

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Modulación de los parámetros de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre naturales y artificiales

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

Jonathan Szuster

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

Consejero de estudios: **Dr.Horacio R. Corti**

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

Buenos Aires, 2022

Modulación de los parámetros de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre naturales y artificiales

Resumen

Este trabajo de tesis trata sobre la relación entre los distintos determinantes estructurales y los parámetros asociados a la reacción de transferencia electrónica (TE) en metaloproteínas de cobre. Se abordaron principalmente dos clases de centros de cobre, centros mononucleares de "tipo 1" (T1) y centros binucleares de tipo Cu_A. En esta oportunidad el sistema de estudio consiste en el dominio soluble que contiene al sitio de Cu_A en la citocromo *c* oxidasa de *Thermus thermophilus*. Mediante ingeniería de bucles uno de los tres bucles que conforman el sitio binuclear de Cu_A fue reemplazado por bucles análogos que contienen ligandos que conforman sitios de tipo 1, generando sitios mononucleares de cobre novedosos. También se generaron proteínas quimeras donde esos tres bucles fueron reemplazados total o parcialmente por bucles análogos en de especies eucariotas generando sitios de Cu_A perturbados.

El estudio sobre la colección de quimeras con sitios de T1 en el marco de la teoría de TE de Marcus revelo que el potencial de reducción parece estar determinado esencialmente por la matriz proteica, presentando correlaciones suaves con las distorsiones geométricas introducidas en el sitio de cobre. Por otro lado, la energía de reorganización (λ) está determinada localmente por el grado de exposición a solvente del sitio de cobre, el que depende estrictamente del largo del bucle implantado. Este desacople permite la modulación independiente de ambos parámetros por primera vez en este tipo de sistemas. Por otro lado, la estructura electrónica de los sitios de Cu_A puede ser descripta mediante una superficie de energía potencial con dos mínimos que se corresponden a dos estados funcionales alternativos. Las quimeras de Cu_A estudiadas en esta tesis permitieron profundizar nuestro entendimiento sobre las propiedades estructurales que determinan la interconversión entre ambos estados, la cual se cree que cumple un rol fundamental en la TE *in vivo*.

Finalmente, se abordó el estudio de los mecanismos de TE heterogénea bajo el régimen de control friccional, donde empleando soluciones con distinto grado de viscosidad se interrogó el rol de la dinámica proteica. Empleando *films* proteicos adsorbidos sobre electrodos funcionalizados se logró modular sistemáticamente el grado de acoplamiento electrónico del binomio proteína-electrodo, y de esta manera el pasaje gradual desde un régimen no adiabático, donde vale la Teoría de Marcus de TE, a un régimen más complejo que no puede ser explicado por dicha teoría. Los resultados obtenidos permitieron el desarrollo de una nueva propuesta de TE para este régimen.

Palabras clave: transferencia electrónica, citocromo *c* oxidasa, sitio de Cu_A, sitio T1, ingeniería de bucles, proteínas quimeras, bioelectroquímica, espectroscopia, energía de reorganización, potencial de reducción, estados fundamentales alternativos, *films* proteicos, régimen friccional, viscosidad.

Tuning of electron transfer parameters in natural and artificial copper metalloproteins

Abstract

This dissertation discusses on the relation between different structural determinants and the parameters associated with the electron transfer (ET) in copper metalloproteins. Specifically, it addresses two types of copper centres, mononuclear type 1 copper sites (T1) and binuclear Cu_A sites. In this opportunity the protein moiety consisted in a soluble domain that contains the Cu_A site in the cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Employing a loop swapping strategy one of the loops that define the Cu_A site was replaced by analogous sequences that carry the coordinating residues that are involved in the assembly of T1 copper sites. This procedure led to a set of different chimeric proteins which harbour novel T1 copper sites. Another set of chimeric proteins was developed by replacing either one or three of the loops that assembly the Cu_A site by analogous sequences from eukaryotic organisms, leading to a set of chimeras with perturbed Cu_A sites.

The study of the chimeras with T1 copper sites within the framework of Marcus TE theory revealed that the reduction potential is determined by the protein scaffold, showing smooth correlations with geometric distortions introduced in the metal site. Furthermore, the reorganization energy, λ, is determined by the degree of exposure of the metal site to the surrounding solvent. This exposure, in turn, depends strictly on the length of the loop sequence implanted. The disconnection between these two parameters allow for their independent modulation, for the first time in this type of systems. On the other hand, the electronic structure of the Cu_A sites can be described as a double-well potential energy surface where both minima correspond to two functional alternative ground states. The Cu_A chimeras studied in this thesis allow us to deepen our understanding in how the structural properties of the metal centre determine the interconversion between these ground states, which are proposed to play a major role in *in vivo* ET processes.

Finally, the mechanism of heterogeneous ET under a friction-controlled regime was studied. By changing the viscosity of the protein surroundings we tested the role of the protein dynamics in the ET process. Employing protein films adsorbed on biocompatible coated electrodes we were able to change systematically the degree of electronic coupling between the metal centre and the electrode surface. This strategy allows us to gradually leave the non-adiabatic regime, were Marcus ET theory is valid, an enter to a more complex and non-trivial regime which cannot be treated within the Marcus framework. Our results help to develop a new ET theory for this specific regime.

Key words: electron transfer, cytochrome c oxidase, Cu_A site, T1 copper site, T2 copper site, loop engineering, chimeric proteins, bioelectrochemistry, spectroscopy, reorganization energy, reduction potential, alternative ground states, protein films, friction-controlled ET regime, viscosity.

Índice

1 Marco conceptual y fundamentos teóricos

1.1 Motivación y objetivos generales 1

1.2 Metaloproteínas redox 5

1.2.1 Centros de cobre en la naturaleza 6

1.2.2 Metaloproteínas artificiales 14

1.2.2.1 Mutaciones puntuales 14

1.2.2.2 Generación de proteínas quiméricas 18

1.2.2.3 Diseño de metaloproteínas *de novo* 21

1.3 Transferencia electrónica 22

1.3.1 Teoría de Transferencia Electrónica de Marcus 23

1.3.2 La interfaz electrodo-solución 30

1.3.3 Electrodos biocompatibilizados: monocapas de autoensambladas 31

1.3.4 Obtención electroquímica de parámetros redox: voltametría cíclica 35

1.4 Técnicas espectroscópicas y auxiliares 38

1.4.1 Espectroscopia de absorción electrónica 39

1.4.2 Espectroscopia Raman resonante 41

1.4.3 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) 44

1.4.4 Voltametría de corriente alterna (ACV) 48

1.4.5 Cronoamperometría 50

1.5 Referencias 52

2 Materiales y métodos.

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos 67

2.1.2 Muestras proteicas 67

2.2 Métodos electroquímicos

2.2.1 Armado y funcionalización de electrodos metálicos 70

2.2.2 Voltametría cíclica para especies en solución ……..72
2.2.3 Voltametría cíclica para especies adsorbidas …….. 75
2.2.3.1 Método de Laviron …….. 77
2.2.4 Voltametría de corriente alterna para especies adsorbidas …….. 81
2.2.4.1 Método de Creager …….. 81
2.3 Técnicas espectroscópicas y auxiliares
2.3.1 Espectroscopia de absorción electrónica …… 85
2.3.2 Espectroscopia Raman resonante …….. 85
2.3.3 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) …….. 85
2.3.4 Cronoamperometría …….. 86
2.3.5 Cálculos de simulaciones computacionales …….. 86
2.4 Referencias …….. 88

3 Metaloproteínas artificiales conteniendo sitios de cobre de Tipo 1 y Tipo 2
3.1 Introducción
3.1.1 Las proteínas azules de cobre …… 89
3.1.2 Descripción electrónica de los sitios T1 …….. 93
3.1.3 El modelo de distorsión acoplada …….. 97
3.2 Generación de proteínas quimeras empleando la matriz del dominio de Cu_A de *Thermus thermophilus* …….. 100
3.3 Caracterización espectroscópica
3.3.1 Espectroscopia de absorción electrónica …… 102
3.3.2 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) …… 107
3.3.3 Espectroscopia Raman resonante …… 109
3.4 Generación de modelos estructurales *in silico* …… 112
3.5 Caracterización electroquímica de soluciones proteicas
3.5.1 Modulación del potencial de reducción …… 123
3.5.2 Obtención de las contribuciones entrópica y entálpica al potencial de reducción …… 131
3.6 Caracterización electroquímica en la interfaz electrodo-solución
3.6.1 Obtención de parámetros cinéticos de la reacción de TE …….. 140
3.7 Metaloproteínas con sitios de cobre de Tipo 2

3.7.1 Formación de un sitio de cobre de Tipo 2 mediante coordinación de un ligando exógeno 153
3.7.1.1 Caracterización espectroscópica 153
3.7.1.2 Caracterización electroquímica 158
3.7.1.3 Obtención de constantes de unión con imidazol 160
3.7.2 Formación de un sitio de cobre de Tipo 2 mediante ingeniería de bucles en la matriz de *Tt*-Cu_A 167
3.7.2.1 Caracterización espectroscópica 167
3.7.2.2 Caracterización electroquímica 170
3.8 Conclusiones 174
3.9 Referencias 176

