción de aducto mayor que la cantidad total de proteína reducida. El hecho de que tales asimetrías se atenúan cuando el voltograma es adquirido comenzando desde valores reductores de potencial, es una prueba de este fenómeno, ya que en ese caso se eliminan las especies oxidadas de la superficie del electrodo, disminuyendo así la proporción de aducto (figura 5-23).

Se realizaron experimentos de VC sobre los mismos sistemas experimentales, pero acidificando el medio (titulando con HClO_4 hasta pH 5) de manera de corroborar la afinidad selectiva por la molécula deprotonada de imidazol (figura 5-24). Los voltagramas muestran una clara disminución en la intensidad de corriente que corresponde con la cupla del aducto en ambos casos. Además, la cupla correspondiente a la proteína sin ligando exógeno recupera la simetría a pH 5, indicativo de la menor proporción de aducto.

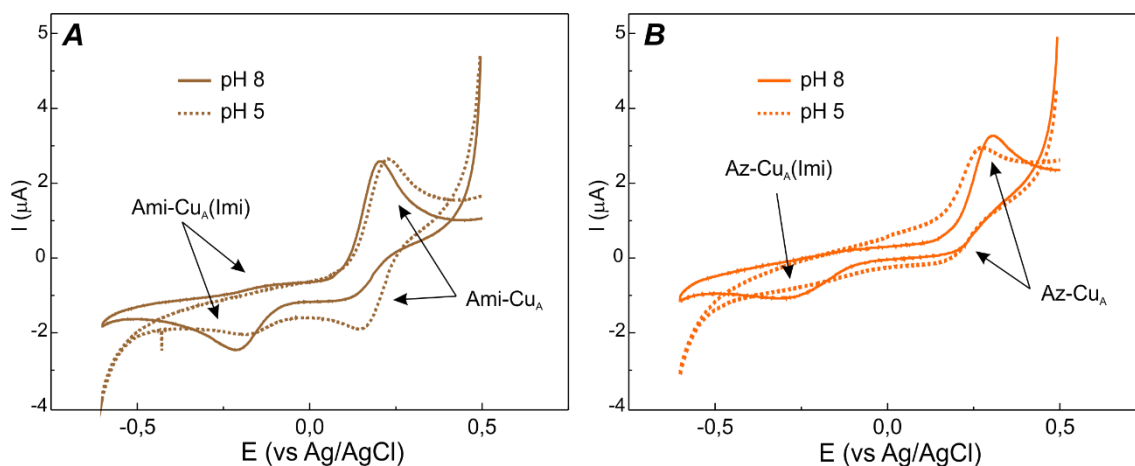


Figura 5-24. Voltagramas de (A) $\text{Ami-Cu}_A(\text{Imi})$ y (B) $\text{Az-Cu}_A(\text{Imi})$ adquiridos a pH 8 (línea continua) y a pH 5 (línea punteada).

Es interesante señalar que el sitio activo de la Nitrosocianina expulsa al H_2O coordinante tras la reducción, reincorporándolo en su forma oxidada, lo cual revela la diferencia de afinidad entre las formas oxidada y reducida, y el consecuente cambio de geometría. Además, resulta indicativo de un sitio accesible al solvente, ya que permite

la entrada y salida de moléculas de agua, de manera análoga a lo que ocurre con las quimeras verdes y la entrada y salida de imidazol al sitio activo. Esta característica dota al sitio T2 de la Nitrosocianina de un elevado valor de λ , con estimaciones por encima de 1 eV ^{115,122,123}, mientras que el valor de E^0 obtenido mediante una titulación potenciométrica es de -0,125 V (vs Ag/AgCl), muy por debajo de lo reportado para la gran mayoría de proteínas T1 ^{107,125}. A partir de la accesibilidad del sitio activo y del elevado valor de λ , se ha sugerido que esta proteína desempeña algún tipo de función catalítica. Tanto Ami-Cu_A(Imi) como Az-Cu_A(Imi) presentan valores de E^0 aún menores que la Nitrosocianina, y representan caídas de aproximadamente 0,44 V respecto de la proteína sin imidazol (figura 5-23).

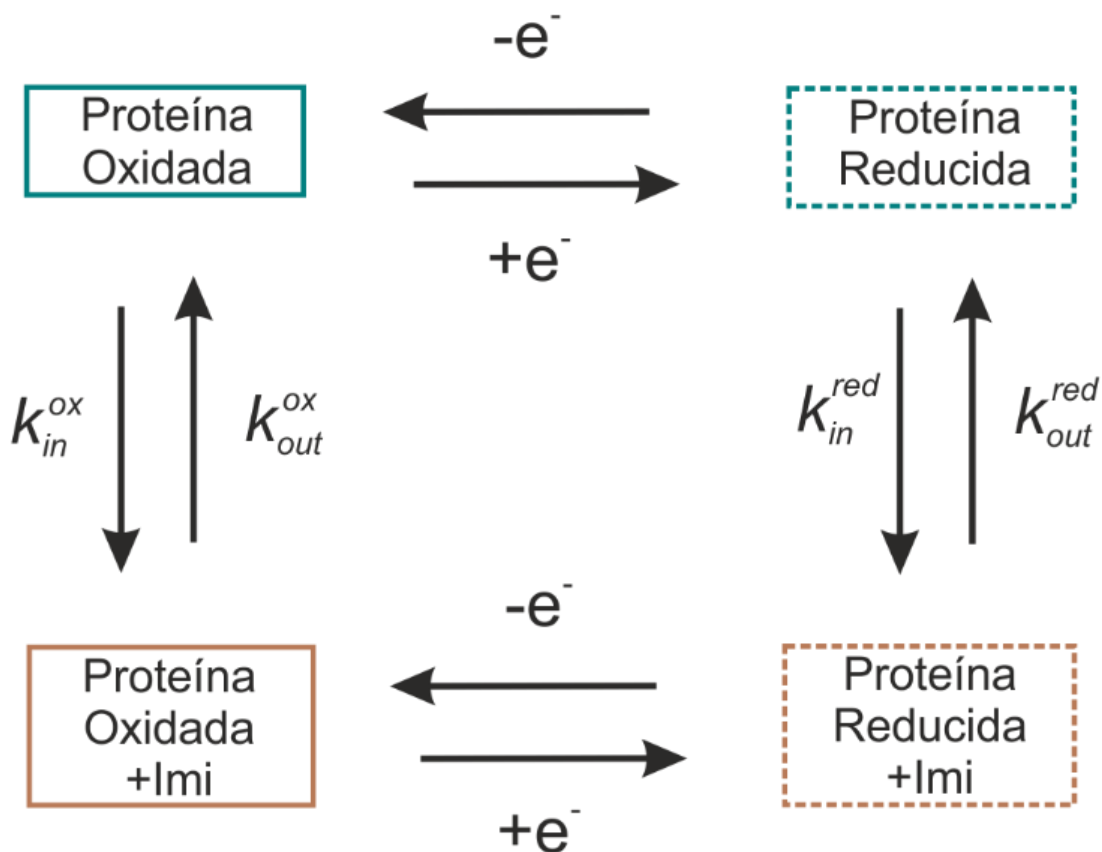


Figura 5-25. Esquema cuadrado que vincula el equilibrio de entrada y salida del ligando de la proteína en su forma oxidada y en su forma reducida, con la reacción de TE de la proteína con y sin el ligando exógeno coordinando el sitio redox.

Se decidió estudiar la cinética de entrada y salida del ligando exógeno al sitio T1, para lo cual se realizaron VCs en las mismas condiciones que las utilizadas en la figura 5-23, pero a velocidad de barrido (v) variable. El modelo más sencillo para racionalizar el proceso es el de un esquema cuadrado, en el que se vinculan las reacciones de TE de los aductos y de las proteínas sin imidazol con sus respectivos equilibrios de entrada y salida del ligando ¹²⁶ (figura 5-25). En tal esquema es posible asumir a priori dos relaciones cualitativas entre las constantes de entrada (k_{in}) y salida (k_{out}) del imidazol para ambos estados redox de la quimera sin ligando exógeno y del aducto, respectivamente. Dada la afinidad de las quimeras en su forma oxidada por el imidazol, es esperable que se cumpla que $k_{in}^{ox} \gg k_{out}^{ox}$, mientras que la pérdida de afinidad en sus formas reducidas invertirá la relación ($k_{out}^{red} \gg k_{in}^{red}$).

Si estas suposiciones son correctas, voltagramas adquiridos a muy baja velocidad de barrido carecerán del pico anódico del aducto, ya que en ese régimen temporal casi todo el imidazol será liberado del sitio metálico tras la reducción (y antes de que se alcancen nuevamente potenciales oxidativos). Análogamente, la cupla del aducto presentará intensidades de corriente simétricas en voltagramas adquiridos a velocidades de barrido suficientemente altos, donde el tiempo entre la oxidación y la reducción será mucho menor que el tiempo necesario para la salida del imidazol. Por lo tanto, adquiriendo voltagramas en un amplio rango de velocidades de barrido, será posible observar el comportamiento de ambos casos y de los casos intermedios. La cinética de entrada y salida del imidazol estará vinculada a los valores de v en los que se produzca el cambio de régimen. Se adquirieron entonces voltagramas en un amplio rango de valores de v , entre 100 mV/s y 10000 mV/s, observándose la tendencia esperada para el modelo planteado (figura 5-26). Esto muestra que, al menos cualitativamente, el sistema puede describirse con el esquema cuadrado presentado en la figura 5-25.

Para obtener una evaluación semicuantitativa de los datos se realizaron simulaciones computacionales de voltagramas a distintas velocidades de barrido asumiendo como válido el esquema cuadrado de la figura 5-25. Los parámetros de ajuste fueron iterativamente variados hasta obtener los voltagramas simulados que mejor reproducen los experimentales. Estos ajustes se realizaron empleando el software comercial DigiSim 3.05; generosamente facilitado por el Dr. Battaglini.

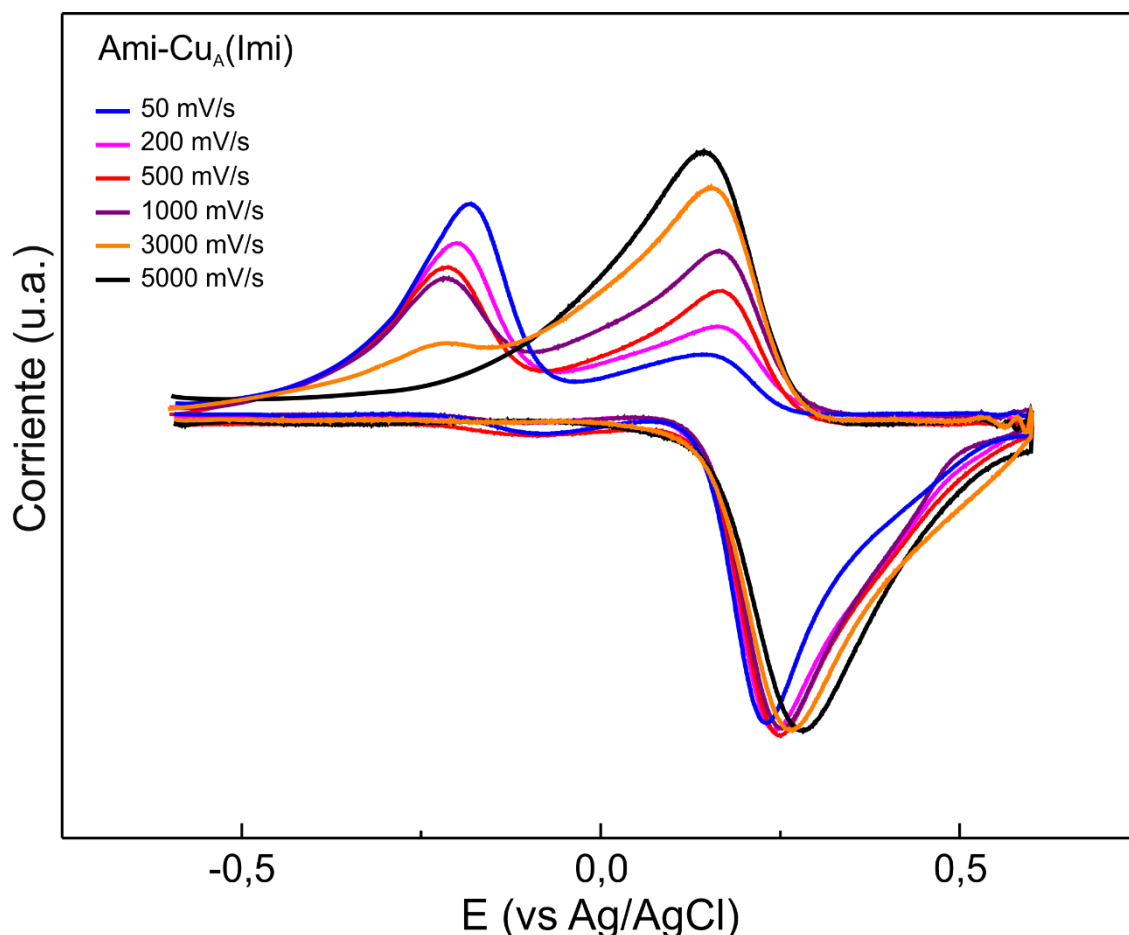


Figura 5-26. Voltagramas (normalizados) de Ami-Cu_A(lmi) en función de la velocidad de barrido.

Además de las constantes cinéticas indicadas en el esquema de la figura 5-25, hay muchas variables relevantes que determinan en última instancia la forma de los voltagramas: la concentración inicial de cada especie, sus coeficientes de difusión (D) y sus coeficientes de transferencia de carga de Butler-Volmer (α). Todos estos valores fueron estimados previamente, de manera de minimizar la cantidad de variables a ajustar con las simulaciones. Las concentraciones fueron determinadas espectrofotométricamente a partir de la absorción de la muestra sin imidazol en solución a 280 nm ($\epsilon=12950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y considerando que el 100% de esta se encuentra formando aducto tras la incorporación del imidazol (en exceso, con una proporción 10:1). El valor de D fue considerado igual para las cuatro especies posibles, ya que no es esperable que la entrada de un ligando pequeño al sitio activo modifique significativamente la difusión de la proteína entera. Dado que matriz proteica de las quimeras es la misma que en Tt-Cu_A, se empleó su coeficiente de difusión, cuyo valor de $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ fue determinado previamente en nuestro laboratorio mediante mediciones amperométricas y resulta del orden de aquellos reportados para otras cupredoxinas de estructura y tamaño similares^{127–129}. Se utilizó un valor de $\alpha = 0,5$ típico para sistemas proteicos¹²⁶ y una $k_{TE} = 10^4$

cm/s para las cuatro especies. Si bien no se realizaron medidas para estimar el valor de k_{TE} , el valor utilizado es del orden de los reportados para sistemas similares, y simulaciones preliminares empleando valores entre 10^3 cm/s y 10^5 cm/s no produjeron diferencias significativas en los parámetros obtenidos de tales ensayos^{127–130}. Una vez definidas estas variables, se realizaron simulaciones computacionales a partir de voltagramas experimentales de Ami-Cu_A (figura 5-27). Esto se hizo por duplicado, empleando los datos de dos experimentos independientes.