4 Metaloproteínas artificiales conteniendo sitios de Cu_A.
4.1 Introducción
4.1.1 El sitio de Cu_A en la naturaleza 185
4.1.2 Estructura electrónica del sitio de Cu_A 190
4.1.3 Algunos antecedentes del grupo 194
4.1.4 Hipótesis de trabajo: acoplamiento de coordenadas de reacción de TE e interconversión σ_u^*/π_u 197
4.1.5 Implicancias en la TE *in vivo* 199
4.2 Generación de proteínas quimeras con sitios de Cu_A 200
4.3 Caracterización espectroscópica: obtención de valores de la diferencia energética entre estados σ_u^*/π_u ($\Delta E_{\sigma/\pi}$) 201
4.4 Caracterización electroquímica: obtención de parámetros termodinámicos de la TE 207
4.5 Caracterización electroquímica en la interfaz electrodo-solución: obtención de parámetros cinéticos de la TE 217
4.6 Conclusiones 226
4.7 Referencias 227

5 Mecanismos de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre en medios viscosos

5.1 Introducción

5.1.1 Dinámica proteica:
complejidad y rol en la reacción de TE 235

5.1.2 Modelo de TE bajo un régimen de control friccional
de Waldeck-Zusman 238

5.1.3 Modelo de TE bajo un régimen de control friccional
de Matyushov 244

5.2 Obtención de k_{TE}^{o} en función del acoplamiento electrónico
proteína-electrodo 251

5.3 Obtención de k_{TE}^{o} en función de la viscosidad 265

5.4 Obtención de $\Delta G_{TE}^{\#}$ en función del acoplamiento electrónico
proteína-electrodo 281

5.5 Validación del modelo de TE friccional de Matyushov.
Casos de estudio: Azurina y *Tt*-Cu_A 287

5.5.1 Dependencia con la distancia y tiempos de relajación efectivos 288

5.5.2 Contribución friccional a la energía de activación 293

5.5.3 Efecto de la viscosidad sobre la reacción de TE heterogénea 295

5.6 Conclusiones 303

5.7 Referencias 304

6 Conclusiones generales

6.1 Conclusiones y perspectivas 313

6.2 Referencias 322

7 Agradecimientos 327

Capítulo 1

Marco conceptual y fundamentos teóricos

1.1-Motivación y objetivos generales

Las reacciones de transferencia electrónica (TE) constituyen la reacción química más elemental, sin embargo, se encuentran en el corazón de los procesos que permiten el sostenimiento de la vida tal cual la entendemos. Dentro del amplio espectro de reacciones en las que el proceso de TE forma parte, aquellas que involucran metaloproteínas son clave para la generación de especies de alta energía que posibilitarán, mediante reacciones acopladas, la síntesis de todos los componentes celulares, y demás reacciones necesarias para el funcionamiento celular. Existen dos grandes mecanismos por los que se logra esto, la fotosíntesis y la respiración celular. Ambos son procesos que logran canalizar, ya sea la energía lumínica o la energía contenida en sustancias orgánicas reducidas, en enlaces de alta energía más comúnmente representados por la molécula de ATP. La forma que encontró la naturaleza para lograr esto requirió de una gran arquitectura supramolecular que involucra tanto estructuras proteicas como lipídicas muy complejas, así como cierto grado de compartimentalización. Puntualmente, empleó una serie de reacciones de TE consecutivas espontáneas entre distintos centros redox, típicamente complejos de metales de transición coordinados de maneras muy diversas, embebidos en estructuras proteicas, conocidas en su conjunto como *cadena transportadora de electrones*, en la que el flujo de electrones espontáneo se encuentra acoplado al bombeo de protones contra gradiente, que será luego disipado de forma acoplada con la síntesis de ATP. Cada sitio redox en esta cadena se encuentra finamente regulado por las características del entorno proteico que lo rodea mediante procesos que hoy en día la comunidad científica apenas comienza a elucidar y entender con cierta profundidad. Resulta imperativo entonces profundizar en los detalles regulatorios de estos procesos de TE proteica no solo para entender los sistemas naturales transductores de energía y otros enzimáticos donde la TE proteica es protagonista, sino poder a partir de su estudio lograr desarrollar y optimizar sistemas equivalentes artificiales con características similares o mejoradas y reemplazar así la obtención de energía a partir de sistemas no renovables.

El objetivo general de esta tesis es el de contribuir a elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de los parámetros que caracterizan la reacción de TE proteica, haciendo foco en aspectos estructurales y dinámicos. Puntualmente, nos interesará discriminar los efectos de la primera y segunda esfera de coordinación y de la matriz proteica de un conjunto variado de metaloproteínas de cobre. En particular se estudiarán dos sistemas modelo, que son los centros de cobre de Tipo 1 (T1) y centros binucleares de cobre denominados Cu_A. Se estudiarán dos sistemas silvestres, el sitio T1 de Azurina proveniente de

Pseudomonas aeruginosa, y un fragmento soluble del dominio de Cu_A de la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa de *Thermus thermophilus* (*Tt*-Cu_A). A su vez, para poder discriminar la contribución de cada nivel estructural, se complementó el estudio de los sistemas canónicos con un conjunto de variantes mutagénicas muy particulares. Se generaron sistemas proteicos quiméricos reemplazando total o parcialmente las secuencias aminoacídicas de segmentos proteicos que conforman el sitio metálico, así como de segmentos aledaños a este, por secuencias análogas de otras especies preservando el resto de la estructura proteica intacta, como se detallará más adelante a lo largo de este trabajo (ver Capítulos 3 y 4). Por otro lado, para poner en evidencia la relevancia de la dinámica proteica se estudiaron condiciones experimentales que logran emular aspectos clave de los complejos entornos intracelulares, como ser la alta viscosidad, la presencia de entornos anisotrópicos y condiciones de acoplamiento electrónico variable con distancias entre dador y aceptor de electrones entre 10 y 24 Å. Los objetivos específicos se pueden resumir de la siguiente manera:

- Comprender cuales son los parámetros estructurales que determinan las propiedades funcionales (cinéticas y termodinámicas) de las reacciones de TE en sitios de cobre T1.
- Profundizar el entendimiento sobre los mecanismos moleculares que determinan la alternancia entre estados electrónicos alternativos en el centro de Cu_A mediante la introducción de perturbaciones leves en su entorno. Y su impacto en los parámetros asociados a la reacción de TE.
- Contribuir a elucidar el origen de las observaciones experimentales que caracterizan la reacción de TE en sistemas proteicos bajo condiciones experimentales que emulan entornos intracelulares (régimen friccional) que no pueden ser racionalizados en términos de la ampliamente utilizada teoría de Marcus de TE.

Los resultados de este trabajo de tesis indican que el sistema de estudio resultó idóneo para responder los interrogantes planteados. Si bien se han empleado sistemas quiméricos en el pasado, la utilización de la matriz de *Tt*-Cu_A como andamiaje proteico principal para la construcción de las quimeras posibilito el surgimiento de nuevas propiedades en sus sitios metálicos. Además, permitió la modulación independiente de parámetros clave de la TE como lo son la fuerza impulsora (potencial de reducción) y la energía de activación del proceso (ver Capítulo 3). La razón principal de este hecho radica en el empleo de una matriz proteica que fue optimizada naturalmente para albergar y modular las propiedades estructurales y funcionales de un sitio de Cu_A, no de sitios T1. Esto no fue así en estudios previos, donde las proteínas elegidas para diseñar sistemas quiméricos presentaban matrices más íntimamente relacionadas. En esos casos ambas proteínas fueron moldeadas evolutivamente para albergar y modular las propiedades del mismo tipo de centro metálico, un sitio T1.

Esta misma estrategia fue explotada para perturbar de manera leve el sitio de Cu_A. Se generaron quimeras donde las secuencias reemplazadas provinieron de proteínas con centros de Cu_A de organismos eucariotas. Al no involucrar residuos de primera esfera de coordinación en el esquema mutagénico, la perturbación introducida fue menos drástica que en abordajes previos. Aun así, estos cambios tuvieron un impacto significativo en las propiedades funcionales del sistema (ver Capitulo 4)

Finalmente, el sistema quimérico nuevamente cobra relevancia en el estudio del mecanismo de TE bajo un régimen de control friccional (ver Capítulo 5) donde permite obtener nuevos detalles sobre el origen molecular que determina el valor de los parámetros principales empleados para caracterizar el proceso en las teorías vigentes.

En su conjunto los resultados que se presentan en capítulos venideros no solo permiten un entendimiento básico del funcionamiento de estos sistemas, pudiendo extrapolar, en cierta medida y con los recaudos necesarios, las conclusiones a sistemas artificiales relacionados, e incluso a sistemas biológicos, sino que además sugieren potenciales aplicaciones en los campos aplicados de biodispositivos y electrónica molecular. Igual de importante es el hecho de que permiten entender, modificar y ampliar los modelos vigentes de TE para el régimen de control friccional para dar cuenta de todos los observables que resultan inusuales. Señalando en este proceso diversos caminos concretos a seguir para continuar con su estudio de manera sistemática, lo cual no un aspecto menor a juzgar por los tiempos característicos inherentes al proceso científico.

En este primer capítulo se introducen los conceptos principales de los sistemas de estudio, del marco teórico base empleado y de las técnicas espectroscópicas y electroquímicas utilizadas. Por cuestiones de claridad, ciertos aspectos serán oportunamente retomados y ampliados en las respectivas introducciones de cada capítulo de resultados. En el capítulo 2 se detallan los protocolos de obtención de las muestras proteicas, la funcionalización de la superficie de los electrodos, detalles del equipamiento utilizado, el diseño de experimentos y los formalismos para algunos tratamientos de datos. El capítulo 3, tal como se adelantó líneas más arriba, trata sobre un conjunto de metaloproteínas con sitios mononucleares de cobre T1 que fueron introducidos mediante ingeniería de bucles en la matriz proteica de *Tt*-Cu_A, ocupando el lugar donde antes se encontraba el sitio de Cu_A nativo. Se caracterizaron empleando diversas técnicas espectroscópicas (UV-visible, Rr, DC, EPR) y electroquímicas (VC) sobre muestras proteicas en solución o películas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados. Los resultados se analizan bajo el formalismo de la teoría de TE de Marcus y se emplean estructuras generadas *in silico* para completar la visión atómico/molecular de los mecanismos subyacentes. Hacia el final se analizan sitios mononucleares de cobre de Tipo 2 (T2) generados, ya sea por unión de imidazol a las quimeras comentadas anteriormente, o mediante ingeniería de bucles. En ambos casos se hace énfasis en las propiedades electrónicas novedosas que se desprenden del análisis espectroscópico y electroquímico. En el capítulo 4 se tratan metaloproteínas conteniendo sitios binucleares de Cu_A, específicamente se presenta el sitio silvestre perteneciente a *Thermus thermophilus* (*Tt*-Cu_A), y tres nuevas variedades quiméricas en las que se reemplazaron uno o todos los bucles que conforman el sitio metálico por secuencias análogas provenientes de organismos eucariotas, *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana*. Se empleó espectroscopia UV-visible y Rr sumado a experimentos de electroquímica dependiente de la temperatura para estudiar el impacto de las perturbaciones en la accesibilidad al estado electrónico alternativo, que determina fuertemente el proceso de TE en estos sistemas. Los resultados se analizan en el marco de la hipótesis actual que sugiere que existe un acoplamiento de las coordenadas de interconversión entre ambos estados electrónicos fundamentales y las coordenadas de la reacción de TE. En el capítulo 5 se presenta un estudio conjunto de ambos sistemas, centros T1 y Cu_A, empleando técnicas electroquímicas

(VC y VCA) sobre películas proteicas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados. Se variaron sistemáticamente la temperatura, la viscosidad del medio empleando concentraciones crecientes de dos agentes viscosantes cualitativamente distintos, y el acoplamiento electrónico controlando la distancia entre el sitio metálico y la superficie metálica del electrodo, r_{DA}, eligiendo un alcanotiol con el largo de cadena adecuado para recubrir el electrodo (ver Capítulo 2). Para las condiciones antes mencionadas se determinaron distintos parámetros de la teoría vigente para el régimen de control friccional, entre ellos energías de activación aparentes ($\Delta G_{ap}^{\#}$), factores de decaimiento de k_{TE} con viscosidad (γ), y con r_{DA} (β), y se disectan las contribuciones individuales de distintos niveles estructurales. Además, se analiza la validez de una nueva teoría que fue publicada de manera contemporánea a esta tesis, se analizan los puntos de cruce con el modelo anterior, y se postula una extensión de esta para dar cuenta el efecto de la viscosidad que no se encuentra en su formulación original.

1.2-Metaloproteinas redox

Las reacciones de óxido-reducción (redox) juegan roles muy importantes en casi todos los procesos biológicos, de entre los que se destacan la fotosíntesis y la respiración celular, que representan dos procesos energéticos fundamentales que mantienen la vida en la Tierra. No es sorprendente que los seres vivos utilicen iones metálicos redox activos para llevar a cabo los pasos más elementales de tales procesos, ya que es justamente la actividad redox la que los vuelve especialmente indicados para actuar como cofactores de diversas macromoléculas y enzimas.[1]

Si bien son muchos los metales elegidos por la naturaleza para llevar a cabo diversas funciones y procesos, entre los más usados se encuentran particularmente el hierro, vanadio, manganeso, níquel, zinc, cobre, cobalto, molibdeno, tungsteno y mercurio.[2] Si bien son muchos los metales que presentan propiedades redox, sólo un número limitado de ellos fueron escogidos para participar de procesos de TE proteica siendo el hierro y el cobre los predominantes por una amplia diferencia. Típicamente estos metales se encuentran formando parte de centros redox en el seno de proteínas que conforman distintas familias donde las principales comprenden las llamadas citocromos, proteínas de hierro-azufre y cupredoxinas, que en su conjunto logran cubrir todo el rango de potenciales redox observado en sistemas biológicos, Figura-1.[1] En esta tesis nos centraremos en distintos centros de cobre presentes en cupredoxinas.

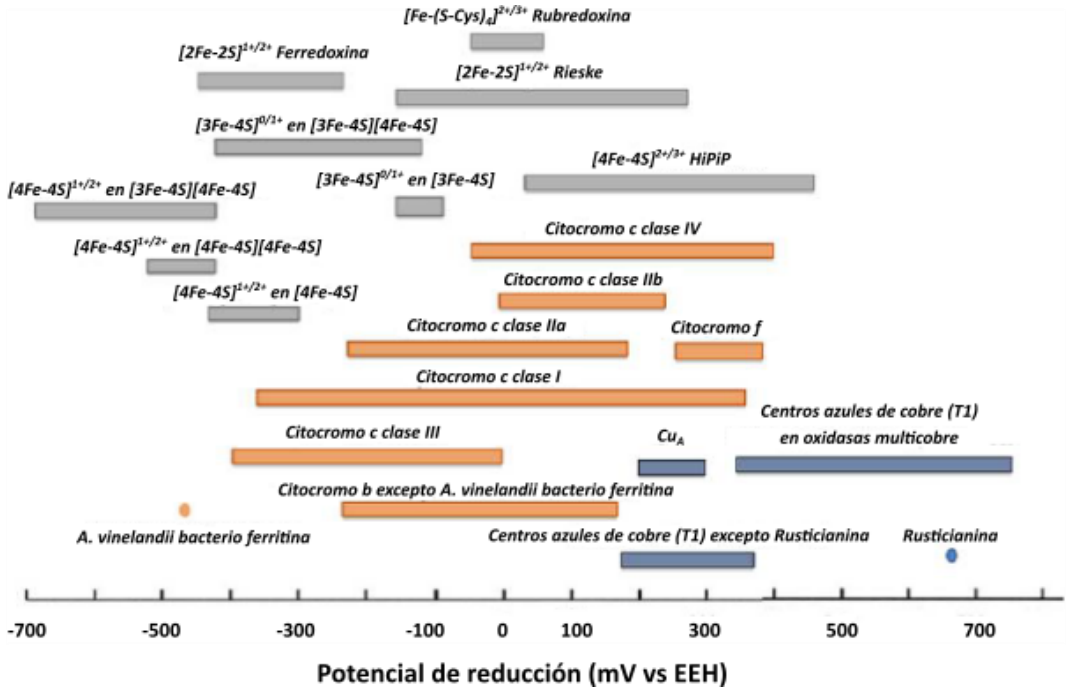


Figura 1: *(Figura adaptada de Liu et al 2014)*[1] *Rangos de potenciales de reducción (respecto a electrodo estándar de hidrógeno, EEH) para los principales centros metálicos redox biológicos de hierro y cobre.*

1.2.1-Centros de cobre en la naturaleza

Los centros metálicos pueden cumplir funciones estructurales[3], o participar de una variedad de procesos como reacciones de TE[1,4], catálisis[5–7]**,** transporte y almacenamiento de metales[8]**,** actividad metalochaperona[9]**,** entre otras. Las metaloproteínas con actividad redox suelen diferir en el número y tipo de metales que constituyen sus sitios activos, en los ligandos que conforman la primera y segunda esfera de coordinación y en las matrices proteicas que los albergan**.**[10–12]

Los sitios de cobre hallados en la naturaleza pueden clasificarse según la cantidad de átomos de cobre que presenten, y la identidad de los ligandos de primera esfera de coordinación, que son los que determinan, en primera instancia, sus propiedades electrónicas. Una clasificación posible es agruparlos en sitios mononucleares de tipo 1 (T1) y tipo 2 (T2),[5,13] sitios binucleares de cobre que pueden estar acoplados mediante una molécula puente como los de tipo 3 (T3), no acoplados como aquel presente en dopamina β-monooxigenasa,[14] o binucleares con valencia mixta como los sitios Cu_A,[15] y centros multinucleares como los centros de Cu_Z[6,16] y centros trinucleares[17,18], ver Figura-2. Los sitios T1 y Cu_A están involucrados en procesos de TE mientras que los otros típicamente se encuentran implicados en catálisis asociada a reacciones redox, u otro tipo de funciones como transporte de metales.