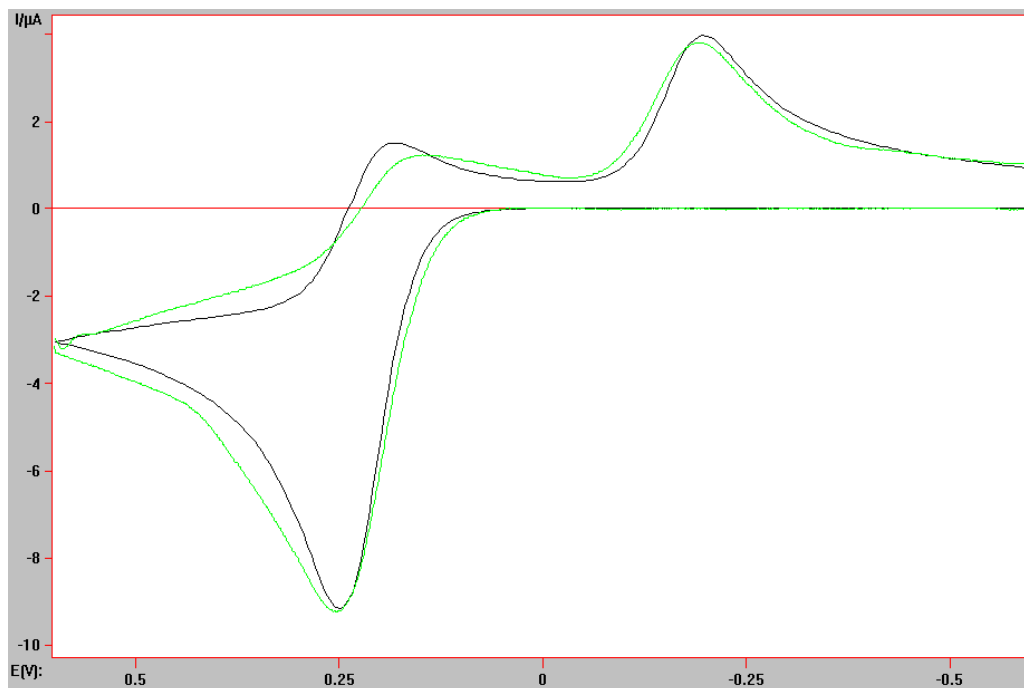


Figura 5-27. Ejemplo de un voltagrama simulado (verde) a partir de uno experimental (negro) de Ami-Cu_A empleando el software DigiSim 3.05.

La mayoría de los parámetros obtenidos como resultado de estas simulaciones computacionales muestran valores reproducibles y con bajos desvíos (tabla 5-9). Los valores obtenidos para las constantes de entrada y salida del imidazol en Ami-Cu_A reducida (k_{in}^{red} y k_{out}^{red}) son la excepción, dado que presentan un desvío del orden del parámetro determinado. Esto ocurre como consecuencia, por un lado, de la rápida velocidad de expulsión del imidazol por parte de la forma reducida del aducto, y por el otro, por el error que implican las bajas señales voltamétricas del aducto reducido en la simulación. No obstante, los valores obtenidos permiten acceder al orden de magnitud de ambos parámetros, que muestran una cinética rápida para la salida del ligando exógeno de la especie reducida, prueba de la pérdida de afinidad del sitio redox por el imidazol. El valor de la constante de equilibrio ($K^{red} = k_{in}^{red} / k_{out}^{red}$) refleja también esta pérdida de afinidad y el consecuente desplazamiento del equilibrio hacia la forma sin

ligado exógeno. Por su parte, el valor de k_{in}^{ox} resulta un orden de magnitud mayor al k_{out}^{ox} , evidenciando la afinidad del sitio T1 quimérico por la molécula de imidazol. Cabe aclarar que tanto k_{out}^{red} como k_{out}^{ox} corresponden a constantes cinéticas de pseudo orden, aproximando que la variación de la concentración de imidazol es despreciable. Finalmente, se estableció el valor de $E_{(Imi)}^0$ con un error de 30 mV, observándose el brusco descenso de más de 400 mV que provoca la entrada y coordinación del ligando exógeno al sitio T1.

Tabla 5-9. Valores de los parámetros obtenidos a partir de las simulaciones voltamétricas realizadas sobre Ami-Cu_A y sus desvíos.

Parámetro	Valor	Desvío
$k_{in}^{ox} (s^{-1})$	3,1	0,2
$k_{out}^{ox} (s^{-1})$	0,4	0,1
$k_{in}^{red} (s^{-1})$	10^{-5}	$2 \cdot 10^{-5}$
$k_{out}^{red} (s^{-1})$	10	10
K^{ox}	8	1
K^{red}	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$0,2 \cdot 10^{-6}$
$E^0 (V)$	0,21	0,03
$E_{(Imi)}^0 (V)$	-0,20	0,03

Analizando la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A y en particular la región del sitio activo, es posible identificar una zona entre el bucle ligante y una hoja β con espacio suficiente para la entrada de una molécula pequeña como el imidazol (figura5-28). Los aminoácidos Ile 113, His 114, Pro 151 e His 152 delimitan este bolsillo o poro, que permite la accesibilidad del solvente al átomo de cobre. Esta cualidad estructural dota a las quimeras verdes de un gran atractivo para la exploración de las características estructurales del poro, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida de los residuos que lo delimitan. De esta manera se podría, en principio, modificar las propiedades que gobiernan el equilibrio entre la proteína libre y el aducto, como la afinidad, la cinética de entrada del ligando exógeno o la de su salida. Las posibilidades que se abren a partir de estos resultados señalan a Ami-Cu_A como un excelente candidato para el diseño de diversos dispositivos. Un ejemplo de estas posibilidades podría ser la construcción de electrodos autocatalíticos, capaces de activarse o desactivarse con la entrada y salida de un ligando exógeno que modifique abruptamente el valor del E^0 , actuando de este modo como un interruptor. Otra posibilidad sería el diseño de sensores para el reconocimiento de distintas moléculas (a partir de modificar la afinidad del sitio), que podría registrarse por ejemplo mediante el cambio en el valor de E^0 . Las posibilidades son muchas y los resultados aquí discutidos buscan dar el punto de partida para su exploración.

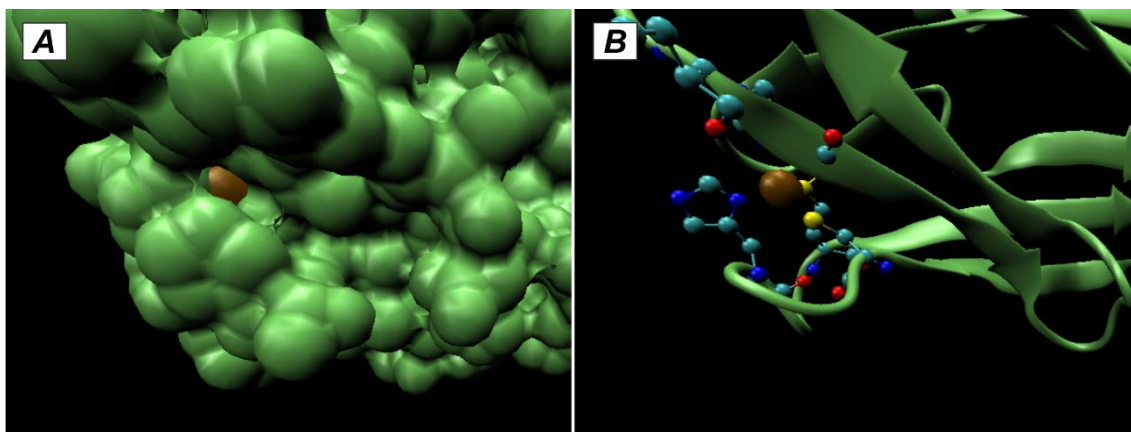


Figura 5-28. Representación del bolsillo o poro a través del cual la molécula de imidazol se introduce al sitio activo de Ami-Cu_A y se coordina al átomo de cobre (bronce). En (A) se representa la superficie proteica (verde), mientras que en (B) se presenta la misma imagen, pero sin la superficie, permitiendo observar al sitio T1.

5.2.5- Az-Cu_A y Ami-Cu_A adsorbidas sobre electrodos biocompatibles

Con el objeto de profundizar en la caracterización de las propiedades redox de ambas quimeras se realizaron experimentos voltamétricos en especies adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados (ver detalles experimentales en sección 2.2). Como fue previamente desarrollado, este sistema experimental permite el abordaje de propiedades cinéticas de la reacción de TE, y en particular, acceder a su energía de reorganización (ver detalles en las secciones 1.3.4 y 4.2.3). La estrategia empleada para las quimeras verdes es la misma que la desarrollada en el capítulo anterior para Tt-Cu_A: adsorber la muestra proteica sobre un electrodo de oro biocompatibilizado a partir del recubrimiento con una monocapa autoensamblada (SAM) de alcanotioles ω -sustituídos. Dado que tanto Ami-Cu_A y Az-Cu_A son una modificación mutagénica de Tt-Cu_A que resulta en cambios marginales de la estructura proteica general, las pruebas de adsorción se concentraron en condiciones similares a las utilizadas para dicho sistema, que resultan a su vez una optimización de un protocolo previo¹³¹. Los mejores resultados en términos de la señal voltamétrica se obtuvieron con electrodos de oro recubiertos de una monocapa mixta de SH-(CH₂)₁₅ y OH:SH-(CH₂)₁₅-CH₃ en proporción 3:2. Estos electrodos fueron incubados en soluciones concentradas de las muestras proteicas (≈ 1 mM) en buffer HAc/Ac(NH₄) 10 mM durante aproximadamente 2 horas. Las medidas de VC fueron realizadas empleando una celda electroquímica termostatzada no isotérmica de tres electrodos, en la que el electrodo de trabajo es el sistema proteína/SAM/Au. En la figura 5-29 se muestran voltagramas típicos obtenidos de esta manera para Ami-Cu_A y Ami-Cu_A, donde se verifica que ambas quimeras presentan respuestas electroquímicas típicas de cuplas redox adsorbidas de un electrón^{101–104}.

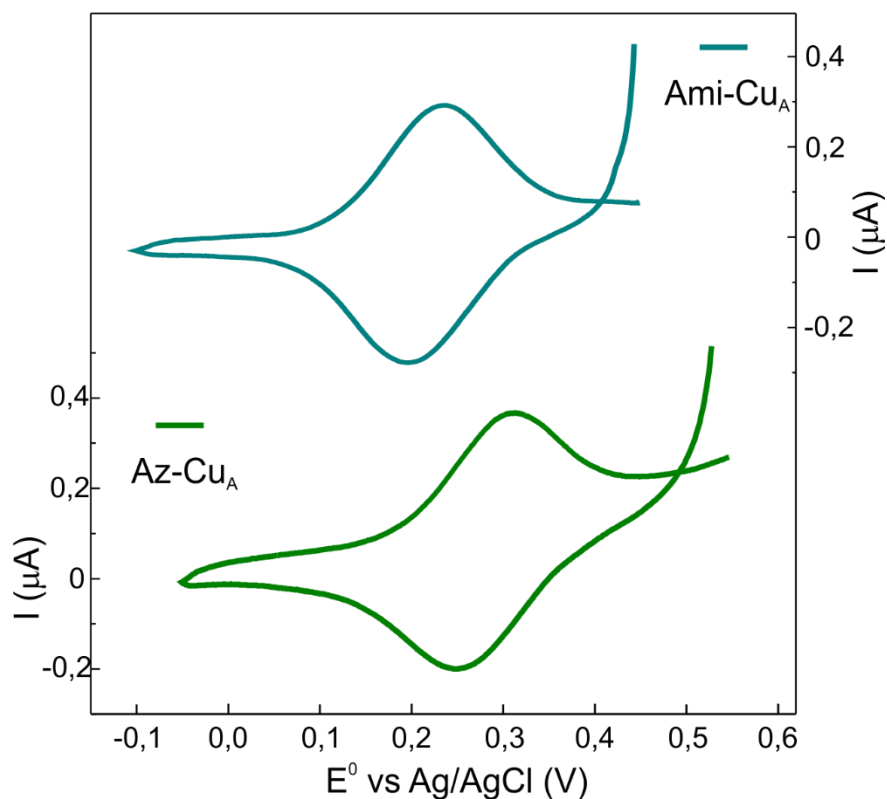


Figura 5-29. Voltagramas de Ami-Cu_A (arriba) y Az-Cu_A (abajo) adsorbidas sobre electrodos de oro recubiertos con una monocapa de alcanotioles ω -sustituidos C₁₅ mixta 3:2 OH:CH₃ a 50 mV/s y 298 K. El buffer de medida es fosfato pH 7 más 10 mM y 200 mM de KNO₃ como electrolito soporte. Los distintos parámetros analizados de ambas respuestas voltamétricas se detallan en la tabla 5-10.

Tabla 5-10. Valores de algunos parámetros relevantes, como I_{pa}/I_{pc} , A_{pa}/A_{pc} , ΔE_p , FWHM y E^0 obtenidos a partir de los voltagramas de Ami-Cu_A y Az-Cu_A presentados en la figura 5-26

Parámetro	Ami-Cu _A	Az-Cu _A
I_{pa}/I_{pc}	1,013	1,049
A_{pa}/A_{pc}	0,974	1,036
ΔE_p (mV)	29	44
FWHM (mV)	121-128	132-129
E^0 vs Ag/AgCl (mV)	241	284

Además de la forma simétrica de cada pico voltamétrico, característico de especies adsorbidas, los valores de I_{pa} y I_{pc} y de A_{pa} y A_{pc} presentan también la simetría esperable para una cupla redox sin reacciones secundarias ni degradación o desorción de ninguno de los dos estados. Por otra parte, la separación entre ambos picos de corriente (ΔE_p) es de 29 y 44 mV para Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente, relativamente cerca del valor

ideal de 0 mV esperable para respuestas totalmente reversibles de muestras adsorbidas. Estos valores no disminuyen significativamente a menores velocidades de barrido y, junto a los valores de FWHM que se encuentra entre 120 y 130 mV, resultan indicativos de una reacción de TE cuasi-reversible. Se adquirieron voltagramas a distintos valores de v para evaluar la dependencia de I_{pa} e I_{pc} con dicha variable (figura 5-30). Los resultados obtenidos verifican una relación lineal de I_{pa} e I_{pc} con este, corroborando que las señales obtenidas corresponden enteramente a especies en estado adsorbido (figura 5-31 A). Además, a partir del gráfico de trompeta (E_{pc} y E_{pa} vs v) se puede observar la transición entre la región de comportamiento reversible y de comportamiento irreversible, en la zona de valores de v de la escala temporal de k_{TE} (figura 5-31 B).

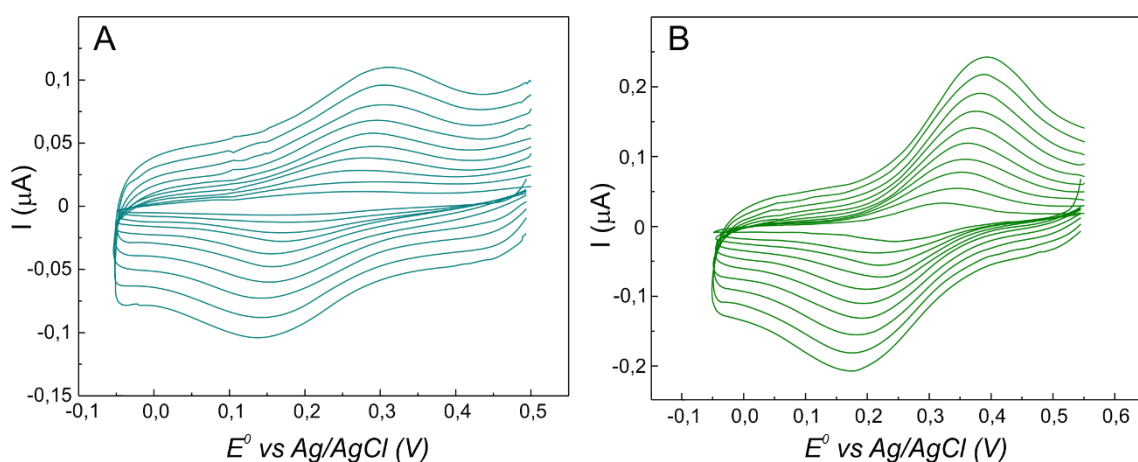


Figura 5-30. Voltagramas de (A) Ami-Cu_A y (B) Az-Cu_A adquiridos a distintos valores de v entre 50 mV/s y 500 mV/s, en el mismo buffer y temperatura que la figura 5-26.