En los sitios T1 el átomo metálico se encuentra coordinado fuertemente por dos histidinas y una cisteína (desprotonada) y por un cuarto ligando más débil, típicamente una metionina aunque existen ejemplos naturales donde esta posición se encuentra ocupada por una glutamina,[19] en un arreglo tetraédrico distorsionado. La presencia de un quinto ligando débil, un carbonilo amídico en posición axial y opuesta a la metionina, lleva a una geometría bipiramidal trigonal como es el caso de Azurina.[20] En algunos casos el cuarto y quinto ligando se encuentran ausentes dejando posiciones vacantes, como es el caso de los sitios T1 de ciertas Lacasas fúngicas.[17] Dentro de este clase de sitios existe una subclasificación según sus características geométricas y espectrales, y por ende de su color al ojo desnudo. En los llamados sitios T1 canónicos o axiales la interacción S_{Cis}-Cu^{+2} da lugar a una intensa banda de transferencia de carga ligando-metal (TCLM) centrada en 600 nm ($\varepsilon \approx 3000 - 6000\ M^{-1}cm^{-1}$) que da cuenta de su característico, y en su momento enigmático, color azul. Por otro lado, los sitios T1 conocidos como sitios distorsionados o rómbicos, presentan una interacción S_{Cis}-Cu^{+2} tal que ahora la banda TCLM centrada a 600 nm presenta una menor intensidad, y una nueva banda TCLM centrada en 450 nm gana intensidad ($\varepsilon \approx 1500 - 3000\ M^{-1}cm^{-1}$), lo que les confiere una tonalidad azul-verdosa.[21,22]

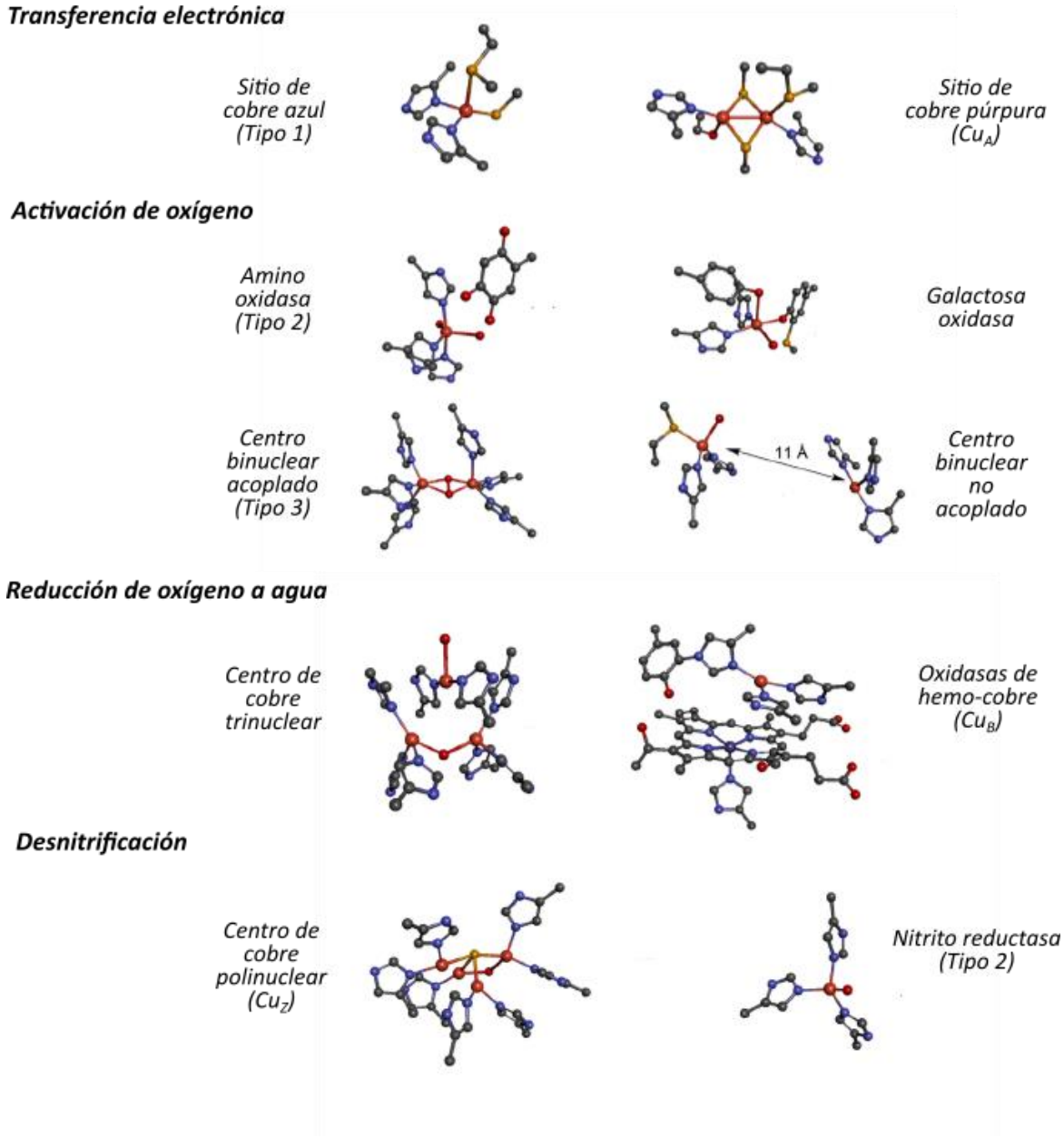


Figura 2: *(Figura adaptada de Solomon et al 2014)*[14] *Principales centros de cobre en la naturaleza organizados según sus funciones biológicas. Se distinguen con colores los átomos de carbono (gris), oxigeno (rojo), cobre (bordo), azufre (naranja) y nitrógeno (azul). Para el caso del centro de Cu_B se presenta además un grupo hemo al que siempre se encuentra asociado, con un átomo de hierro (color violeta).*

Los sitios T2 se encuentran íntimamente relacionados con los sitios T1, sin embargo, son usualmente pentacoordinados y presentan patrones de coordinación más variables que los sitios T1. En algunos casos todos los ligandos son histidinas, sin embargo, también existen casos en los que uno o dos de los ligandos son cisteinatos[23,23,24] o aspartatos[25,26]. Dado que su actividad principal se encuentra asociada a la catálisis, esos sitios suelen estar expuestos al solvente y presentar moléculas de agua completando su coordinación. En cierto sentido, los sitios T2 pueden ser considerados como sitios T1 conteniendo un ligando extra que lleva a una geometría piramidal de base cuadrada.[27] En particular, aquellos sitios T2 que contienen un

enlace S_{Cis}-Cu^{+2} presentan una fuerte banda de TCLM centrada en 390 nm muy característica, y dependiendo de la fuerza del resto del conjunto de ligandos presentan tonalidades que van del amarillo al rojo intenso, por ejemplo en Nitrosocianina[28,29] y la metalochaperona Sco[24]. Aquellos sitios que carecen de estos ligandos no absorben en el espectro visible, como es el caso de los sitios T2 presentes en al superóxido dismutasa[30,31] o nitrito reductasa[32,33].

Si bien la gran parte de los sitios monoatómicos descubiertos pueden encasillarse en alguna de las categorías antes mencionadas, aún se siguen descubriendo sitios con características novedosas, entre ellos podemos mencionar el caso del sitio de cobre con coordinación abierta presente en *Nitrosopumilus maritimus*, que fue catalogado como un sitio T1, y representa el primer caso de un sitio T1 donde la típica metionina axial se encuentra ausente y una molécula de agua exógena completa la coordinación, ver Figura-3A.[34] Lo que revela lo mucho que aún hay por aprender desde la química de coordinación biológica.

Además, existen sitios monoatómicos que no son catalogados en ninguno de los grupos anteriores por presentar características únicas, por ejemplo, el sitio de cobre hallado en la enzima galactosa oxidasa. Este sitio presenta en su coordinación dos átomos de nitrógeno provenientes de histidinas y dos fenolatos provenientes de residuos tirosina, ver Figuras 1 y 3-B. Fue propuesto que, durante su ciclo catalítico, en el que se lleva a cabo la oxidación de un alcohol primario, este sitio puede pasar por un intermediario pentacoordinado. Más aún, para poder llevar a cabo esta oxidación de dos electrones, empleando un único átomo de cobre, en el sitio activo existe un centro radical cisteinato-tirosina entre la cisteína 228 y la tirosina 727, ver Figura 3-B, que se encuentra directamente coordinado al átomo de cobre y permite llevar a cabo tal reacción.[14,35,36]

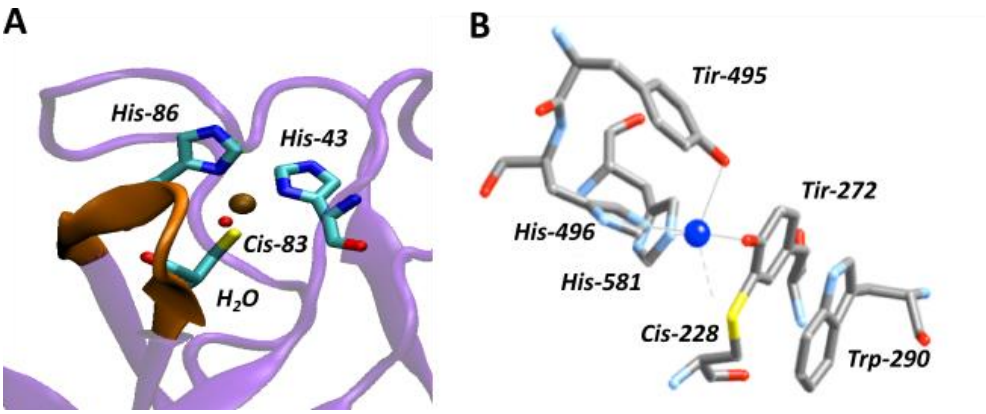


Figura 3: *(Figura adaptada de Szuster et al 2022 y Solomon et al 2014)*[14,37] ***A.*** *Detalle del sitio T1 con coordinación abierta presenten en Nitrosopumilus maritimus (pdb 5FC9). La matriz proteica se encuentra esquematizada según su estructura secundaria, en naranja la secuencia del bucle de ligandos, y en violeta el resto de la proteína. Los ligandos de primera esfera, residuos y molécula de agua exógena (esfera roja), así como el átomo de cobre, presentan un código de colores estándar.* ***B.*** *Detalle del sitio monoatómico de cobre presente en la galactosa oxidasa, indicando los residuos de primera y segunda esfera de coordinación. El cobre se presenta coloreado de azul.*