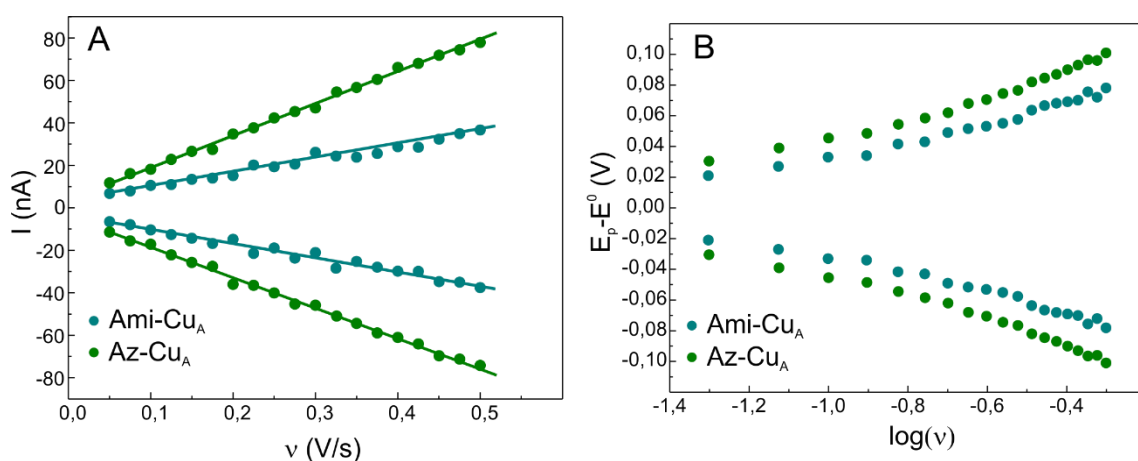


Figura 5-31. (A) I_{pa} e I_{pc} en función de v para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde). Los ajustes corroboran la relación lineal, indicando la medición de especies adsorbidas. (B) E_{pa} y E_{pc} en función de $\log(v)$, también conocido como gráfico de trompeta.

Este tipo de medidas se emplearon para determinar la k_{TE} de las quimeras mediante el ajuste de Laviron, de la misma manera que lo realizado para Tt-Cu_A en el capítulo 4. El tratamiento de datos consta de una curva de trabajo que vincula la separación entre E_{pa} y E_{pc} (ΔE_p) con v , permitiendo la determinación de k_{TE} a partir de una regresión lineal para diferencias de voltaje de hasta 200 mV ¹³² (ver detalles en la sección 4.2.3). Se determinó que para ambas proteínas el rango entre 50 mV/s y 500 mV/s resulta óptimo, ya que abarca grandes variaciones de ΔE_p sin que este exceda los valores límite del método (figura 5-31 B). Los ajustes de Laviron para ambas quimeras no muestran desvíos en el rango de velocidades de barrido empleado, permitiendo obtener valores de k_{TE} (figura 5-32).

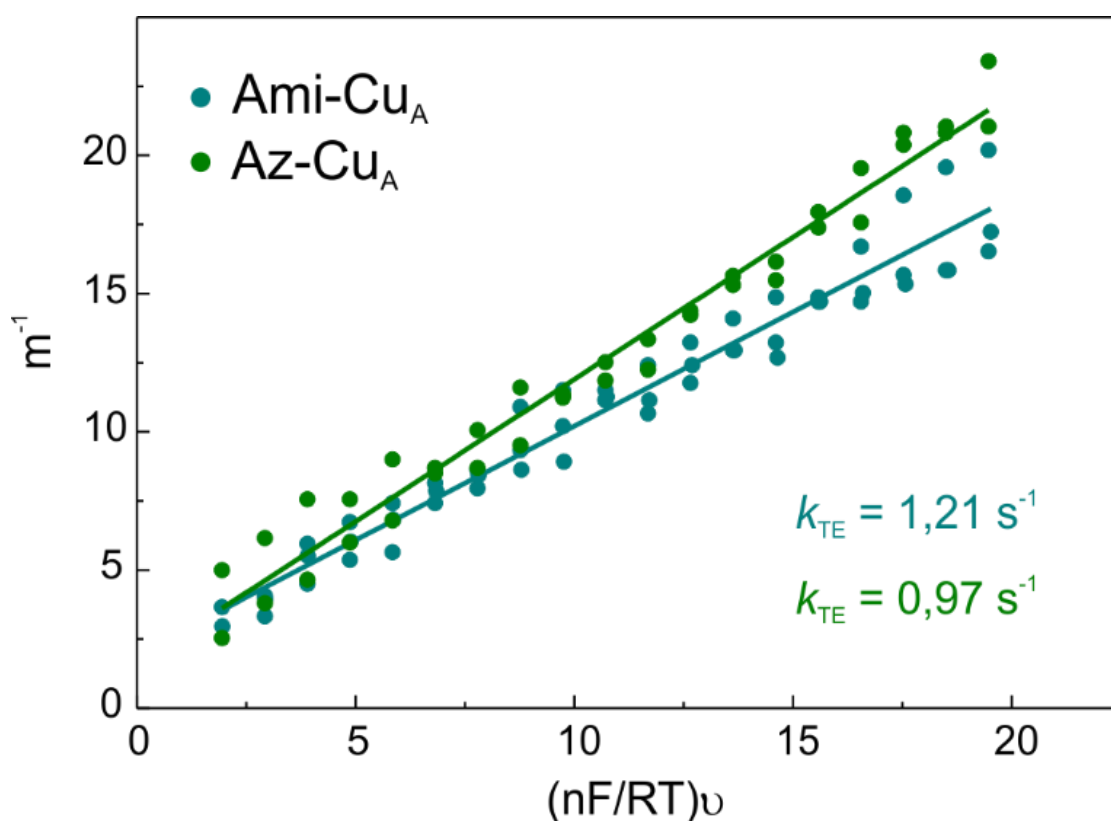


Figura 5-32. Ajuste de Laviron para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde) a partir de los voltagramas presentados en la figura 5-29. La inversa de las pendientes de las regresiones lineales equivale al valor de k_{TE} .

Como se comentó anteriormente, existe una tendencia generalizada en las cupredoxinas de presentar un aumento en el valor de su E^0 ante la disminución del pH. No obstante, mientras algunos casos se caracterizan por una variación monótona, otros presentan regiones de cambios abruptos, caracterizados por un valor definido de pKa ^{85,133–135}. Por otra parte, los resultados desarrollados en el capítulo anterior dan cuenta

de un fenómeno que afecta la cinética de la reacción de TE sin producir una transición abrupta del E^0 en Tt-Cu_A, cuya matriz proteica es la de Ami-Cu_A y Az-Cu_A ⁹⁰. Estos antecedentes motivaron el estudio de los distintos parámetros de la reacción de TE para ambas quimeras en función del pH. Se realizaron VCs a distintos valores de v entre 50 mV/s y 500 mV/s (más de 20 puntos por medida) a distintos valores de pH (figura 5-33 A y B). Dichos valores de pH fueron establecidos con distintas proporciones de sales de fosfato teniendo en todos los casos una concentración total del *buffer* de 10 mM además de 200 mM de KNO₃ como electrolito soporte (ver detalles en la sección 2.2.2).

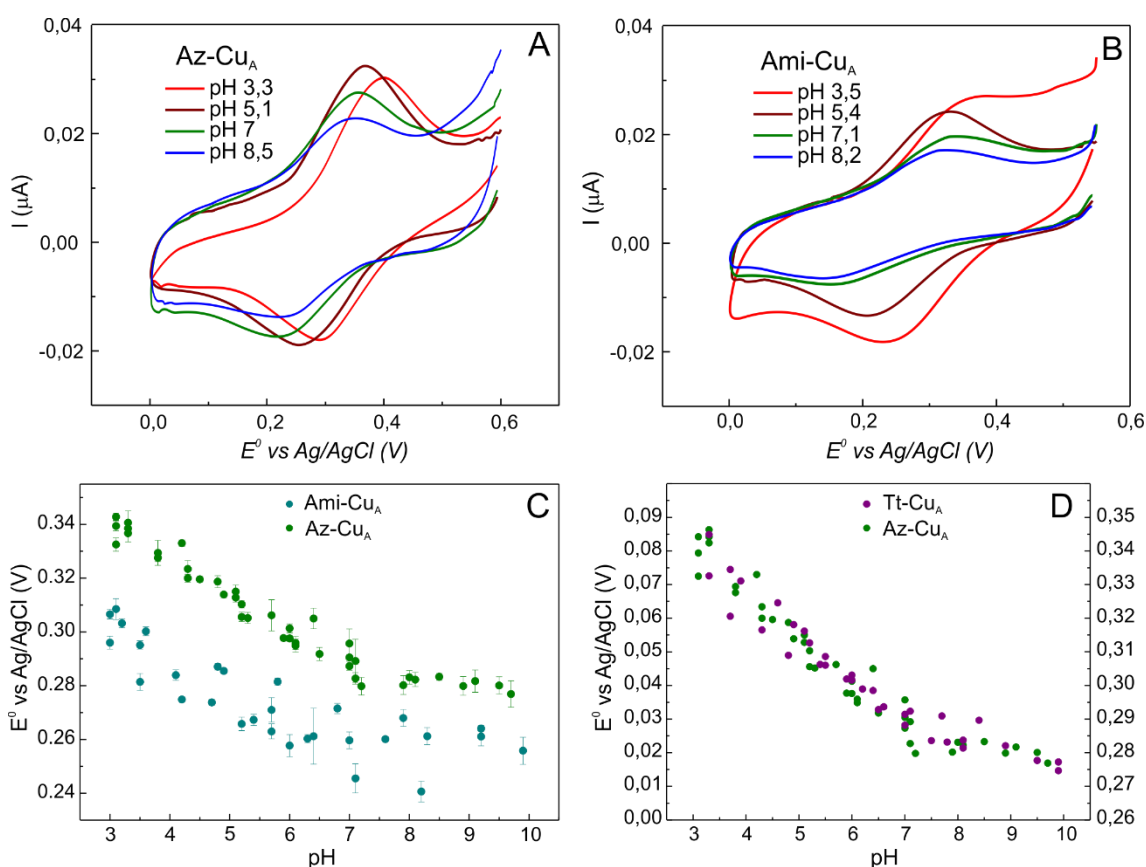


Figura 5-33. (A) y (B) Ejemplos de voltagramas de Az-Cu_A y Ami-Cu_A adquiridos a 100 mV/s y a distintos valores de pH del buffer soporte (en las mismas condiciones que la figura 5-26). (C) E^0 vs pH para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde) a partir de medidas análogas a las ejemplificadas en la figura 5-29. (D) E^0 vs pH Az-Cu_A para (verde, ordenada derecha) y Tt-Cu_A (violeta, ordenada izquierda). Datos tomados de la sección 4.2.5. Ambas ordenadas presentan la misma escala, pero un desplazamiento relativo de 260 mV, permitiendo observar la similitud de ambas dependencias.

En primer lugar, se analizó la dependencia del E^0 con el pH observándose para ambas quimeras una caída monótona del valor de E^0 con la disminución del pH (figura 5-33 C). Esta variación ocurre principalmente hacia valores ácidos de pH (entre pH 3 y 7), donde se observa una dependencia prácticamente lineal con una pendiente de 10 y 11 mV por unidad de pH para Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente, mientras que la variación hacia valores alcalinos de pH es prácticamente nula. Como se muestra en la figura 5-33 D, a pesar de la diferencia de valor absoluto, esta dependencia de E^0 con el pH es muy similar a la reportada en el capítulo 4 para Tt-Cu_A. Estos resultados pueden ser racionalizados, al igual que en el capítulo anterior, en términos de un fenómeno electrostático, en el cual las protonaciones de distintos residuos superficiales, distantes al sitio activo, afectan de manera continua sus propiedades, desestabilizando al estado oxidado respecto del reducido a medida que más cargas positivas se ubican en la superficie de la proteína.

Estos resultados sugieren que el pH ejerce un efecto modulador sobre el valor del E^0 casi exclusivamente a través de la matriz proteica, descartando fenómenos específicos sobre el sitio redox, como la protonación de residuos coordinantes. Para investigar si esta conclusión es extensible a los parámetros cinéticos de la TE, se estudió la dependencia de la k_{TE} con el pH, empleando el ajuste de Laviron a partir de los voltogramas obtenidos a distintas velocidades de barrido para cada pH. La k_{TE} presenta una variación de tipo sigmoidea para ambas proteínas, en contraposición al comportamiento monótono del E^0 , con valores de pK_a aparente (pK_{aA}) de 6,2 y 5,3 para Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente (figura 5-34).

Al igual que en el caso del E^0 , este comportamiento es cualitativamente similar (pero no idéntico) a lo observado para Tt-Cu_A y sus mutantes (ver detalles en la sección 4.2.5). En el caso del Cu_A silvestre, la dependencia del valor de k_{TE} con el pH fue interpretada en términos de un proceso de reorientación de la proteína en la superficie del electrodo de trabajo debido a la protonación de residuos superficiales. En el caso particular de la mutante puntual de Tt-Cu_A M160H, el efecto de reorientación está acompañado por una transición que produce un *switch* funcional entre dos estados redox activos, que presentan valores distintos de λ como rasgo distintivo⁹⁰. Por lo tanto, para estudiar la presencia de un fenómeno de estas características resulta sumamente útil la determinación del valor de λ en ambas regiones de las curvas sigmoideas. La medición de la energía de reorganización se realiza, al igual que en el capítulo anterior, determinando la energía de activación (ΔE^*) de la reacción de TE a partir de un ajuste tipo Arrhenius. El rango de temperaturas estudiado en cada caso va de 5°C a 40°C, y las medidas se realizaron para ambas quimeras a dos valores distintos de pH ubicados en ambos extremos de las curvas sigmoideas de la figura 5-34: pH 4,6 y pH 7,9 (figura 5-35).

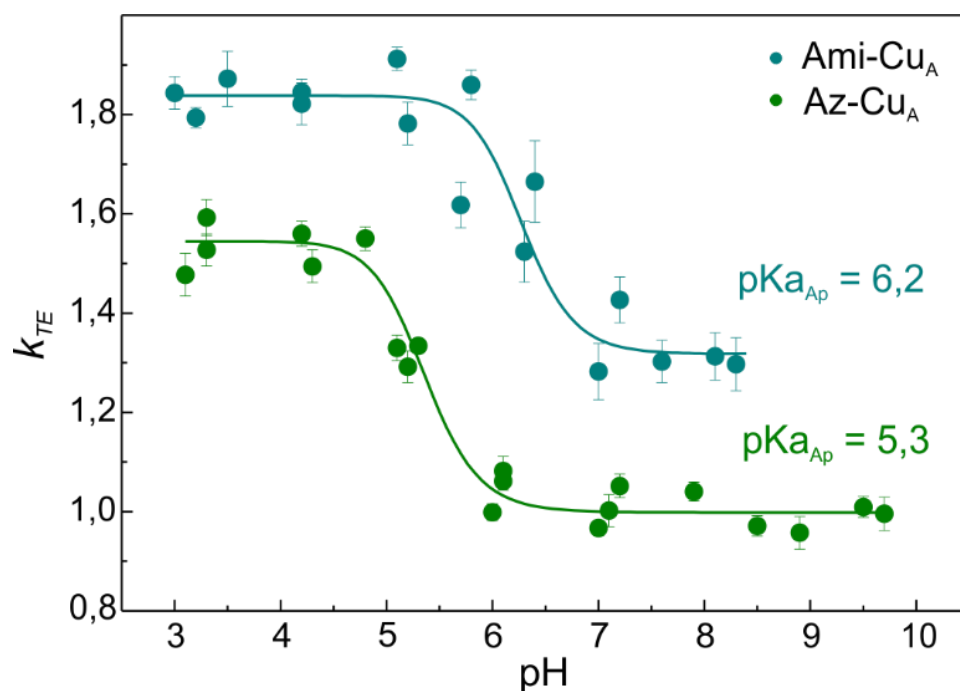


Figura 5-34. k_{TE} vs pH para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde). Las barras de error surgen del desvío del ajuste de Laviron. Ambas curvas responden al ajuste de una curva sigmoidea, con valores de pK_a de 6,3 y 5,2 para Ami-Cu_A y Az-Cu_A respectivamente.