El último sitio monoatómico de cobre, el sitio de Cu_B, si bien posee un único átomo de cobre, se presenta siempre asociado a un grupo hemo, por lo que podría ser considerado un sitio metálico mixto. En este tipo de centros el átomo de cobre se encuentra coordinado por tres residuos histidina, y suele encontrarse como aceptor de electrones terminal en la citocromo *c* oxidasa (CcO), llevando a cabo la reducción de una molécula de oxígeno en agua. Estructuras cristalinas indican que en la CcO reducida no hay densidad electrónica entre el cobre y el hierro hémico, sin embargo, esto no es así en el estado oxidado en reposo, donde por el contrario se observa un continuo de densidad electrónica entre ambos metales. Esta densidad electrónica es interpretada como un anión peróxido (O_2^{-2}) que actúa como puente entre el Cu_B y el hemo, ver Figura 4.[38,39]

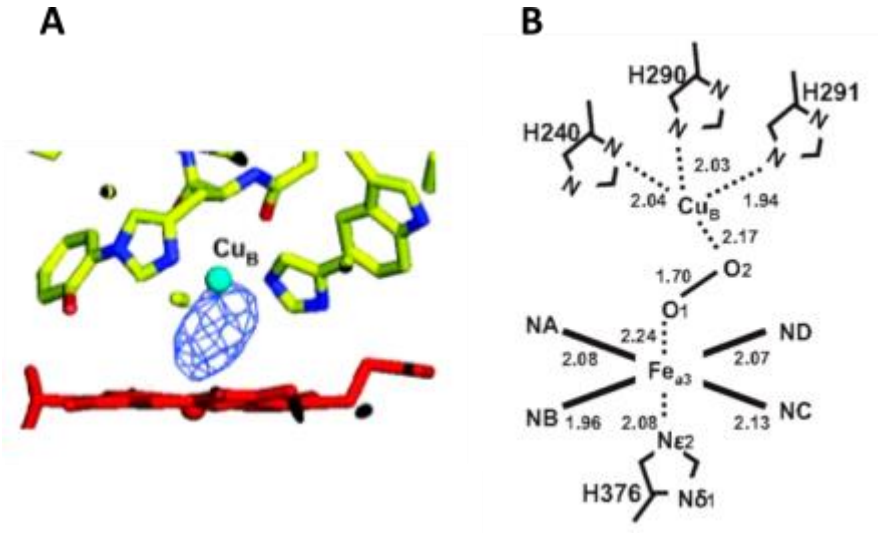


Figura 4: *(Figura adaptada de Aoyama et al 2009)*[38] ***A.*** *Detalle de la estructura del centro metálico en la CcO en reposo, mostrando la densidad electrónica del puente entre los átomos de Fe y Cu, a 2,5 Å de resolución, en simultáneo se presenta el modelo estructural para el centro de Cu_B y el hemo a_3.* ***B.*** *Geometrías de coordinación del anión peróxido obtenidas del refinamiento estructural a 2,1 Å de resolución. Se indican todas las distancias interatómicas en Å.*

Dentro del grupo de los centros biatómicos de cobre tenemos tres representantes, centros binucleares acoplados (o sitios T3), sitios no acoplados y sitios de Cu_A. Los sitios T3 se encuentran típicamente en las hemocianinas, proteínas presentes de manera libre, es decir, no se encuentran dentro de células transportadoras, en la hemolinfa de moluscos y artrópodos. La principal función de estas proteínas es la de transportar oxígeno desde las estructuras respiratorias en estos organismos a los distintos tejidos, tal como lo hace la hemoglobina en vertebrados. Las hemocianinas de artrópodos suelen encontrarse como hexámeros simples o múltiples mientras que aquellas de moluscos se encuentra como decámeros simples o múltiples, ver Figura 5.[40] La estructura polimérica es esencial para una regulación de tipo alostérica de la afinidad por la molécula de oxígeno. En el dominio conteniendo el sitio activo, cada uno de los átomos de cobre se encuentra coordinado por un conjunto de tres residuos histidina, y en su forma oxigenada se encuentran puenteados por una molécula de oxígeno de

manera lateral. En el estado desoxigenado ambos cobres se encuentran reducidos, Cu(I), de modo que el centro es incoloro. Al unir una molécula de oxígeno los átomos de cobres cambian su estado de oxidación de Cu(I) a Cu(II), cediendo un electrón cada uno a la molécula de oxigeno transformándola en anión peróxido, de esta manera el centro pasa a absorber en el visible lo que dota a esta proteína de su característico color azulado. Por otra parte, una característica única de estos centros es que el estado Cu(II) no presenta señal de EPR, lo que indica que al estar puenteados por el anión peróxido ambos centros de cobre se encuentran acoplados, diferenciándose de otros centros binucleares.[41] Este tipo de centro metálico también se da en polifenol oxidasas y fenol oxigenasas, donde se explota su capacidad para activar el oxígeno molecular para catalizar la producción de quinonas en diversos organismos vía oxidación de dos electrones de o-fenoles.[14,42]

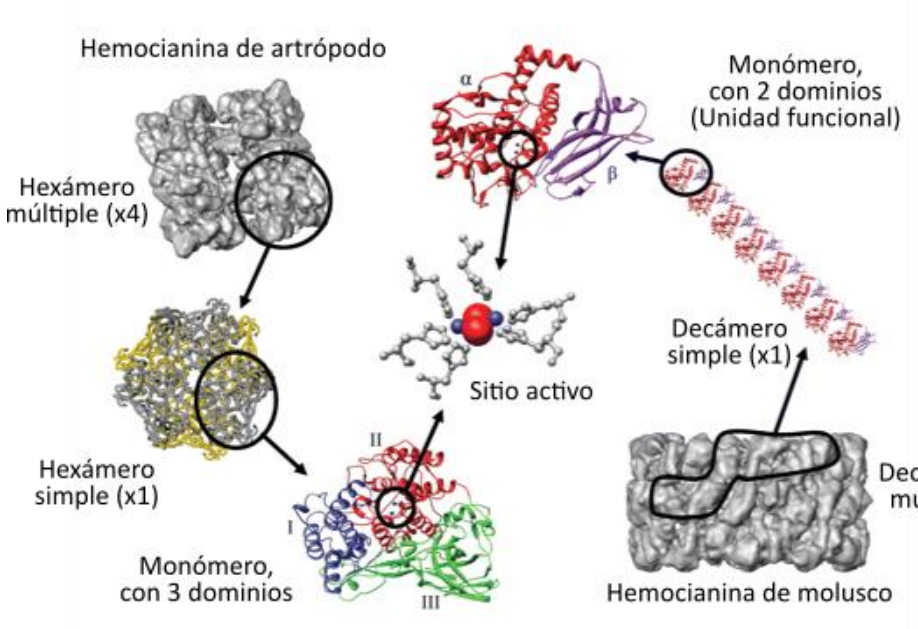


Figura 5: *(Figura adaptada de Decker et al 2007)*[40] *Esquema de la organización jerárquica de hemocianinas conteniendo sitios de cobre T3 en artrópodos y moluscos.*

Existe otra categoría de sitios binucleares, que se denominan “no acoplados” ya que se encuentran a una distancia de alrededor de 11 Å sin ligandos que puedan actuar como puente entre los átomos de cobre de modo que no existe acoplamiento electrónico entre ellos. Las proteínas que contienen este tipo de centro de cobre se encuentran involucradas en la activación del enlace C-H para su posterior hidroxilación, reacción particularmente importante en la síntesis biológica de hormonas y neurotransmisores.[43] Esta clase agrupa, hasta el momento, tres enzimas: dopamina β-monooxigenasa (DβM), peptidilglicina monooxigenasa α-hidrolizante (PHM) y tiramina β-monooxigenasa (TβM).[44,45] La reacción de hidroxilación es una oxidación de 2 electrones que se encuentra acoplada a la reducción de una molécula de oxígeno para dar una molécula de agua y la incorporación del segundo átomo de oxígeno en el sustrato. Dos electrones provienen del sustrato mismo, mientras que los dos restando de una

molécula de ascorbato.[46,47] Estudios estructurales y espectroscópicos indican que los átomos de cobre presentan una coordinación muy diferente, ver Figura-6[48,49]. Uno de ellos se encuentra coordinado por dos histidinas, una metionina y una molécula de agua exógena, y es llamado Cu_M. El otro átomo de cobre se encuentra coordinado por tres histidinas y se denomina Cu_H. Si bien el sitio de Cu_M se asemeja a un sitio T1, y el sitio de Cu_H a un sitio T2, al encontrarse siempre asociados y actuar de manera conjunta, resulta más adecuado clasificarlos como un sitio binuclear. Por otra parte, su coordinación no es del todo compatible con la clasificación de sitios T1 y T2, ya que, en sus respectivos estados oxidados, ambos sitios Cu_H y Cu_M incorporan una molécula de agua exógena en su coordinación, alejándolos aún más de la clasificación monoatómica canónica.[49] El sitio de Cu_M es donde se activa la molécula de oxígeno y se une el sustrato, mientras que el sitio de Cu_H actúa como dador de electrones.[50]