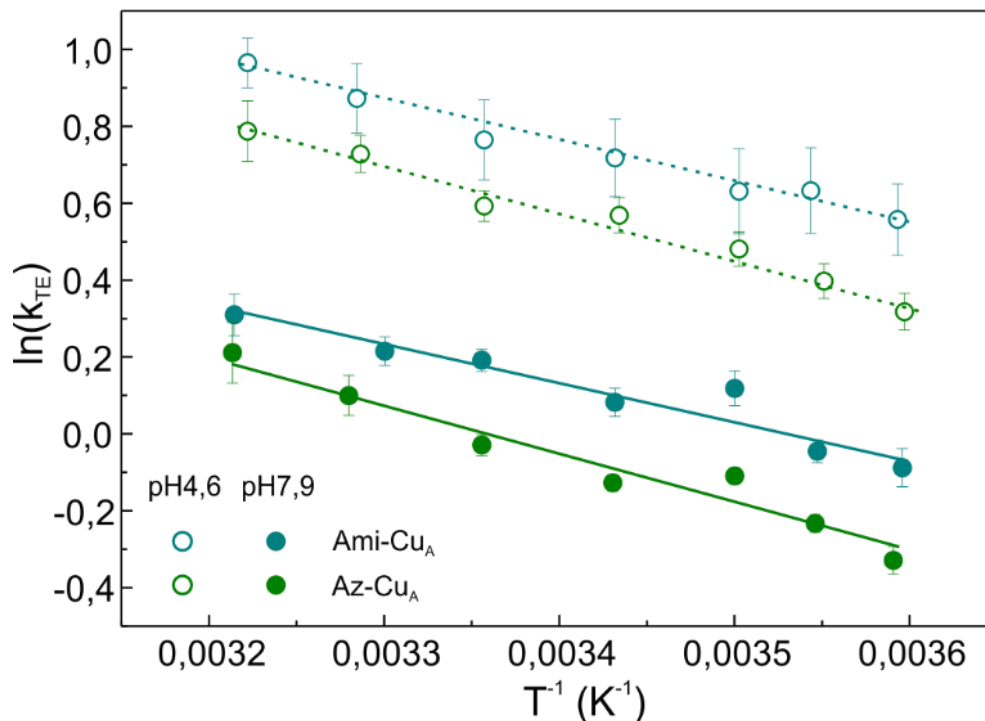


Figura 5-35. $\ln(k_{TE})$ vs T^{-1} para Ami-Cu_A (jade) y Az-Cu_A (verde) y sus respectivos ajustes de Arrhenius para medidas realizadas a pH 4,6 (círculos llenos y líneas continuas) y 7,9 (círculos vacíos y líneas punteadas). De la pendiente de las regresiones lineales se obtienen los valores de λ presentados en la tabla 5-11.

Si bien esta estrategia permite obtener al valor de ΔE^* , las condiciones experimentales y las características del modelo empleado permiten acceder directamente al valor de λ apelando a algunas aproximaciones sencillas. Típicamente la entropía de activación se aproxima como $0,5 \Delta S^0$, que para ambas quimeras resulta despreciable frente a la componente entálpica de la reacción de TE, valiéndose la aproximación $\Delta G^* \approx \Delta H^*$ ¹³⁶ (tabla 5-7). Como se desarrolló en la sección 1.3, en estas condiciones experimentales es válido aproximar que $\Delta G^* = \lambda/4$, y teniendo en cuenta que en fases condensadas la entalpía y la energía de activación resultan prácticamente equivalentes ($\Delta E^* = \Delta H^*$), se cumple que $4\Delta E^* = \lambda$ ¹³⁷.

Los valores de λ obtenidos para ambas quimeras a pH 4,6 y 7,9; es decir, a ambos lados de la transición representada en la figura 5-34, resultan muy similares entre sí (tabla 5-11). La ausencia de cambios significativos en el valor de λ dentro del rango medido de pH es consistente con un efecto de reorientación pH-dependiente de ambas proteínas, como fue postulado para el efecto análogo observado en Tt-Cu_A silvestre. Estas proteínas (ambas quimeras y Tt-Cu_A) comparten la mayor parte de su matriz proteica (el 95 % de su secuencia aminoacídica), y los resultados mostrados en la figura 5-33 sugieren que el efecto que ejerce el pH sobre el sitio redox es inespecífico y ocurre por efecto del equilibrio ácido base de residuos superficiales. En consecuencia, los efectos del pH sobre E^0 y k_{TE} observados (y la ausencia de efecto sobre λ) en ambas quimeras son muy similares a los observados en Tt-Cu_A.

Tabla 5-11. Valores de λ para Ami-Cu_A y Az-Cu_A medidas a pH 4,6 y 7,9 obtenidos a partir de los ajustes de Arrhenius presentados en la figura 5-32.

λ (eV)	Ami-Cu _A	Az-Cu _A
pH 4,6	0,37 ($\pm 0,03$)	0,41 ($\pm 0,04$)
pH 7,9	0,35 ($\pm 0,05$)	0,39 ($\pm 0,07$)

Algunos estudios realizados sobre distintas proteínas azules de cobre sugieren que es posible modificar el valor del E^0 sin afectar significativamente los parámetros cinéticos TE ¹³⁸. Los resultados presentados en la sección 5.2.3 corroboran la actividad redox de ambas quimeras y demuestran el fuerte efecto que produce el trasplante de los sitios T1 a la matriz de Tt-Cu_A sobre el valor de E^0 . Por lo tanto, resulta interesante la comparación de los datos experimentales obtenidos en esta sección con los correspondientes a los sitios T1 nativos, de manera de evaluar el efecto que el cambio de matriz proteica ejerce sobre ellos. Existen reportes en literatura de los parámetros cinéticos aquí estudiados (k_{TE} y λ) medidos de manera análoga sobre Azurina de *P. aeruginosa* ¹³⁹. Además, fue posible realizar medidas directas de dicha proteína, utilizando los mismos métodos y las mismas condiciones que para ambas quimeras

(todas las medidas fueron hechas a pH 7). Los parámetros obtenidos replican satisfactoriamente los reportes previos de Azurina, sumando validez al desarrollo experimental empleado y al análisis comparativo de los resultados (Tabla 5-12).

Tabla 5-12. Valores de k_{TE} y λ para Ami-Cu_A, Az-Cu_A y Azurina adsorbidas sobre una SAM C15 mixta 3:2 OH:CH₃ en una solución de medida 10 mM de concentración analítica de fosfato y 200 mM de KNO₃. La columna Azu^{medida} corresponde a los valores obtenidos experimentalmente mientras que Azu^{ref} a los citados de literatura ¹³⁹. Dado que k_{TE} presenta una transición pH-dependiente, se incluyen los valores extremos.

Parámetro	Ami-Cu _A		Az-Cu _A		Azu ^{ref}	Azu ^{medida}
pH	4,6	7,9	4,6	7,9	4,6	7
k_{TE} (s ⁻¹)	2,1 (±0,3)	1,2 (±0,3)	1,0 (±0,2)	1,8 (±0,2)	1,4 (±0,1)	1,0 (±0,2)
λ (eV)	0,37 (±0,03)	0,35 (±0,05)	0,41 (±0,04)	0,39 (±0,07)	0,32 (±0,03)	0,31 (±0,04)

Posiblemente el elemento más conspicuo de los datos presentados en la tabla 5-12 sea el leve incremento que presenta el valor de λ de Az-Cu_A, de alrededor del 20%, respecto de Azurina nativa, y ambos son compatibles con valores calculados o medidos por otras técnicas ^{140,141}. Además, todos los valores de k_{TE} , medidos en condiciones similares, se encuentran dentro de un acotado rango, sin que haya diferencias pronunciadas entre ellos. El hecho de que un cambio íntegro de matriz proteica, con un enorme impacto en el espectro UV-Vis y en el E⁰ (entre otros), impacte levemente en los valores de k_{TE} y λ es indicativo de cierto grado de desacople de entre los parámetros termodinámicos y cinéticos de la reacción de TE. Esta conclusión tiene interesantes implicancias biológicas tanto desde el punto de vista evolutivo como fisiológico. Este desacople entre distintos parámetros relevantes para la actividad de una proteína redox posibilita la modificación de alguno de ellos sin alterar significativamente otros. De este modo, procesos mutagénicos naturales pueden generar un abanico de variantes proteicas con variaciones puntuales de sus propiedades funcionales, lo cual puede ser una característica importante del proceso evolutivo. Por otra parte, esta posibilidad de alteración selectiva de parámetros funcionales puede ser una pieza fundamental de mecanismos regulatorios *in vivo*. Además, aunque no menos importante, destaca el rol de la matriz proteica sobre la regulación de la TE en proteínas redox, siendo mucho más que un mero soporte estructural para el sitio activo.

5.3- Conclusiones

A lo largo de este capítulo se han presentado diversos estudios sobre dos modelos novedosos de centros mutantes tipo T1, generados a partir de la estrategia de ingeniería de bucles. Esta estrategia permite la reconstrucción del sitio redox de una cupredoxina en la matriz proteica de otra, dadas las características del plegamiento conservado que comparten, lo cual representa una poderosa herramienta para explorar los efectos de dicha matriz sobre las propiedades estructurales y funcionales de los sitios redox. La primera y más general conclusión que se puede extraer de los resultados presentados es la enorme importancia de la matriz proteica en la determinación de estas propiedades sobre ambos sitios T1 estudiados. Las diferencias espectroscópicas, estructurales y funcionales entre ambas quimeras y sus contrapartes nativas (Amicianina y Azurina) son una clara evidencia de esto. Estudios recientes sobre mutantes de proteínas T1 con longitud variable en su bucle ligante permitieron a los autores postular que el largo del bucle es el principal determinante de la estructura del sitio redox ⁷⁸. Sin embargo, tanto Ami-Cu_A como Az-Cu_A comparten no sólo la primera esfera de coordinación con sus pares nativas, sino también la identidad del bucle ligante completo, por lo que evidentemente la matriz proteica impone restricciones estructurales en ambos casos, con dramáticas consecuencias en las propiedades electrónicas del sitio. Estos resultados complementan los trabajos antes citados, señalando la complejidad de este tipo de sistemas, y que rol de la matriz proteica como modulador de las propiedades espectroscópicas del sitio T1 puede ser comparable al de ligandos axiales del ion metálico y ligandos de segunda esfera.

Por otra parte, resulta notable la robustez estructural de estos sitios, ya que a pesar de las tensiones que impone la matriz proteica, conservan sus características básicas distintivas y su actividad redox. El hecho de que sean estructuralmente robustos, pero al mismo tiempo sensibles a perturbaciones sutiles capaces de modular sus propiedades, resulta interesante desde un punto de vista evolutivo. A lo largo de millones de años la naturaleza ha moldeado a los sitios T1 como estructuras capaces de ser moduladas en sus propiedades funcionales, pero al mismo tiempo estructuralmente robustas ^{90,142}. El hecho de que las proteínas de Cu_A y T1 compartan el mismo tipo de plegamiento delata un origen evolutivo común, probablemente responsable de este tipo de adaptaciones.

Los análisis más detallados y cálculos computacionales que se realizaron a partir de la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A en la sección 5.2.2 muestran que el sitio activo de esta quimera no responde a las perturbaciones estructurales de sus ligandos como lo predice el modelo de distorsión acoplada ⁶² (desarrollado en la sección 5.1.5). Según este modelo, el acercamiento o alejamiento de la cisteína ligante generaría el desplazamiento contrario por parte de la metionina ligante (y viceversa), pero los resultados muestran un alto grado de resiliencia en la distancia al cobre de ambos

ligandos respecto de la distancia del otro. El caso aquí presentado indica que, si bien el modelo de distorsión acoplada es capaz de correlacionar parámetros estructurales simples con propiedades espectroscópicas accesibles para ciertas proteínas T1, es insuficiente para explicar los resultados de Ami-Cu_A. Parecería necesario un modelo más refinado capaz de capturar la gran complejidad de los distintos factores que determinan las propiedades de los sitios T1, y el trabajo desarrollado en este capítulo marca un camino en ese sentido.

Una de las cualidades más destacables de ambas quimeras es el elevado valor de su E^0 en relación no sólo de sus respectivos sitios nativos, sino del resto de los sitios T1 conocidos. Como fue discutido en la sección 5.2.3, tal aumento en el valor del E^0 responde a una estabilización relativa de la forma reducida respecto de la oxidada tanto entálpica, como consecuencia de las inusuales distancias $S_{\text{Cys-Cu}}$ y $S_{\text{Met-Cu}}$, como entrópica, cuya causa principal radica probablemente en la mayor accesibilidad al solvente del sitio activo. El efecto general de la matriz proteica sobre el valor del E^0 suele considerarse un factor relativamente menor en comparación al ejercido por los ligandos de primera esfera de coordinación. Notablemente, sin embargo, ninguna de las muchas mutantes puntuales de primera esfera reportadas para Amicianina y Azurina producen un corrimiento del valor de E^0 semejante al obtenido para nuestras quimeras ¹¹². Sólo a partir de mutaciones combinadas de primera y segunda esfera de coordinación sobre Azurina ha sido posible la construcción de sitios de cobre con valores tan elevados de E^0 . Esto señala el rol protagónico que puede cumplir la matriz proteica en la determinación del valor de E^0 en estos sitios T1. Además, los resultados obtenidos a partir de especies adsorbidas señalan cierto grado de desacople entre los parámetros termodinámicos y los parámetros cinéticos de la reacción de TE. Ambas quimeras presentan dramáticos desplazamientos del valor del E^0 respecto de las proteínas nativas, no obstante, el valor de la k_{TE} (medida en idénticas condiciones) resulta muy similar y el valor de λ apenas un 25% mayor. Este tipo de desacople entre los parámetros termodinámicos y los parámetros cinéticos de la reacción de TE ha sido discutida en el capítulo anterior para el sitio de Cu_A, y los resultados aquí presentados sobre sitios T1 permiten suponer que podría ser también esta una cualidad compartida de las cupredoxinas.

Una característica distintiva de Ami-Cu_A y Az-Cu_A es la accesibilidad al solvente del sitio activo que permite el ingreso de ligandos exógenos y, en particular, que el imidazol sea capaz de incorporarse a la esfera de coordinación del átomo de cobre, modificando su geometría y así sus propiedades redox. La capacidad de un sitio T1 mutante de incorporar un ligando exógeno a la coordinación no es novedosa, no obstante, los presentados aquí son los primeros casos en los que lo hace un sitio T1 con su primera esfera de coordinación nativa ¹⁴³. El sitio T1 con el imidazol exógeno coordinado presenta características espectroscópicas muy similares a las observadas en sitios T2, y un paralelismo con el sitio activo de la Nitrosocianina (única proteína T2 reportada con

un plegamiento de tipo cupredoxina) sugiere que el sitio adopta una geometría bipiramidal cuadra. La caracterización electroquímica de la cinética de entrada y salida del ligando exógeno indica una gran diferencia de afinidad entre el estado reducido y el estado oxidado de Ami-Cu_A, siendo este último el único capaz de incorporarlo en proporciones significativas. Estos resultados y la identificación del probable poro de entrada del imidazol abre las puertas a la manipulación de estos modelos novedosos mediante ingeniería genética y modificaciones postraduccionales. Alterando el tamaño, la forma y la accesibilidad de dicho poro, sería posible regular tanto la cinética de entrada y salida del imidazol, como la afinidad de ambos estados redox por distintos ligandos exógenos posibles. A su vez, mutaciones de primera y segunda esfera de coordinación podrían permitir modular el valor del E⁰ de las quimeras y de los aductos formados. Finalmente, la posibilidad de elaborar nuevas quimeras, insertando el bucle ligante de otras proteínas T1 en la matriz proteica de Tt-Cu_A, presenta la oportunidad de explorar un sinfín de sistemas posibles. Por ejemplo, en un trabajo reciente se ha reconstruido el sitio T2 de la Nitrosocianina en la matriz proteica de Azurina, empleando la misma estrategia de ingeniería de bucles ¹⁴⁴. Otros autores han sido capaces también de recrear algunas características de sitios T2 sobre el mismo modelo proteico, pero apelando a una estrategia diferente: la mutación puntual de ligandos axiales ¹⁴⁵. Esto significa que existe un gran número de herramientas disponibles para la manipulación de las distintas propiedades de los sitios mononucleares y dinucleares de cobre. La posibilidad de hacer esto en una enzima capaz de incorporar ligandos exógenos representa un gran atractivo desde el punto de vista del diseño de dispositivos proteicos como sensores o electrodos autocatalíticos, y los resultados presentados en este capítulo señalan a Ami-Cu_A y a Az-Cu_A como atractivos candidatos en este sentido.

5.4- Referencias

- (1) Mertz, W. The Essential Trace Elements. *Science* **1981**, 213 (4514), 1332–1338.
- (2) De Rienzo, F.; Gabdoulline, R. R.; Menziani, M. C.; Wade, R. C. Blue Copper Proteins: A Comparative Analysis of Their Molecular Interaction Properties. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2000**, 9 (8), 1439–1454.
- (3) Dennison, C. Investigating the Structure and Function of Cupredoxins. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249 (24), 3025–3054.
- (4) Adman, E. T. Copper Protein Structures. In *Advances in Protein Chemistry*; Elsevier, 1991; Vol. 42, pp 145–197.
- (5) Gough, J.; Chothia, C. The Linked Conservation of Structure and Function in a Family of High Diversity. *Structure* **2004**, 12 (6), 917–925.
- (6) Solomon, E. I.; Hadt, R. G. Recent Advances in Understanding Blue Copper Proteins. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255 (7–8), 774–789.
- (7) LaCroix, L. B.; Shadle, S. E.; Wang, Y.; Averill, B. A.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. Electronic Structure of the Perturbed Blue Copper Site in Nitrite Reductase: Spectroscopic Properties, Bonding, and Implications for the Entatic/Rack State. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (33), 7755–7768.
- (8) Solomon, E. I.; Hare, J. W.; Gray, H. B. Spectroscopic Studies and a Structural Model for Blue Copper Centers in Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73 (5), 1389–1393.
- (9) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (7), 2239–2314.
- (10) Penfield, K. W.; Gay, R. R.; Himmelwright, R. S.; Eickman, N. C.; Norris, V. A.; Freeman, H. C.; Solomon, E. I. Spectroscopic Studies on Plastocyanin Single Crystals: A Detailed Electronic Structure Determination of the Blue Copper Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103 (15), 4382–4388.
- (11) Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; DeBeer George, S.; Basumallick, L. Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (2), 419–458.
- (12) Koch, M.; Velarde, M.; Harrison, M. D.; Echt, S.; Fischer, M.; Messerschmidt, A.; Dennison, C. Crystal Structures of Oxidized and Reduced Stellacyanin from *Horseradish Roots*. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (1), 158–166.
- (13) Li, C.; Yanagisawa, S.; Martins, B. M.; Messerschmidt, A.; Banfield, M. J.; Dennison, C. Basic Requirements for a Metal-Binding Site in a Protein: The Influence of Loop Shortening on the Cupredoxin Azurin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103 (19), 7258–7263.
- (14) Liu, J.; Chakraborty, S.; Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Tian, S.; Petrik, I.; Bhagi, A.; Lu, Y. Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4366–4469.
- (15) Davidson, V. L.; Sun, D. Evidence for Substrate Activation of Electron Transfer from Methylamine Dehydrogenase to Amicyanin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (11), 3224–3225.
- (16) Chen, L.; Durley, R.; Poliks, B. J.; Hamada, K.; Chen, Z.; Mathews, F. S.; Davidson, V. L.; Satow, Y.; Huizinga, E. Crystal Structure of an Electron-Transfer Complex between Methylamine Dehydrogenase and Amicyanin. *Biochemistry (Mosc.)* **1992**, 31 (21), 4959–4964.

- (17) Tobari, J.; Harada, Y. Amicyanin: An Electron Acceptor of Methylamine Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101* (2), 502–508.
- (18) Davidson, V. L.; Jones, L. H. Complex Formation with Methylamine Dehydrogenase Affects the Pathway of Electron Transfer from Amicyanin to Cytochrome c_{551i} . *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (41), 23941–23943.
- (19) Gray, K. A.; Davidson, V. L.; Knaff, D. B. Complex Formation between Methylamine Dehydrogenase and Amicyanin from *Paracoccus Denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (28), 13987–13990.
- (20) Edwards, S. L.; Davidson, V. L.; Hyun, Y. L.; Wingfield, P. T. Spectroscopic Evidence for a Common Electron Transfer Pathway for Two Tryptophan Tryptophylquinone Enzymes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (9), 4293–4298.
- (21) Hyun, Y.-L.; Davidson, V. L. Electron Transfer Reactions between Aromatic Amine Dehydrogenase and Azurin. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (38), 12249–12254.
- (22) Crowley, P. B.; Otting, G.; Schlarb-Ridley, B. G.; Canters, G. W.; Ubbink, M. Hydrophobic Interactions in a Cyanobacterial Plastocyanin–Cytochrome *F* Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (43), 10444–10453.
- (23) Ubbink, M.; Ejdebäck, M.; Karlsson, B. G.; Bendall, D. S. The Structure of the Complex of Plastocyanin and Cytochrome *F*, Determined by Paramagnetic NMR and Restrained Rigid-Body Molecular Dynamics. *Structure* **1998**, *6* (3), 323–335.
- (24) Chen, L.; Durley, R.; Mathews, F.; Davidson, V. Structure of an Electron Transfer Complex: Methylamine Dehydrogenase, Amicyanin, and Cytochrome c_{551i} . *Science* **1994**, *264* (5155), 86–90.
- (25) Sukumar, N.; Chen, Z.; Ferrari, D.; Merli, A.; Rossi, G. L.; Bellamy, H. D.; Chistoserdov, A.; Davidson, V. L.; Mathews, F. S. Crystal Structure of an Electron Transfer Complex between Aromatic Amine Dehydrogenase and Azurin from *Alcaligenes Faecalis*. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45* (45), 13500–13510.
- (26) Meschi, F.; Wiertz, F.; Klauss, L.; Cavalieri, C.; Blok, A.; Ludwig, B.; Heering, H. A.; Merli, A.; Rossi, G. L.; Ubbink, M. Amicyanin Transfers Electrons from Methylamine Dehydrogenase to Cytochrome c_{551i} via a Ping-Pong Mechanism, Not a Ternary Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14537–14545.
- (27) Marniemi, J.; Parkki, M. G. Radiochemical Assay of Glutathione S-Epoxide Transferase and Its Enhancement by Phenobarbital in Rat Liver in Vivo. *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24* (17), 1569–1572.
- (28) McLendon, G.; Hake, R. Interprotein Electron Transfer. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (3), 481–490.
- (29) Gray, H. B.; Winkler, J. R. Long-Range Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (10), 3534–3539.
- (30) Colman, P. M.; Freeman, H. C.; Guss, J. M.; Murata, M.; Norris, V. A.; Ramshaw, J. A. M.; Venkatappa, M. P. X-Ray Crystal Structure Analysis of Plastocyanin at 2.7 Å Resolution. *Nature* **1978**, *272* (5651), 319–324.
- (31) Choi, M.; Davidson, V. L. Cupredoxins—A Study of How Proteins May Evolve to Use Metals for Bioenergetic Processes. *Metallomics* **2011**, *3* (2), 140.
- (32) Bertini, I.; Cavallaro, G.; McGreevy, K. S. Cellular Copper Management—a Draft User’s Guide. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (5–6), 506–524.

- (33) Gray, H. B.; Malmström, B. G.; Williams, R. J. P. Copper Coordination in Blue Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5 (5), 551–559.
- (34) Sousa, F. L.; Alves, R. J.; Ribeiro, M. A.; Pereira-Leal, J. B.; Teixeira, M.; Pereira, M. M. The Superfamily of Heme–copper Oxygen Reductases: Types and Evolutionary Considerations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2012**, 1817 (4), 629–637.
- (35) Adman, E. T.; Godden, J. W.; Turley, S. The Structure of Copper-Nitrite Reductase from *Achromobacter Cycloclastes* at Five pH Values, with NO₂-Bound and with Type II Copper Depleted. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (46), 27458–27474.
- (36) Hart, P. J.; Eisenberg, D.; Nersissian, A. M.; Valentine, J. S.; Herrmann, R. G.; Nalbandyan, R. M. A Missing Link in Cupredoxins: Crystal Structure of Cucumber Stellacyanin at 1.6 Å Resolution. *Protein Sci.* **1996**, 5 (11), 2175–2183.
- (37) Nersissian, A. M.; Valentine, J. S.; Immoos, C.; Hill, M. G.; Hart, P. J.; Williams, G.; Herrmann, R. G. Uclacyanins, Stellacyanins, and Plantacyanins Are Distinct Subfamilies of Phytocyanins: Plant-Specific Mononuclear Blue Copper Proteins. *Protein Sci.* **1998**, 7 (9), 1915–1929.
- (38) Kim, S.; Mollet, J.-C.; Dong, J.; Zhang, K.; Park, S.-Y.; Lord, E. M. Chemocyanin, a Small Basic Protein from the Lily Stigma, Induces Pollen Tube Chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (26), 16125–16130.
- (39) Dennison, C.; Harrison, M. D.; Lawler, A. T. Alkaline Transition of Phytocyanins: A Comparison of Stellacyanin and Umecyanin. *Biochem. J.* **2003**, 371 (2), 377–383.
- (40) Ducros, V.; Brzozowski, A. M.; Wilson, K. S.; Brown, S. H.; Østergaard, P.; Schneider, P.; Yaver, D. S.; Pedersen, A. H.; Davies, G. J. Crystal Structure of the Type-2 Cu Depleted Laccase from *Coprinus Dnereus* at 2.2 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (4), 310–316.
- (41) Zaitseva, I.; Zaitsev, V.; Card, G.; Moshkov, K.; Bax, B.; Ralph, A.; Lindley, P. The X-Ray Structure of Human Serum Ceruloplasmin at 3.1 Å: Nature of the Copper Centres. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1 (1), 15–23.
- (42) Eck, R.; Hundt, S.; Härtl, A.; Roemer, E.; Künkel, W. A Multicopper Oxidase Gene from *Candida Albicans*: Cloning, Characterization and Disruption. *Microbiol. Read. Engl.* **1999**, 145 (Pt 9), 2415–2422.
- (43) Hakulinen, N.; Kiiskinen, L.-L.; Kruus, K.; Saloheimo, M.; Paananen, A.; Koivula, A.; Rouvinen, J. Crystal Structure of a Laccase from *Melanocarpus Albomyces* with an Intact Trinuclear Copper Site. *Nat. Struct. Biol.* **2002**.
- (44) Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, 41 (23), 7325–7333.
- (45) Tullius, T. D.; Frank, P.; Hodgson, K. O. Characterization of the Blue Copper Site in Oxidized Azurin by Extended X-Ray Absorption Fine Structure: Determination of a Short Cu-S Distance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, 75 (9), 4069–4073.
- (46) Warren, J. J.; Lancaster, K. M.; Richards, J. H.; Gray, H. B. Inner- and Outer-Sphere Metal Coordination in Blue Copper Proteins. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 115, 119–126.

- (47) *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2nd ed.; King, R. B., Ed.; Wiley: Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2005.
- (48) Guckert, J. A.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I. Electronic Structure of the Reduced Blue Copper Active Site: Contributions to Reduction Potentials and Geometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (10), 2817–2844.
- (49) Guss, J. M.; Harrowell, P. R.; Murata, M.; Norris, V. A.; Freeman, H. C. Crystal Structure Analyses of Reduced (Cu^I) Poplar Plastocyanin at Six pH Values. *J. Mol. Biol.* **1986**, *192* (2), 361–387.
- (50) Church, W. B.; Guss, J. M.; Potter, J. J.; Freeman, H. C. The Crystal Structure of Mercury-Substituted Poplar Plastocyanin at 1.9 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (1), 234–237.
- (51) Nar, H.; Huber, R.; Messerschmidt, A.; Filippou, A. C.; Barth, M.; Jaquinod, M.; Kamp, M.; Canters, G. W. Characterization and Crystal Structure of Zinc Azurin, a by-Product of Heterologous Expression in *Escherichia Coli* of *Pseudomonas Aeruginosa* Copper Azurin. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205* (3), 1123–1129.
- (52) Baker, E. N.; Anderson, B. F.; Blackwell, K. E.; Kingston, R. L.; Norris, G. E.; Shepard, W. E. B. The Relative Rigidity of the Type 1 Copper Site in Azurin, as Seen in High Resolution X-Ray Analyses of Various Forms of the Protein. *J. Inorg. Biochem.* **1991**, *43* (2–3), 162.
- (53) Williams R J, V. B. L. Metalloenzymes: The Entatic Nature of Their Active Sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**, *59* (2), 498–505.
- (54) Gray, H. B.; Malmström, B. G. On the Relationship between Protein-Forced Ligand Fields and the Properties of Blue Copper Centers. *Comments Inorg. Chem.* **1983**, *2* (5), 203–209.
- (55) Williams, R. J. P. Energised (Entatic) States of Groups and of Secondary Structures in Proteins and Metalloproteins. In *EJB Reviews*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1995**; pp 257–275.
- (56) Shepard, W. E. B.; Kingston, R. L.; Anderson, B. F.; Baker, E. N. Structure of Apo-Azurin from *Alcaligenes Denitrificans* at 1.8 Å Resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1993**, *49* (3), 331–343.
- (57) Zbigniew Dauter, K. P., Maria Papadovasilaki. The Crystal Structure of Apo-Pseudoazurin from *Alcaligenes Faecalis* S-6. *FEBS Lett.* **1995**, *368* (3), 432–434.
- (58) Garrett, T. P.; Clingeffer, D. J.; Guss, J. M.; Rogers, S. J.; Freeman, H. C. The Crystal Structure of Poplar Apoplastocyanin at 1.8 Å Resolution. The Geometry of the Copper-Binding Site Is Created by the Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (5), 2822–2825.
- (59) Durley, R.; Chen, L.; Lim, L. W.; Mathews, F. S.; Davidson, V. L. Crystal Structure Analysis of Amicyanin and Apoamicyanin from *Paracoccus Denitrificans* at 2.0 Å and 1.8 Å Resolution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1993**, *2* (5), 739–752.
- (60) Didziulis, S. V.; Cohen, S. L.; Gewirth, A. A.; Solomon, E. I. Variable Photon Energy Photoelectron Spectroscopic Studies of Copper Chlorides: An Experimental Probe of Metal-Ligand Bonding and Changes in Electronic Structure on Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (1), 250–268.
- (61) Gewirth, A. A.; Cohen, S. L.; Schugar, H. J.; Solomon, E. I. Spectroscopic and Theoretical Studies of the Unusual EPR Parameters of Distorted Tetrahedral Cupric Sites: Correlations to X-Ray Spectral Features of Core Levels. *Inorg. Chem.* **1987**, *26* (7), 1133–1146.