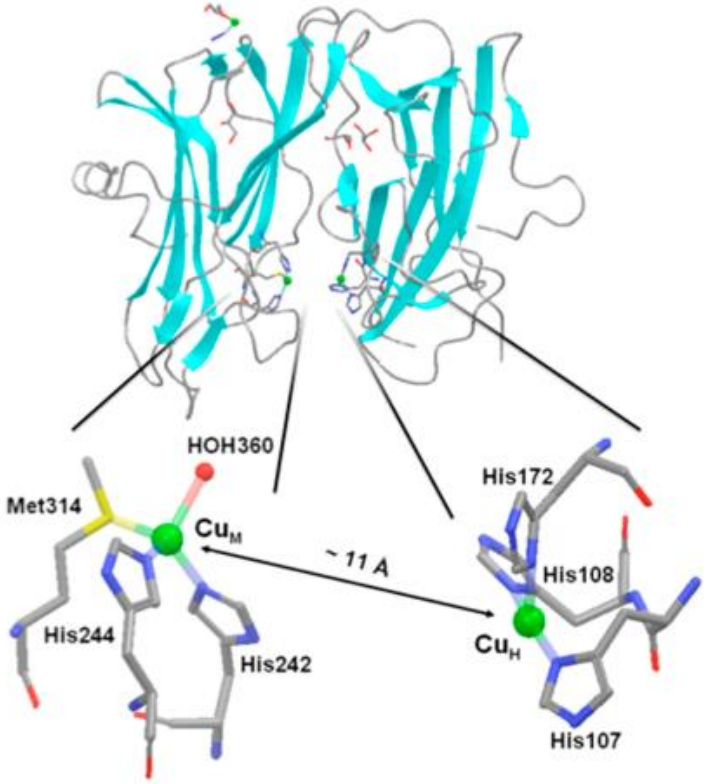


Figura 6: *(Figura adaptada de Solomon et al 2014)* [14] *Panel superior, Estructura secundaria de la proteína PHM (pdb 1PHM) donde las hebras β se colorean de celeste, las zonas sin un elemento de estructura secundaria particular en gris, los átomos de cobre presentan como esferas verdes acompañados de ligandos de primera esfera coloreados según el tipo de elemento (rojo: oxígeno, verde: nitrógeno, amarillo: azufre y gris: carbono). Panel inferior, detalle de ambos centros metálicos en su estado reducido, denominados Cu_M y Cu_H.*

El último grupo dentro de los centros de cobre bimetálicos es el centro de Cu_A. Este sitio será tratado en mayor detalle en el Capítulo 4. Este centro metálico es el primer ejemplo de un complejo que involucre dos átomos de cobre enlazados directamente entre sí, [51,52] lo que permite que se acoplen electrónicamente presentando una valencia mixta de tipo III, es decir, que se comporten como si fuesen un único metal.[53–55] La coordinación se encuentra

invariablemente comprendida por dos cisteinatos, que forman junto con los dos átomos de cobre una estructura en diamante Cu_2S_2 muy rígida, y ecuatorialmente son coordinados por dos ligandos fuertes extra, dos histidinas, una enlazando a cada átomo de cobre. Existen también dos ligandos débiles que completan la coordinación, tal como ocurre típicamente en los sitios T1, una metionina y un carbonilo amídico, ambos en posición axial en los respectivos átomos de cobre, ver Figura 7.[56–58] Como trataremos en gran detalle más adelante, este peculiar centro metálico se encuentra, al igual que los sitios T1, invariablemente involucrado en TE. Se encuentra presente en la citocromo *c* oxidasa y en la óxido nitroso reductasa (N_2O reductasas o simplemente N_2OR), aunque recientemente se detectó un sitio de Cu_A atípico formando parte de una estructura dimérica en un grupo de bacterias que emplean metano y amonio como fuentes de energía.[57]

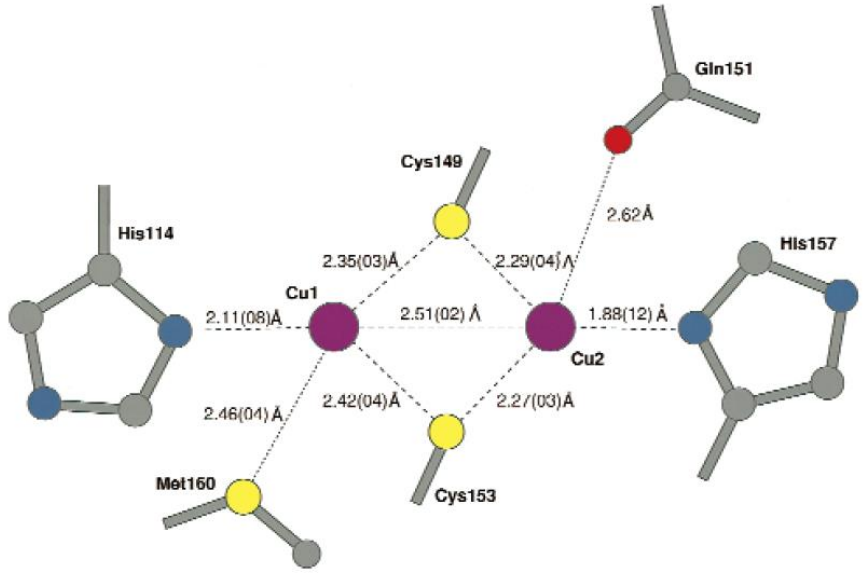


Figura 7: *(Figura adaptada de Williams et al 1999)* [59] *Sitio de Cu_A de Thermus thermophilus indicando cadenas laterales de residuos coordinantes y distancias de enlace cristalográficas.*

Finalmente, dentro del grupo de los centros multinucleares de cobre tenemos dos representantes: los trinucleares presentes en las lacasas,[18] y los centros tetranucleares llamadas de Cu_Z presentes en las N_2OR.[6]

Las lacasas pertenecen a la familia de las oxidasas multi-cobre (OMC) que está constituida por una gran diversidad de enzimas donde la oxidación de diferentes sustratos, típicamente fenoles, se encuentra acoplada a la reducción de oxigeno molecular originando dos moléculas de agua. Su unidad funcional se encuentra constituida por cuatro átomos de cobre, los que se encuentran en dos centros diferentes, un sitio T1, que actúa como punto de entrada de los electrones desde el sustrato, y un centro trinuclear de cobre (CTN), donde tiene lugar la reducción del oxígeno.[10] La gran diversidad de OMCs se encuentra dada por las características del sitio T1, donde diferencias en el ambiente de coordinación y/o accesibilidad determina fuertemente la especificidad de sustratos.[60–64] El centro trinuclear de cobre

puede ser a su vez subclasificado como un caso particular en el que se da una asociación funcional entre un sitio T2 y uno binuclear T3, ver Figura 8-A.

Los sitios de Cu_Z representan un caso más complejo de organización multi-cobre, donde la coordinación se encuentra constituida por cuatro átomos de cobre coordinados en un arreglo tetraédrico alrededor de un sulfuro central, donde un total de siete histidinas y tres ligandos exógenos, presuntamente moléculas de agua, completan la coordinación de los átomos de cobre, ver Figura 8-B,[6,16,65,66] aunque existe evidencia de que un segundo grupo sulfuro podría estar presente en el sitio.[67] Este sitio sería el encargado de llevar a cabo la reducción del N_2O a N_2,[68] mientras que el sitio de Cu_A media la TE entre el dador de electrones, que puede ser un citocromo *c* o una molécula de pseudoazurina[69–72], y el sitio de Cu_Z catalítico.

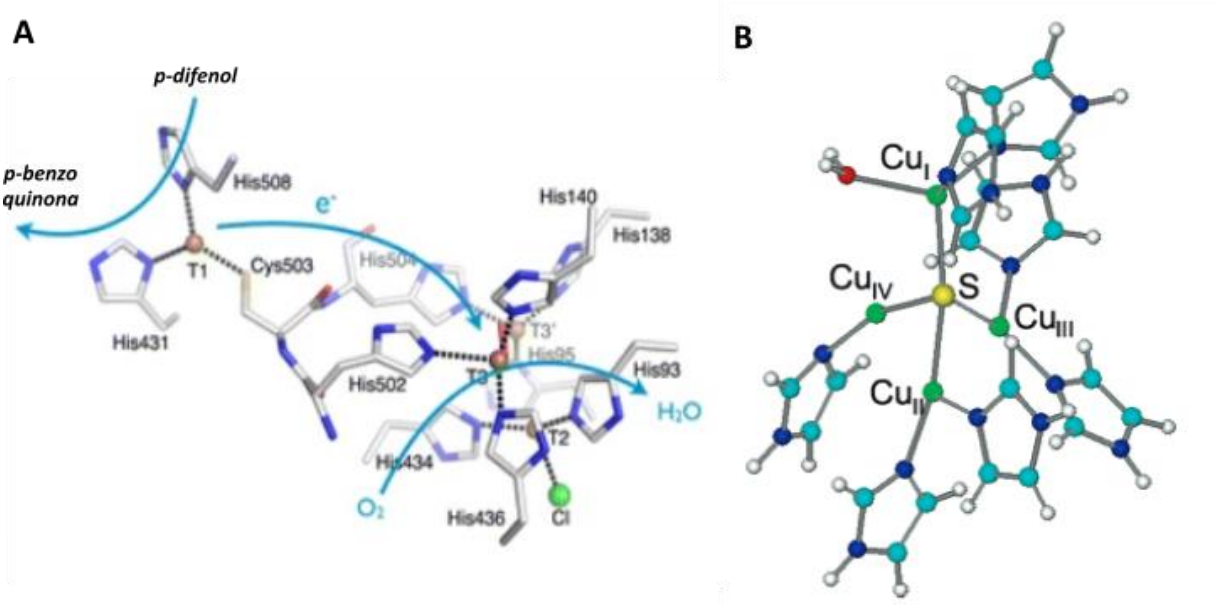


Figura 7: *(Figura adaptada Hakulinen et al 2015 y Gorelski et al 2006)*[68,73] ***A.*** *Detalle de los tres tipos de sitios de Cu que se encuentran en la lacasa de Melanocarpus albomycens. Se indica el sitio T1, donde ocurre la oxidación del sustrato, y el conjunto formado por el sitio T2 y T3 donde ocurre la reducción. Los átomos de cobre se indican en tojo, el resto de la estructura se encuentra coloreada siguiendo el código estándar según el tipo de átomo.* ***B.*** *Detalle del sitio de Cu_Z presente en la N_2OR, indicando los cuatro átomos de cobre (esferas verdes) las siete histidinas coordinantes, el sulfuro central y una de las moléculas de agua exógenas.*

1.2.2-Metaloproteinas artificiales

A través de las metaloproteínas la naturaleza encontró la forma de llevar a cabo un sin fin de reacciones y procesos sumamente complejos, muchos de los cuales presentan aún desafíos tanto básicos como tecnológicos. La gran ventaja que poseen las proteínas frente a otras macromoléculas es que presentan una mayor variedad química en sus monómeros constituyentes, lo que las dotaba de mayor versatilidad frente a sus primas mayores las moléculas de ARN, ya sea en funciones estructurales o enzimáticas (las famosas *ribozimas*). Esta supremacía es la razón por la que hoy en día prácticamente todas las reacciones enzimáticas celulares son llevadas a cabo por proteínas.[74–76]

Dada su naturaleza polimérica y la amplia variedad de características fisicoquímicas que aportan los aminoácidos que las conformaban, gran parte de su estudio se basó, y continúa en gran medida actualmente, en mutaciones de residuos individuales. Por supuesto que esta no es la única estrategia explotada, y conforme se pretende profundizar en diferentes aspectos, y las preguntas se complejizan, también lo hacen las estrategias adoptadas, y el mundo de las metaloproteínas de cobre no es una excepción como detallaremos en esta sección.