- (62) Solomon, E. I. Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry: Blue to Green to Red Copper Sites. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (20), 8012–8025.
- (63) Sakurai, T. The Alkaline Transition of Blue Copper Proteins, *Cucumis Sativus* Plastocyanin and *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (7), 1729–1732.
- (64) Gray, K. A.; Knaff, D. B.; Husain, M.; Davidson, V. L. Measurement of the Oxidation-Reduction Potentials of Amicyanin and c-Type Cytochromes from *Paracoccus Denitrificans*. *FEBS Lett.* **1986**, *207* (2), 239–242.
- (65) Husain, M.; Davidson, V. L.; Smith, A. J. Properties of *Paracoccus Denitrificans* Amicyanin. *Biochemistry (Mosc.)* **1986**, *25* (9), 2431–2436.
- (66) Ghosh, S.; Xie, X.; Dey, A.; Sun, Y.; Scholes, C. P.; Solomon, E. I. Thermodynamic Equilibrium between Blue and Green Copper Sites and the Role of the Protein in Controlling Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (13), 4969–4974.
- (67) Hadt, R. G.; Xie, X.; Pauleta, S. R.; Moura, I.; Solomon, E. I. Analysis of Resonance Raman Data on the Blue Copper Site in Pseudoazurin: Excited State π and σ Charge Transfer Distortions and Their Relation to Ground State Reorganization Energy. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *115*, 155–162.
- (68) Xie, X.; Hadt, R. G.; Pauleta, S. R.; González, P. J.; Un, S.; Moura, I.; Solomon, E. I. A Variable Temperature Spectroscopic Study on *Paracoccus Pantotrophus* Pseudoazurin: Protein Constraints on the Blue Cu Site. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103* (10), 1307–1313.
- (69) Wilson, T. D.; Savelieff, M. G.; Nilges, M. J.; Marshall, N. M.; Lu, Y. Kinetics of Copper Incorporation into a Biosynthetic Purple Cu_A Azurin: Characterization of Red, Blue, and a New Intermediate Species. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (51), 20778–20792.
- (70) Pierloot, K.; De Kerpel, J. O. A.; Ryde, U.; Olsson, M. H. M.; Roos, B. O. Relation between the Structure and Spectroscopic Properties of Blue Copper Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (50), 13156–13166.
- (71) Andrew, C. R.; Sanders-Loehr, J. Copper–Sulfur Proteins: Using Raman Spectroscopy To Predict Coordination Geometry. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29* (8), 365–372.
- (72) Andrew, C. R.; Yeom, H.; Valentine, J. S.; Karlsson, B. G.; van Pouderoyen, G.; Canters, G. W.; Loehr, T. M.; Sanders-Loehr, J.; Bonander, N. Raman Spectroscopy as an Indicator of Cu-S Bond Length in Type 1 and Type 2 Copper Cysteinate Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (25), 11489–11498.
- (73) LaCroix, L. B.; Randall, D. W.; Nersissian, A. M.; Hoitink, C. W. G.; Canters, G. W.; Valentine, J. S.; Solomon, E. I. Spectroscopic and Geometric Variations in Perturbed Blue Copper Centers: Electronic Structures of Stellacyanin and Cucumber Basic Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (37), 9621–9631.
- (74) Guss, J. M.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P.; Freeman, H. C. The Structure of a Phytocyanin, the Basic Blue Protein from Cucumber, Refined at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1996**, *262* (5), 686–705.
- (75) Mitchell Guss, J.; Freeman, H. C. Structure of Oxidized Poplar Plastocyanin at 1.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1983**, *169* (2), 521–563.
- (76) Guss, J. M.; Bartunik, H. D.; Freeman, H. C. Accuracy and Precision in Protein Structure Analysis: Restrained Least-Squares Refinement of the Structure of

- Poplar Plastocyanin at 1.33 Å Resolution. *Acta Crystallogr. B* **1992**, *48* (6), 790–811.
- (77) Olesen, K.; Veselov, A.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Danner, B.; Scholes, C. P.; Shapleigh, J. P. Spectroscopic, Kinetic, and Electrochemical Characterization of Heterologously Expressed Wild-Type and Mutant Forms of Copper-Containing Nitrite Reductase from *Rhodobacter Sphaeroides* 2.4.3. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37* (17), 6086–6094.
- (78) Sato, K.; Li, C.; Salard, I.; Thompson, A. J.; Banfield, M. J.; Dennison, C. Metal-Binding Loop Length and Not Sequence Dictates Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (14), 5616–5621.
- (79) Velarde, M.; Huber, R.; Yanagisawa, S.; Dennison, C.; Messerschmidt, A. Influence of Loop Shortening on the Metal Binding Site of Cupredoxin Pseudoazurin. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46* (35), 9981–9991.
- (80) Paltrinieri, L.; Borsari, M.; Ranieri, A.; Battistuzzi, G.; Corni, S.; Bortolotti, C. A. The Active Site Loop Modulates the Reorganization Energy of Blue Copper Proteins by Controlling the Dynamic Interplay with Solvent. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 710–715.
- (81) Li, C.; Sato, K.; Monari, S.; Salard, I.; Sola, M.; Banfield, M. J.; Dennison, C. Metal-Binding Loop Length Is a Determinant of the pKa of a Histidine Ligand at a Type 1 Copper Site. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (2), 482–488.
- (82) Hay, M.; Richards, J. H.; Lu, Y. Construction and Characterization of an Azurin Analog for the Purple Copper Site in Cytochrome c Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (1), 461–464.
- (83) Dennison, C.; Vijgenboom, E.; de Vries, S.; van der Oost, J.; Canters, G. W. Introduction of a Cu_A Site into the Blue Copper Protein Amicyanin from *Thiobacillus Versutus*. *FEBS Lett.* **1995**, *365* (1), 92–94.
- (84) Hwang, H. J.; Lu, Y. pH-Dependent Transition between Delocalized and Trapped Valence States of a Cu_A Center and Its Possible Role in Proton-Coupled Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (35), 12842–12847.
- (85) Hwang, H. J.; Berry, S. M.; Nilges, M. J.; Lu, Y. Axial Methionine Has Much Less Influence on Reduction Potentials in a Cu_A Center than in a Blue Copper Center. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (20), 7274–7275.
- (86) Xie, X.; Gorelsky, S. I.; Sarangi, R.; Garner, D. K.; Hwang, H. J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Perturbations to the Geometric and Electronic Structure of the Cu_A Site: Factors That Influence Delocalization and Their Contributions to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5194–5205.
- (87) Alvarez-Paggi, D.; Abriata, L. A.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Native Cu(A) Redox Sites Are Largely Resilient to pH Variations within a Physiological Range. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49* (47), 5381–5383.
- (88) Ledesma, G. N.; Murgida, D. H.; Ly, H. K.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J.; Costa-Filho, A. J.; Vila, A. J. The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu_A Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (39), 11884–11885.
- (89) Alvarez-Paggi, D.; Zitare, U.; Murgida, D. H. The Role of Protein Dynamics and Thermal Fluctuations in Regulating Cytochrome c/cytochrome c Oxidase Electron Transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1196–1207.

- (90) Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in Cu_A Sites of Cytochrome c Oxidase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (33), 9555–9559.
- (91) Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (24), 6302–6306.
- (92) Cunane, L. M.; Chen, Z.-W.; Durley, R. C. E.; Mathews, F. S. X-Ray Structure of the Cupredoxin Amicyanin, from *Paracoccus Denitrificans*, Refined at 1.31 Å Resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1996**, *52* (4), 676–686.
- (93) Adman, E. T.; Jensen, L. H. Structural Features of Azurin at 2.7 Å Resolution. *Isr. J. Chem.* **1981**, *21* (1), 8–12.
- (94) Börger, B.; Gutschank, J.; Suter, D.; Thomson, A. J.; Bingham, S. J. Deconvolution and Assignment of Different Optical Transitions of the Blue Copper Protein Azurin from Optically Detected Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (10), 2334–2339.
- (95) Solomon, E. I.; Hare, J. W.; Dooley, D. M.; Dawson, J. H.; Stephens, P. J.; Gray, H. B. Spectroscopic Studies of Stellacyanin, Plastocyanin, and Azurin. Electronic Structure of the Blue Copper Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (1), 168–178.
- (96) Hadt, R. G.; Sun, N.; Marshall, N. M.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Lu, Y.; Solomon, E. I. Spectroscopic and DFT Studies of Second-Sphere Variants of the Type 1 Copper Site in Azurin: Covalent and Nonlocal Electrostatic Contributions to Reduction Potentials. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (40), 16701–16716.
- (97) Donaire, A.; Jiménez, B.; Fernández, C. O.; Pierattelli, R.; Niizeki, T.; Moratal, J.-M.; Hall, J. F.; Kohzuma, T.; Hasnain, S. S.; Vila, A. J. Metal-Ligand Interplay in Blue Copper Proteins Studied by ¹H NMR Spectroscopy: Cu(II)-Pseudoazurin and Cu(II)-Rusticyanin. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (46), 13698–13708.
- (98) Fernández, C.; Niizeki, T.; Kohzuma, T.; Vila, A. Metal-Ligand Interactions in Perturbed Blue Copper Sites: A Paramagnetic ¹H NMR Study of Co(II)-Pseudoazurin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (1–2), 75–82.
- (99) Comba, P.; Müller, V.; Remenyi, R. Interpretation of the Temperature-Dependent Color of Blue Copper Protein Mutants. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (5), 896–902.
- (100) Murphy, M. E.; Turley, S.; Adman, E. T. Structure of Nitrite Bound to Copper-Containing Nitrite Reductase from *Alcaligenes Faecalis*. Mechanistic Implications. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (45), 28455–28460.
- (101) Mabbott, G. A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (9), 697.
- (102) Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (9), 702.
- (103) Heinze, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. New Analytical Methods(25). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23* (11), 831–847.
- (104) Allen J. Bard; Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*, Second Edition.; John Wiley & Sons, INC.: Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin, 2001.

- (105) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Eicken, C.; Loschi, L.; Sola, M. Redox Chemistry and Acid–Base Equilibria of Mitochondrial Plant Cytochromes c. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38* (17), 5553–5562.
- (106) Beinert, H. Copper A of Cytochrome c Oxidase, A Novel, Long-Embattled, Biological Electron-Transfer Site. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245* (3), 521–532.
- (107) Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E.; Jeuken, L. J. C.; Ranieri, A.; Sola, M. Control of Metalloprotein Reduction Potential: Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Blue Copper Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42* (30), 9214–9220.
- (108) Ainscough, E. W.; Bingham, A. G.; Brodie, A. M.; Ellis, W. R.; Gray, H. B.; Loehr, T. M.; Plowman, J. E.; Norris, G. E.; Baker, E. N. Spectrochemical Studies on the Blue Copper Protein Azurin from *Alcaligenes Denitrificans*. *Biochemistry (Mosc.)* **1987**, *26* (1), 71–82.
- (109) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Loschi, L.; Sola, M. Redox Thermodynamics, Acid-Base Equilibria and Salt-Induced Effects for the Cucumber Basic Protein. General Implications for Blue-Copper Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2* (3), 350–359.
- (110) Berry, S. M.; Ralle, M.; Low, D. W.; Blackburn, N. J.; Lu, Y. Probing the Role of Axial Methionine in the Blue Copper Center of Azurin with Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (29), 8760–8768.
- (111) Garner, D. K.; Vaughan, M. D.; Hwang, H. J.; Savelieff, M. G.; Berry, S. M.; Honek, J. F.; Lu, Y. Reduction Potential Tuning of the Blue Copper Center in *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin by the Axial Methionine as Probed by Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15608–15617.
- (112) Marshall, N. M.; Garner, D. K.; Wilson, T. D.; Gao, Y.-G.; Robinson, H.; Nilges, M. J.; Lu, Y. Rationally Tuning the Reduction Potential of a Single Cupredoxin beyond the Natural Range. *Nature* **2009**, *462* (7269), 113–116.
- (113) Bertrand, P.; Mbarki, O.; Asso, M.; Blanchard, L.; Guerlesquin, F.; Tegoni, M. Control of the Redox Potential in c-Type Cytochromes: Importance of the Entropic Contribution. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (35), 11071–11079.
- (114) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Di Rocco, G.; Ranieri, A.; Sola, M. Enthalpy/entropy Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Electron Transport Metalloproteins. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9* (1), 23–26.
- (115) Lieberman, R. L.; Arciero, D. M.; Hooper, A. B.; Rosenzweig, A. C. Crystal Structure of a Novel Red Copper Protein from *Nitrosomonas Europaea*. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (19), 5674–5681.
- (116) Kau, L. S.; Spira-Solomon, D. J.; Penner-Hahn, J. E.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. X-Ray Absorption Edge Determination of the Oxidation State and Coordination Number of Copper. Application to the Type 3 Site in *Rhus Vernicifera* Laccase and Its Reaction with Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (21), 6433–6442.
- (117) Gerdemann, C.; Eicken, C.; Krebs, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (3), 183–191.
- (118) Pomowski, A.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H.; Einsle, O. N₂O Binding at a [4Cu:2S] Copper–sulphur Cluster in Nitrous Oxide Reductase. *Nature* **2011**, *477* (7363), 234–237.

- (119) Haltia, T.; Brown, K.; Tegoni, M.; Cambillau, C.; Saraste, M.; Mattila, K.; Djinovic-Carugo, K. Crystal Structure of Nitrous Oxide Reductase from *Paracoccus Denitrificans* at 1.6 Å Resolution. *Biochem. J.* **2003**, 369 (1), 77–88.
- (120) Berks, B. C.; Ferguson, S. J.; Moir, J. W. B.; Richardson, D. J. Enzymes and Associated Electron Transport Systems That Catalyse the Respiratory Reduction of Nitrogen Oxides and Oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1995**, 1232 (3), 97–173.
- (121) Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodruff, W. H.; van der Oost, J.; de Vries, S. Metal-Metal Bonding in Biology: EXAFS Evidence for a 2.5 Å Copper-Copper Bond in the Cu_A Center of Cytochrome Oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, 33 (34), 10401–10407.
- (122) Arciero, D. M.; Pierce, B. S.; Hendrich, M. P.; Hooper, A. B. Nitrosocyanin, a Red Cupredoxin-like Protein from *Nitrosomonas Europaea*. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, 41 (6), 1703–1709.
- (123) Basumallick, L.; Sarangi, R.; DeBeer George, S.; Elmore, B.; Hooper, A. B.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. Spectroscopic and Density Functional Studies of the Red Copper Site in Nitrosocyanin: Role of the Protein in Determining Active Site Geometric and Electronic Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (10), 3531–3544.
- (124) Walba, H.; Isensee, R. W. Acidity Constants of Some Arylimidazoles and Their Cations. *J. Org. Chem.* **1961**, 26 (8), 2789–2791.
- (125) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Canters, G. W.; de Waal, E.; Loschi, L.; Warmerdam, G.; Sola, M. Enthalpic and Entropic Contributions to the Mutational Changes in the Reduction Potential of Azurin. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, 40 (23), 6707–6712.
- (126) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, **2001**.
- (127) McEvoy, J. P.; Foord, J. S. Direct Electrochemistry of Blue Copper Proteins at Boron-Doped Diamond Electrodes. *Electrochimica Acta* **2005**, 50 (14), 2933–2941.
- (128) Conrad, L. S.; O. Hill, H. A.; Hunt, N. I.; Ulstrup, J. Direct Electrochemistry of Parsley Plastocyanin on Pyrolytic Graphite Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 364 (1–2), 17–22.
- (129) Harmer, M. A.; Allen, H.; Hill, O. The Direct Electrochemistry of Redox Proteins at Metal Oxide Electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1985**, 189 (2), 229–246.
- (130) Armstrong, F. A.; Allen, H.; Hill, O.; Oliver, B. N.; Whitford, D. Direct Electrochemistry of the Photosynthetic Blue Copper Protein Plastocyanin. Electrostatic Promotion of Rapid Charge Transfer at an Edge-Oriented Pyrolytic Graphite Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107 (6), 1473–1476.
- (131) Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. Mimicking Protein–Protein Electron Transfer: Voltammetry of *Pseudomonas Aeruginosa* Azurin and the *Thermus Thermophilus* Cu_A Domain at ω-Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (43), 13954–13961.