1.2.2.1-Mutaciones puntuales

Las mutaciones puntuales fueron, y probablemente lo sigan siendo por mucho tiempo más, una de las estrategias más convenientes a la hora de interrogar sistemas proteicos. En el contexto de los sitios de cobre relevantes para esta tesis, la mutación del ligando axial débil en sitios T1 y Cu_A es un ejemplo interesante. En sus inicios los centros de Cu_A nativos no constituían sistemas estables adecuados para su estudio sistemático. La aparición de una variante mutagénica en la que se logró reconstruir el sitio de Cu_A, pero en una matriz foránea, la de la proteína azul Azurina, la variante Cu_A-Azurina, permitió contar con un primer modelo robusto de Cu_A, como se comentará en la sección siguiente.[77] Tiempo después se logró expresar un dominio soluble que contenía un sitio de Cu_A nativo.[58] En la Figura 8 se presentan los potenciales de reducción (E°) de diferentes mutantes puntuales del ligando axial débil para ambos sistemas de Cu_A[78] y para el sitio T1 de Azurina,[79] que es sin lugar a dudas la cupredoxina mejor caracterizada electroquímicamente. Esta serie de experimentos permitieron determinar la influencia de modificar la densidad electrónica proveniente de este residuo sobre la estabilidad relativa de ambos estados de reducción, lo que determina el E°. Brevemente, se observó que el efecto de esta mutación fue mucho menos marcado en el centro de Cu_A inmerso en la matriz de azurina cuando se compara con centros T1 en la misma matriz proteica. Sin embargo, el efecto sobre el sitio de Cu_A, en su matriz nativa recupera cierta sensibilidad frente a cambios en las características del ligando en esta posición. Esto pone en evidencia la importancia y la versatilidad que pueden ganar los centros metálicos, y sus ligandos de primera esfera, dependiendo del entorno proteico.

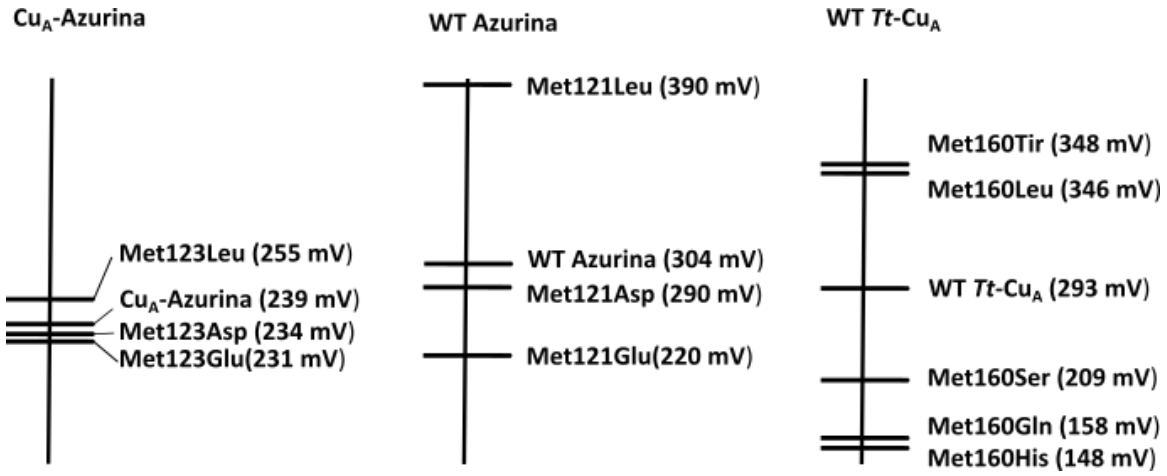


Figura 8: *Aquí se presentan los potenciales de reducción de diferentes mutantes puntuales de la metionina axial en tres proteínas, donde dos de ellas contienen un sitio de Cu_A, pero difieren en su matiz proteica (Tt-Cu_A y Cu_A-Az), y una tercera proteína que contiene un sitio T1 (Azurina).*

Recordemos que un sitio de Cu_A se puede considerar como la fusión de dos sitios T1 donde ahora ambas cisteínas son compartidas por ambos cobres, y típicamente se encuentran en matrices proteicas similares, denominadas cupredoxinas.[13] En este tipo de plegados proteicos se observó que residuos de segunda esfera de coordinación determinan en cierto grado la geometría del centro metálico a través de interacciones estéricas o de tipo Van der Waals. Un caso paradigmático lo representan los enlaces de hidrógenos sobre el sulfuro y amida de la cisteína 112, ver Figura 9-A, y sobre los nitrógenos de los grupos imidazol de las histidinas coordinantes, Figura 9-B. La influencia de estos contactos es no menor e impactan con igual magnitud en el valor del E° que mutaciones de primera esfera con incrementos de más de 100 mV respecto de la proteína silvestre.[80–82] Para el caso de la quimera Cu_A-Azu y Azurina, que comparten tales interacciones los estudios mutagénicos no se hicieron esperar. En la Figura 10 se presentan los sitios metálicos y los valores de E° obtenidos por voltametría cíclica de dos tipos de mutaciones: Asn47Ser y Phe114Pro. La primera elimina enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral de la Asn47 y el grupo amida de la Cis112, mientras que mutar la Phe114 elimina el enlace hidrogeno al sulfuro de la Cis112.[83] Mientras la primera mutación lleva a un incremento del E°, la segunda lo disminuye, y tal como ocurrió con la metionina axial comentada líneas más arriba, el efecto fue mucho menos marcado para el sitio de Cu_A. Sorprendentemente, los efectos de segunda esfera ($\sim 25\ mV$) fueron tan significativos como los de primera esfera ($\sim 50\ mV$) para Cu_A-Azu.

Este sistema resulta ideal para comparar el efecto de la misma mutación sobre dos centros metálicos distintos, dado que el entorno proteico es el mismo. La estrategia equivalente en un sitio de Cu_A en su matriz nativa no daría *a priori* la misma información ya que varios de estos contactos de segunda esfera no se encuentran presentes. En particular, el residuo equivalente a la Asn47, se encuentra ausente presentando una glicina en su lugar, sin cadena lateral que aporte tales enlaces hidrógeno.[59,84] En la Rusticianina (proteína con sitio

T1 de mayor E° reportada) este residuo se encuentra mutado a serina de forma consistente con los resultados de estos experimentos.

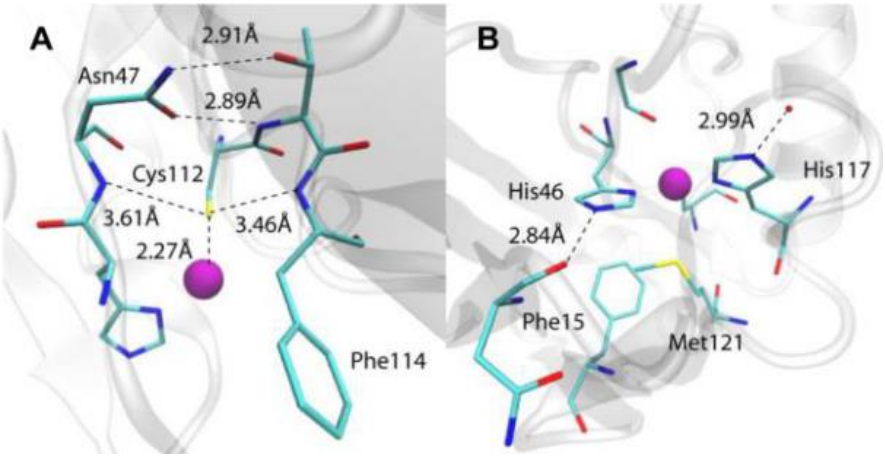


Figura 9: *(Figura adaptada Liu et al 2014)*[1] *Se representa la red de enlaces hidrogeno entre residuos de primera y segunda esfera de coordinación.* ***A.*** *Se presentan, entre otros, los enlaces de hidrógeno al sulfuro de la cisteína, y en* ***B****. aquellos a las histidinas coordinantes.*