- (132) Laviron, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of Diffusionless Electrochemical Systems. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, *101* (1), 19–28.
- (133) Monari, S.; Battistuzzi, G.; Dennison, C.; Borsari, M.; Ranieri, A.; Siwek, M. J.; Sola, M. Factors Affecting the Electron Transfer Properties of an Immobilized Cupredoxin. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (50), 22322–22329.
- (134) Kohzuma, T.; Dennison, C.; McFarlane, W.; Nakashima, S.; Kitagawa, T.; Inoue, T.; Kai, Y.; Nishio, N.; Shidara, S.; Suzuki, S.; Sykes, A. G. Spectroscopic and Electrochemical Studies on Active-Site Transitions of the Type 1 Copper Protein Pseudoazurin from *Achromobacter Cycloclastes*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (43), 25733–25738.
- (135) Pascher, T.; Karlsson, B. G.; Nordling, M.; Malmstrom, B. G.; Vanngard, T. Reduction Potentials and Their pH Dependence in Site-Directed-Mutant Forms of Azurin from *Pseudomonas Aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212* (2), 289–296.
- (136) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Electrostatic-Field Dependent Activation Energies Modulate Electron Transfer of Cytochrome *c*. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (49), 12814–12819.
- (137) Marcus, R. A.; Sutin, N. Electron Transfers in Chemistry and Biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Bioenerg.* **1985**, *811* (3), 265–322.
- (138) Yanagisawa, S.; Dennison, C. Reduction Potential Tuning at a Type 1 Copper Site Does Not Compromise Electron Transfer Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (47), 16453–16459.
- (139) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Shushanyan, M.; Davis, K. L.; Waldeck, D. H.; van Eldik, R. Fundamental Signatures of Short- and Long-Range Electron Transfer for the Blue Copper Protein Azurin at Au/SAM Junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (7), 2757–2762.
- (140) Webb, M. A.; Loppnow, G. R. Protein Tuning of Excited-State Charge-Transfer Dynamics in Azurin. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (44), 8923–8929.
- (141) Corni, S. The Reorganization Energy of Azurin in Bulk Solution and in the Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy Setup. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (8), 3423–3430.
- (142) Abriata, L. A.; Alvarez-Paggi, D.; Ledesma, G. N.; Blackburn, N. J.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Alternative Ground States Enable Pathway Switching in Biological Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (43), 17348–17353.
- (143) Den Blaauwen, T.; Van de Kamp, M.; Canters, G. W. Type I and II Copper Sites Obtained by External Addition of Ligands to a His117Gly Azurin Mutant. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (13), 5050–5052.
- (144) Berry, S. M.; Bladholm, E. L.; Mostad, E. J.; Schenewerk, A. R. Incorporation of the Red Copper Nitrosocyanin Binding Loop into Blue Copper Azurin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (3), 473–480.
- (145) Clark, K. M.; Yu, Y.; Marshall, N. M.; Sieracki, N. A.; Nilges, M. J.; Blackburn, N. J.; van der Donk, W. A.; Lu, Y. Transforming a Blue Copper into a Red Copper Protein: Engineering Cysteine and Homocysteine into the Axial Position of Azurin Using Site-Directed Mutagenesis and Expressed Protein Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (29), 10093–10101.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

6.1 Conclusiones y modelo regulatorio propuesto

El sitio de Cu_A cumple un papel determinante en el sostenimiento de la vida de organismos aeróbicos ya que ejerce un rol central en la respiración celular. Esta tesis plantea profundizar el entendimiento de los factores que determinan sus propiedades y mecanismos de regulación. Los resultados presentados en los tres capítulos experimentales muestran que existe una diversidad de variables capaz de modular los distintos parámetros de la reacción de TE, así como también la población de sus dos estados fundamentales alternativos, cuyos parámetros redox fueron determinados por primera vez en la misma especie.

En el capítulo 3 queda demostrada la capacidad de alterar la diferencia de energía entre ambos estados fundamentales alternativos del sitio de Cu_A ($\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$), y así la población relativa de dichos estados, a partir de dos tipos de mutaciones distintas: mutaciones puntuales del ligando axial M160 y mutaciones de segunda esfera de coordinación ^{1,2}. Según las distintas evidencias espectroscópicas, no se producen alteraciones geométricas significativas en el sitio de Cu_A de la mano de esta modulación del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, señalando la sensibilidad de dicho parámetro a perturbaciones estructurales leves. Además, la combinación de ambos tipos de mutaciones, como en el caso de la variante Tt-3L-M160H, resultan en una aditividad de efectos espectroscópicos y electroquímicos, mostrando así la capacidad del sitio de Cu_A de censar simultáneamente la confluencia de distintas perturbaciones. Este hallazgo cobra importancia al considerar la complejidad del medio fisiológico en el que este sitio redox desarrolla su actividad, donde existe una gran cantidad de factores variables.

Los resultados presentados en el capítulo 4 muestran además que, dependiendo del valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ en relación a la energía libre de activación correspondiente a la reacción de TE (ΔG^*), es uno u otro estado fundamental (σ_u^* o π_u) el que resulta redox activo. Esto permite estudiar por separado las propiedades electroquímicas de ambos estados alternativos a partir de mutantes con distintos valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. En dicho capítulo se propone un modelo en el cual el estado redox activo es determinado por la relación entre los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y del potencial redox (E^0), parámetros que pueden ser manipulados mediante las estrategias mutagénicas empleadas y, en el caso del E^0 , también por cambios en la atmosfera iónica del sitio. Estos cambios, producidos en distintos experimentos a partir del pH y de la fuerza iónica del medio, permiten modulaciones del E^0 del orden de los 100 mV que, sumados a las variaciones de más de un orden de magnitud en el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de las distintas mutantes, exponen una gran capacidad regulatoria del estado redox activo del sitio de Cu_A. Este hallazgo cobra

particular relevancia bajo la hipótesis de que la interacción del dominio de Cu_A de la citocromo c oxidasa (CcO) con su *partner* biológico, el citocromo c (Cyt c), sería capaz de producir tanto perturbaciones estructurales leves en el sitio de Cu_A como modificaciones en su atmosfera iónica, lo cual será discutido hacia el final de la sección en una interpretación más amplia de los resultados experimentales.

El *Switch* funcional dependiente de pH que presenta la mutante M160H, y que es caracterizado en el capítulo 4, confirma la capacidad de ambos estados fundamentales alternativos de actuar como estado redox activo en una misma proteína de Cu_A³. Más aún, los resultados electroquímicos confirman las diferencias que presentan los parámetros cinéticos para la reacción de TE de ambos estados, a saber, la energía de reorganización (λ) y el acoplamiento electrónico ($|H_{DA}|$). También señalan que, a pesar de que el valor de λ del estado π_u es superior al del estado σ_u^* , la velocidad de TE es sobrecompensada por el fuerte aumento de $|H_{DA}|$ en la reacción heterogénea. Este resultado resulta particularmente interesante si se tiene en cuenta un estudio computacional reciente en el que se sugiere que el estado π_u está optimizado para la entrada del electrón desde el Cyt c, ya que su acoplamiento electrónico sobrecompensaría el elevado valor de λ ². Además, los resultados obtenidos en el capítulo 5 a partir de las proteínas T1 quiméricas, en conjunto con los reportes sobre el modelo Cu_A-Azu, evidencian el fuerte impacto que puede tener la matriz proteica en la determinación de las propiedades estructurales y funcionales del sitio activo. En suma, los cambios en las concentraciones iónicas del medio y las perturbaciones inducidas por las interacciones proteína-proteína configuran un conjunto de factores capaces de modular finamente las tres variables que determinan la cinética del proceso de TE: E^0 , λ y $|H_{DA}|$.

Todas estas conclusiones pueden interpretarse en un marco más amplio, considerando avances recientes en el estudio del *partner* biológico del Cu_A, el Cyt c, así como también en complejos CcO / Cyt c y similares^{2,4-6}. Todos los resultados hasta aquí comentados sugieren que la interacción del sitio de Cu_A con el Cyt c sería crítica en la regulación de la reacción de TE, y por lo tanto de la respiración celular. Se propone a continuación un modelo regulatorio de las reacciones de TE hacia y desde el sitio de Cu_A, en el cual los diversos factores presentes en el entorno fisiológico pueden modular su actividad optimizando simultáneamente una alta velocidad (compatible con los requerimientos fisiológicos), una baja fuerza impulsora (cercana a cero) y la direccionalidad del proceso⁷ (figura 6-1).

El Cyt c actúa como transportador soluble de electrones entre el complejo III y el complejo IV de la cadena respiratoria. El reconocimiento y formación del complejo transiente con la CcO involucra generalmente interacciones electrostáticas entre un parche de lisinas del Cyt c con la región de unión negativamente cargada en la CcO, específicamente en la subunidad de Cu_A, aunque existen casos (como el de *T.*

Thermophilus) donde la interacción se da mediante otro tipo de complementariedad ^{4-6,8,9} (figura 6-1 A y B). Cualquiera sea el caso, este paso de reconocimiento no necesariamente produce una conformación óptima para la reacción de TE, por el contrario, algunos estudios sugieren que es necesario un paso de reorientación del Cyt c para optimizar el *pathway* de mayor acoplamiento electrónico entre su sitio activo y el aceptor electrónico ¹⁰ (figura 6-1 C i). Además, hay evidencia que indica que el Cyt c presenta un estado de “reposo” en el cual tiene un valor de λ relativamente alto, y que es capaz de convertirse a un estado de bajo valor de λ (favoreciendo la TE) a partir de perturbaciones en la segunda esfera de coordinación que no implican pérdida de la estructura secundaria ni terciaria nativa ¹¹ (figura 6-1 C iii). El contacto interproteico es capaz de inducir distorsiones estructurales en ambas proteínas, en concordancia con resultados de estudios de RMN a partir del complejo Cyt c₅₅₂/Tt-Cu_A, así como también diversos estudios en sistemas similares como por ejemplo los complejos entre plastocianina y sus *partners* biológicos o el complejo Rusticianina/citocromo c₄, ^{2,4-6}.

La variación en el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ generada a partir de las perturbaciones inducidas por las diversas mutaciones, particularmente las de segunda esfera (como se estudió en el capítulo 3), evidencia la potencial capacidad de la interacción CcO-Cyt c como modulador de tal parámetro (figura 6-1 C iv). Esta interacción además puede modificar significativamente la atmosfera iónica del sitio de Cu_A, permitiendo modular el valor del E^0 y así la fuerza impulsora del proceso (figura 6-1 C ii). En ambos casos el efecto puede variar en función de la reorientación del complejo interproteico, que podría entonces no sólo optimizar el acoplamiento electrónico, sino además modular los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y/o el E^0 del sitio de Cu_A. Por lo tanto, las interacciones proteína-proteína podrían determinar la activación del estado π_u o del estado σ_u^* como RAMO, optimizados para la entrada y para la salida del electrón, respectivamente ².

Para recapitular, si se consideran los resultados de esta tesis y algunos estudios computacionales previos que señalan la dependencia de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ con diversas perturbaciones geométricas menores en el sitio de Cu_A, es evidente que la interacción con el Cyt c tiene la potencial capacidad de modular todos los parámetros relevantes de la reacción de TE. La formación del complejo transiente podría modular el potencial redox de ambas proteínas al mismo tiempo que promovería la forma de bajo valor de λ del Cyt c y poblaría el estado π_u del sitio de Cu_A, optimizado para la entrada del electrón vía el residuo M160 (figura 6-1 C). Estos procesos, junto a la reorientación del Cyt c que optimizaría el acoplamiento electrónico, podrían ser concertados o secuenciales, pero en cualquier caso serían capaces de conciliar una baja fuerza impulsora ($\Delta G \approx 0$) con una alta constante cinética, permitiendo un proceso de TE eficiente del Cyt c al sitio de Cu_A de la CcO (figura 6-1 D). Según resultados previos, el estado π_u no es un mínimo estable en el sitio de Cu_A reducido, lo que significa que una vez producida la reacción de TE el estado fundamental del sitio de Cu_A es únicamente σ_u^* . Esto prevendría la reacción de TE inversa (del Cu_A al Cyt c), mientras que el estado σ_u^* (único estable en la forma

reducida) presenta un acoplamiento electrónico alto para la TE hacia el hemo *a* (o *b*) de la CcO (vía H157) y un menor valor de λ , por lo tanto, se encuentra optimizado para esa reacción (figura 6-1 E). De esta manera, el modelo propuesto conferiría direccionalidad al proceso completo de TE ^{2,7}. La cadena de reacciones redox continúa hasta producirse la reducción de O₂ a H₂O y el bombeo de protones contra gradiente hacia el espacio intermembrana (figura 6-1 F).

Los resultados presentados en el capítulo 5 sobre las proteínas quiméricas Tipo 1 (T1) y los reportes acerca de las propiedades del modelo Cu_A-Azu muestran que la naturaleza de la matriz proteica resulta de gran impacto en las propiedades estructurales y funcionales del sitio activo. Esto puede ser determinante en la regulación de la TE a nivel del sitio de Cu_A, ya que el bombeo de protones contribuye al establecimiento de un campo eléctrico interfacial que puede afectar a la CcO, imponiendo cambios en la estructura y la dinámica de la matriz proteica. Más aún, algunos estudios sugieren que el campo eléctrico puede afectar el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, así como también la dinámica del complejo Cyt *c*/CcO ^{2,10}. Esto podría traducirse en un sistema de retroalimentación negativa, en el cual un desbalance entre la translocación de protones y su consumo por la ATPasa genera un incremento del campo eléctrico local que desfavorece simultánea-mente la TE en ambas proteínas, bloqueando virtualmente el proceso. De esta manera, tanto la variación del campo eléctrico interfacial, de la fuerza iónica y del pH del medio, la formación del complejo transiente con el Cyt *c* y su dinámica, como también distintas perturbaciones inducidas a través del resto de la matriz proteica de la CcO se presentan como potenciales actores de un complejo mecanismo regulatorio *in vivo* que permitiría una regulación fina con numerosos puntos de control.

Finalmente, las propiedades espectroscópicas y electroquímicas de ambas quimeras T1, en comparación con sus contrapartes silvestres, ponen de manifiesto el carácter insuficiente del modelo de distorsión acoplada para su racionalización. Los cálculos computacionales a partir de la estructura cristalográfica de Ami-Cu_A demuestran que para esta proteína las variables estructurales asociadas en dicho modelo se presentan desacopladas. Cabe recordar que ambas proteínas conservan tanto los ligandos del sitio activo como la segunda esfera de coordinación y la longitud del bucle ligante intactos, siendo la matriz proteica su única diferencia con los sitios silvestres. El rol de la matriz proteica como determinante estructural del sitio activo ha sido típicamente minimizado, no obstante, los resultados presentados en el capítulo 5 señalan el enorme impacto que puede tener en las propiedades del sitio redox. Estas conclusiones sugieren la necesidad de incorporar elementos de la matriz proteica en un modelo que permita abarcar más cantidad de sitios T1 (y T2) y racionalizar sus propiedades con mayor precisión. Además, en conjunto con otros resultados a lo largo de la tesis, exponen una variedad de estrategias que permiten la manipulación de diversas propiedades en los sitios de activos de cupredoxinas, modificando mutagénicamente la primera y la segunda esfera

de coordinación, así como también la matriz proteica. La racionalización de las componentes entrópica y entálpica al E^0 , asociadas al valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y la hidrofobicidad del ligando axial, respectivamente, constituyen otra herramienta útil en este sentido.

A lo largo de la tesis se utilizaron estas estrategias en el diseño de diversas proteínas mutantes que permitieron profundizar el entendimiento sobre los determinantes de las propiedades estructurales y funcionales de los sitios de cobre. Sin embargo, el alcance de estas estrategias tiene un potencial mayor, especialmente considerando el hallazgo de variantes T1 con un poro que permite el acceso de ligandos exógenos a la coordinación del sitio activo. Todo esto en conjunto abre un abanico de posibilidades para el diseño inteligente de diversos tipos de sensores, catalizadores y componentes bioelectrónicos en general.

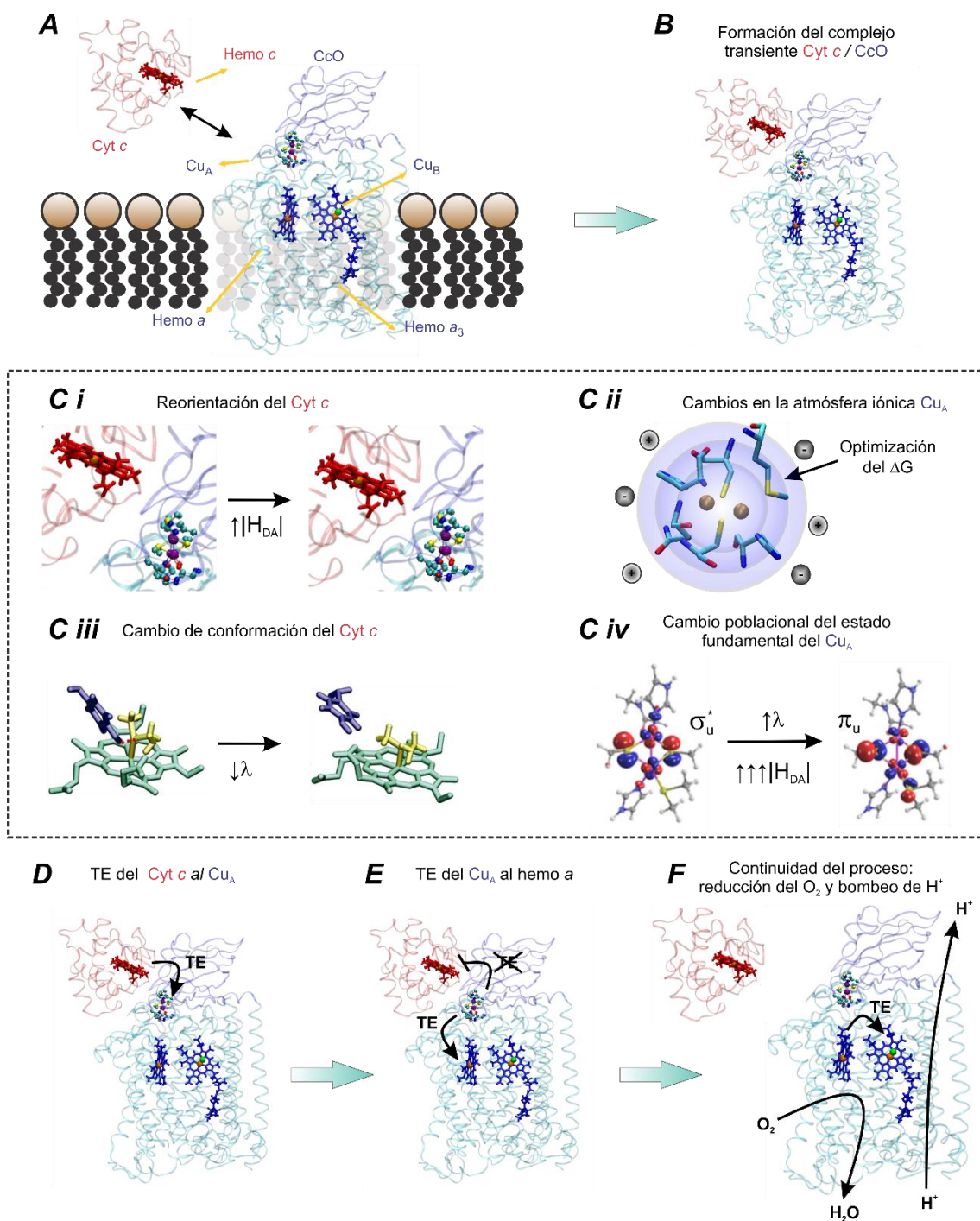


Figura 6-1. Modelo regulatorio de la TE en el complejo Cyt c/CcO. (A) El Cyt c reducido interactúa con la CcO. (B) Se forma el complejo Cyt c/CcO. (C) Se optimiza la TE por: (i) reorientación del Cyt c, aumentando el $|H_{DA}|$; (ii) ecualización del ΔG como consecuencia de cambios en la atmósfera iónica; (iii) Cambio conformacional del Cyt c a un estado de bajo valor de λ ; (iv) Aumento de la población del estado π_u en el sitio de Cu_A, cuyo aumento del $|H_{DA}|$ sobrecompensa el aumento de λ . (D) La TE se encuentra cinéticamente favorecida. (E) La direccionalidad de la reacción se preserva dado que ambos sitios redox pierden los factores que optimizan la TE, favoreciéndose la reducción del hemo a. (F) El proceso continúa hasta la reducción del O₂ a H₂O y el bombeo protónico contragradiente.

6.2 Referencias

- (1) Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Murgida, D. H.; Vila, A. J. Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (24), 6302–6306.
- (2) Abriata, L. A.; Alvarez-Paggi, D.; Ledesma, G. N.; Blackburn, N. J.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Alternative Ground States Enable Pathway Switching in Biological Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (43), 17348–17353.
- (3) Zitare, U.; Alvarez-Paggi, D.; Morgada, M. N.; Abriata, L. A.; Vila, A. J.; Murgida, D. H. Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in Cu_A Sites of Cytochrome c Oxidase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (33), 9555–9559.
- (4) Díaz-Moreno, I.; Díaz-Quintana, A.; Díaz-Moreno, S.; Subías, G.; De la Rosa, M. A. Transient Binding of Plastocyanin to Its Physiological Redox Partners Modifies the Copper Site Geometry. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (26), 6187–6194.
- (5) Giudici-Orticoni, M.-T.; Guerlesquin, F.; Bruschi, M.; Nitschke, W. Interaction-Induced Redox Switch in the Electron Transfer Complex Rusticyanin-Cytochrome c 4. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (43), 30365–30369.
- (6) Muresanu, L.; Pristovsek, P.; Lohr, F.; Maneg, O.; Mukrasch, M. D.; Ruterjans, H.; Ludwig, B.; Lucke, C. The Electron Transfer Complex between Cytochrome c₅₅₂ and the Cu_A Domain of the *Thermus Thermophilus* ba₃ Oxidase: A combined NMR and computational approach. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (20), 14503–14513.
- (7) Alvarez-Paggi, D.; Zitare, U.; Murgida, D. H. The Role of Protein Dynamics and Thermal Fluctuations in Regulating Cytochrome c/cytochrome c Oxidase Electron Transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1196–1207.
- (8) Millett, F.; Durham, B. Design of Photoactive Ruthenium Complexes To Study Interprotein Electron Transfer. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41* (38), 11315–11324.
- (9) Williams, P. A.; Blackburn, N. J.; Sanders, D.; Bellamy, H.; Stura, E. A.; Fee, J. A.; McRee, D. E. The Cu_A Domain of *Thermus Thermophilus* ba₃-Type Cytochrome c Oxidase at 1.6 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6* (6), 509–516.
- (10) Alvarez-Paggi, D.; Martín, D. F.; DeBiase, P. M.; Hildebrandt, P.; Martí, M. A.; Murgida, D. H. Molecular Basis of Coupled Protein and Electron Transfer Dynamics of Cytochrome c in Biomimetic Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5769–5778.
- (11) Alvarez-Paggi, D.; Castro, M. A.; Tórtora, V.; Castro, L.; Radi, R.; Murgida, D. H. Electrostatically Driven Second-Sphere Ligand Switch between High and Low Reorganization Energy Forms of Native Cytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (11), 4389–4397.

Agradecimientos

El primer y más obvio agradecimiento es para Daniel. No hubo una sola vez en estos casi 7 años donde él no estuviera a disposición para cualquier cosa, desde no entender algo o tener problemas con un experimento hasta no saber que regalarle a mi novia. El tipo se saca los lentes, mueve la silla casi 90°, se tira para atrás y te escucha atentamente, y se ocupa, siempre se ocupa. Aprendí muchísimas cosas a nivel académico y no menos cosas a nivel personal, que seguramente terminaré valorando mucho más. No sólo es un tipo inteligentísimo y un científico espectacular, que brinda continuamente sus conocimientos a la gente que está formando, sino que muestra sistemáticamente una ética labora (entre otras) que en mí deja sin dudas una marca. Son muchos los esfuerzos que hace para que las personas que trabajamos en el laboratorio dispongamos de las mejores condiciones para hacerlo, y eso es algo que hace la diferencia. Gracias. Por la presencia, por la orientación, por la enseñanza, por el ejemplo, por la honestidad, por leer y corregir mil versiones espantosas de cada capítulo de esta tesis hasta haber llegado a algo razonable y sobre todo por el esfuerzo que implicó haberme formado.

El segundo y no menos obvio agradecimiento es para Damián, mi codirector en los hechos (aunque no lo sea en los papeles). Él fue quien me puso bajo su ala desde el primer momento y la cantidad de tiempo y esfuerzo que dedicó a enseñarme a hacer experimentos, a hacerlos conmigo y a ayudarme a entender cosas es inmensurable. Con él disfruté muchísimo los días en el laboratorio, hablando de mil cosas, escuchando música, haciendo experimentos, celebrando éxitos, burlándonos de nuestros propios fracasos y pensando y repensando las cosas para “encontrarle la vuelta”. Pero más importante que todo eso (que no es poco), encontré en él un amigo, uno de verdad, y eso es por lejos lo más valioso que me dejó todo este proceso. Así que Damián, por tu rol de mentor y por tu ayuda en el labo, pero muy por sobre todo por tu invaluable amistad, gracias.

Una persona que posiblemente no sea del todo consciente de su importancia en mi doctorado es Johnny. Él fue a mi hace unos años lo que yo a Damián allá por el 2010: cayó un día a empezar a medir “cosas” y cuando se notó que tenía ganas y compromiso Daniel me propuso hacerme cargo de enseñarle a trabajar en el labo. Hay una verdad de Perogrullo que señala que quien asume el rol de maestro aprende tal vez tanto como el alumno, y yo con Johnny lo comprobé. Gracias por tus pilas en el labo, por tu compromiso con todo, por tu predisposición, por las innumerables charlas, por tu calidad humana y por haberme permitido aportar en tu formación, algo que me enriqueció enormemente.

Siento agradecimiento hacia todas las personas que forman y formaron parte del labo, que contribuyeron siempre a que haya un clima de laburo espectacular. Gracias a Marcelo y a Flor por haberme recibido tan cálidamente desde el primer momento.

Gracias a Dofi, con quien arribamos casi al mismo tiempo, por todas las charlas, por tu disposición a ayudar siempre que hizo falta, por tus pilas. Gracias a Walde también por esa calma parsimoniosa que tanto bien hace cuando uno está completamente desesperado con sus “no resultados”. Gracias a Marian y a Ceci por esa buena onda infinita que siempre tienen y transmiten, y que se percibe constantemente. Gracias a Santi y a Lean, los recientes becarios junto con Johnny, por enriquecer el ambiente como lo hacen, por ese compañerismo que siempre muestran.

Muchísimas gracias también a Alejandro Vila, alias Tato, y a la gente de su laboratorio en el IBR por las proteínas y por haberme recibido allá. En mi estadía en Rosario me abrieron las puertas y me hicieron sentir uno más desde el primer momento, invitándome a cenar, a fiestas, a tomar algo, a salir, a conocer. Gracias especialmente a Andrés Espinoza por hacerse cargo de mi estadía, esperarme todos los días en la puerta del IBR para entrar, enseñarme los protocolos de purificación y hacerlos conmigo. También a Marcos Morgada por haber ayudado en todo eso y por las salidas en la noche rosarina. A Tato por abrirme las puertas de su casa, por aquel asado y por hacerme sentir tan a gusto, tan como en casa. Gracias a todo el grupo por haberse acomodado para facilitarme el trabajo y por hacerme sentir tan bien durante mi estadía.

Quiero extender mi agradecimiento a las personas con las que compartí, en mayor o menor medida, el INQUIMAE como lugar de trabajo, donde siempre me sentí cómodo y la gente suele estar a disposición para dar una mano si hace falta. Gracias a los docentes de las materias que cursé en el doctorado, especialmente a San Román que tan bien predispuesto estuvo siempre para ayudarme con mi mal manejo de tiempos, reabriendo inscripciones o haciendo cadenas de mails para reacomodar clases y hasta algún examen. También a las personas con quienes compartí la docencia, quienes también me enseñaron cosas y me brindaron un clima laboral siempre excelente. También a quienes fueron mis compañeros en la carrera de grado, que siento parte integral de todo mi proceso universitario. Entre ellos, un agradecimiento súper especial a Bruno, porque su amistad fue uno de los mayores tesoros que me llevo de esta década universitaria, y en lo que respecta a esta tesis, porque fue él quien me introdujo con Damián para empezar a hacer cosas en el labo. Eso fue evidentemente un momento bisagra, y de los buenos. Gracias al departamento y por extensión a la UBA, que nunca me cobró un solo centavo por todo lo que me brindó, y al CONICET, por haberme becado durante los 5 años que duró mi doctorado, lo que me permitió enfocar mis energías en llevarlo adelante y poder crecer con proyectos personales como vivir por mi cuenta, que no fue poca cosa.

Estos años de doctorado no sólo significaron un aprendizaje académico para mí sino también una serie de transiciones en muchos aspectos de mi vida, algunas nada fáciles, y por eso quiero agradecer a las personas que estuvieron ahí para ayudarme a sostener el timón y a enderezarlo cuando por ahí me mareaba un poco. Gracias a “los pibes”, que siempre siempre siempre están: Marian, Colombo, Diega, Dani, Nico, Yeyo. A los chicos de las bandas que tuve la suerte de integrar, tanto La Mano Maldita, Cacique, Brutalium, Monjas Galácticas y FTS me hicieron muy feliz y me aportaron

muchísimo. También a los chicos de Las Monjas FC, especialmente a Agustín, amigo de fierro, por haberme dado la oportunidad de esa revancha personal y el bicampeonato. Gracias al J. Weed y a Dani por la mano con la remodelación de mi casa, que tanta falta me hizo. Y muchas muchas pero muchas gracias a Sabri, esa persona que, sin importar desde qué lugar, siempre me apoyó incondicionalmente, siempre creyó en mí y siempre me ayudó cuando la necesité. Es mucho lo que me enseñaste e invaluable tu aporte en mi vida, para ser hoy quien soy, y no puedo menos que estarte eternamente agradecido.

Quiero agradecerle muy pero muy especialmente a Renata, por el mero hecho de ser quien es y por haberme elegido para construir juntos el resto de su historia y de la mía, que es ahora nuestra historia. Mi vida cambió radicalmente con vos a niveles que, aunque trate, me cuesta transmitirte; y cada uno de esos cambios te lo agradezco profundamente, y cada momento con vos te lo agradezco profundamente, y si pude hacer todo lo que hice este último año y medio fue porque estuviste conmigo. Gracias por hacerme feliz cada día, por devolverle los colores al mundo, por hacerme mejor. Gracias.

También quiero agradecerle a mi hermana Anahí, a esa persona que atraviesa mi vida de lado a lado, porque es su piedra angular. Ella es algo así como idéntica a mí, pero todo lo contrario. El concepto de comunicación debería redefinirse para abarcar nuestro vínculo de eternos cómplices. Nuestros viajes, nuestras charlas, nuestras discusiones, todo eso es una parte integral e inescindible de mí, y por lo tanto de estos años que abarcaron mi doctorado. Finalmente, el agradecimiento a mis viejos, Graciela y Alejandro. Podría escribir un libro sobre ellos (lo haría con mi hermana, por cierto), sobre todo lo que son para mí, sobre todo lo que me brindaron, que constituye ni más ni menos que los pilares fundamentales de quien soy. Me enseñaron una infinidad de cosas que acabo de borrar por la extensión de la lista, pero una de las más influyentes para esta tesis es sin dudas la inquietud de cuestionarme el mundo y la necesidad de entenderlo mejor cada día. La imagen de mi vieja en una pierna subiendo con bastón un sendero de montaña de 7 horas describe perfectamente lo que me enseñó sobre la fuerza de voluntad, y la ética tozuda de mi papá me recuerda todos los días de donde salió esa lealtad absoluta que tengo con mi corazón. Gracias viejos, por hacerme quien soy, por ser quienes son, por ser tan incondicionales y por haberme brindado y seguir brindándome tanto.

Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
CcO	Citocromo c oxidasa
Cyt	Citocromo
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
EXAFS	Absorción de Rayos x extendida a la estructura fina
FWHM	Ancho a la altura media de pico
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
N ₂ OR	N ₂ O reductasa
NiR	Nitrito reductasa
pK _{aA}	pKa Aparente
RAMO	Orbital molecular redox activo
RMN	Resonancia magnética nuclear
RR	Raman resonante
SAM	Monocapa autoensamblada
SPR	Resonancia de plasmón superficial
TCLM	Transferencia de carga ligando metal
TE	Transferencia electrónica
VC	Voltametría cíclica
VL	Valencia localizada
VM	Valencia mixta
VMa	Valencia localizada asimétrica
VMs	Valencia localizada simétrica