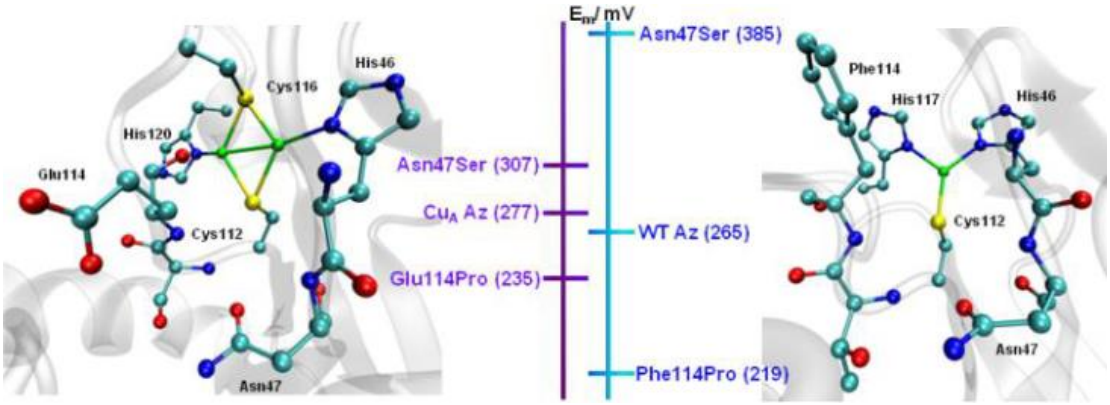


Figura 10: *(Figura adaptada Liu et al 2014)*[1] *Izquierda, detalle de un sitio de Cu_A reconstruido en la matriz proteica de Azurina mediante ingeniería de bucles (variante llamada Cu_A-Azu), derecha, sitio T1 de azurina, ambos siguiendo código de colores estándar, con los átomos de cobre en color verde claro. En medio se detallan los potenciales de reducción, en mV respecto a electrodo estándar de hidrógeno (EEH), de distintas mutantes puntuales de residuos de segunda esfera de coordinación*.

En vista de esos resultados el paso siguiente fue indagar sobre la aditividad de tales perturbaciones, que *a priori* actuarían de manera independiente redistribuyendo la densidad electrónica del campo de ligandos sobre el metal central. Estudios de este tipo sobre Azurina revelaron que efectivamente es posible obtener valores de E° en el rango 100-700 mV mutando únicamente esas tres posiciones.[80] Si a esto se suma la capacidad de emplear otros metales además del cobre el rango de E° se puede ampliar de -1 V a 1 V contra EEH.[81]

Si bien se realizaron un conjunto variado de mutaciones puntuales que expanden los resultados anteriores[85–96] rápidamente el repertorio de aminoácidos naturales resultó insuficiente para dar respuesta a todos los interrogantes y comenzaron a desarrollarse métodos que permitan expandir la química de las proteínas,[97] y es así que se logran introducir residuos no naturales en las vecindades de los metales.[98–101] Esta nueva estrategia permitió seleccionar aminoácidos cuyas características fisicoquímicas varían menos drásticamente entre sí que residuos naturales, permitiendo evaluar efectos tales como hidrofobicidad, factores estéricos, electrostáticos y de coordinación de manera gradual. Esta estrategia se usó exitosamente para introducir cambios graduales en residuos aromáticos en las vecindades de rubredoxinas, metaloproteínas con centros de hierro-azufre mononucleares, Figura 11-A.[102] También se empleó para cambiar la hidrofobicidad del ligando axial en centros de cobre de T1 observando una fuerte modulación del E°, Figura 11-B.[103,104] Esta estrategia ha sido empleada con éxito incluso para reemplazar el grupo carbonílico amídico que en sitios de Cu_A y T1 (como el de Azurina) coordina al cobre por uno proveniente de un grupo éster.[105] También permitió transformar sitios T1 azules en sitios T2 rojos mediante la incorporación de residuos no naturales en la posición axial en Azurina.[106]

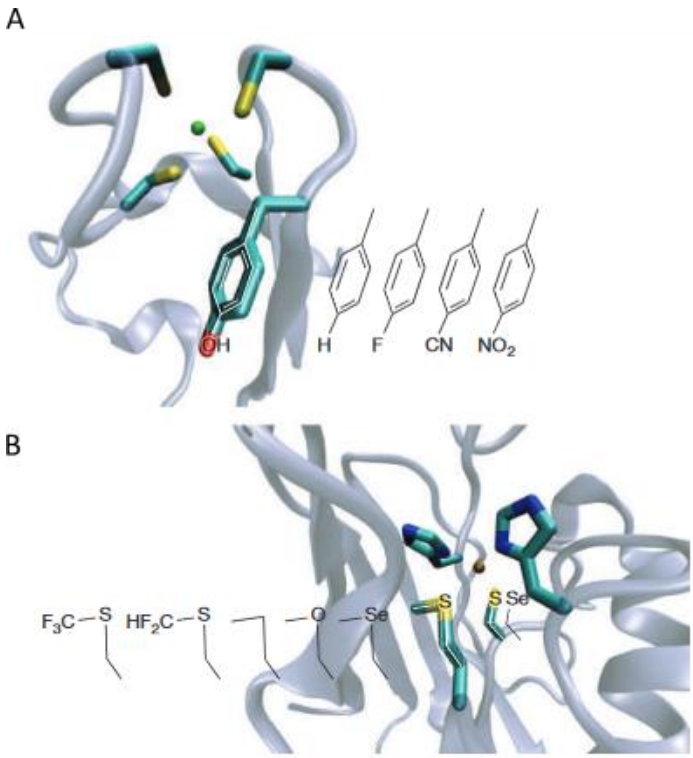


Figura 11: *(Figura adaptada Lu et al 2009)*[97] ***A.*** *Detalle del sitio metálico de una Rubredoxina (pdb 1CAA) presentando el átomo de hierro como una esfera verde y las cuatro cisteínas ligantes. Se indica la tirosina mutada por residuos no naturales.* ***B.*** *Se presenta el sitio T1 de Azurina (4AZU) donde se indica el átomo de cobre como una esfera marrón, los ligandos principales y la metionina axial intercambiada por residuos no naturales.*

1.2.2.2-Generación de proteínas quimeras

Las cupredoxinas, grupo de metaloproteínas llamadas así en analogía a las ferredoxinas, constituyen una amplia familia de proteínas que contienen sitios de cobre, generalmente sitios T1 y Cu_A,[13] aunque se han encontrado otro tipo de centros como los T2[28] o centros mixtos como aquel de la superóxido dismutasa, que contiene un sitio T2 canónico donde una histidina puentea el átomo de cobre con un átomo de zinc[107]. También se encuentra este tipo de plegado proteico en proteínas sin cofactores metálicos como en la subunidad II de ciertas citocromo *c* oxidasas[108], como trataremos en el Capítulo 4, y algunas inmunoglobulinas[109]. Una de sus características más notables es que a pesar de su baja identidad de secuencia, < 20%, su estructura tridimensional es altamente conservada,[110] y consta en una serie de hebras-β antiparalelas, en su mayoría, organizadas en una estructura conocida como sandwich-β. El sitio metálico se encuentra constituido por residuos que se ubican en un bucle que conecta dos hebras- β consecutivas en secuencia, Figura-12. Dada esta ubicación en la topología de las cupredoxinas un nuevo tipo de estrategia mutagénica fue implementada para interrogar este grupo de proteínas, el reemplazo de la secuencia del bucle que lleva los ligandos que constituyen el sitio metálico.[111] En todos los casos conocidos uno de los ligandos que completa la esfera de coordinación proviene del interior de la estructura, y no se encuentra contenido en el bucle (en el caso de sitios de Cu_A dos de los tres bucles que conforman el sitio contienen residuos coordinantes), es decir, se encuentra lejano en secuencia respecto de la secuencia del bucle.

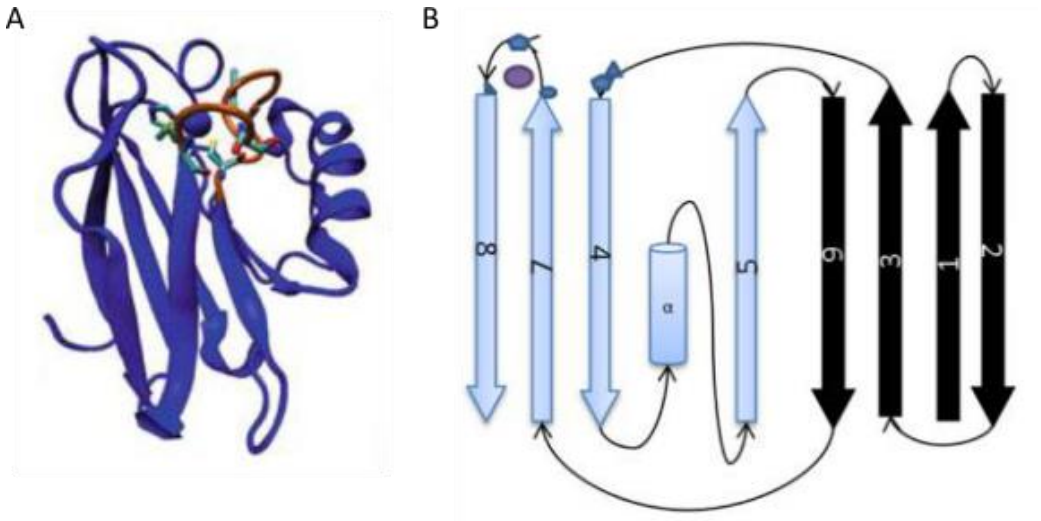


Figura 12: *(Figura adaptada Liu et al 2014)*[1] ***A.*** *Estructura tridimensional de Azurina representada mediante los elementos de estructura secundaria (hebras-β, hélice-α y bucles). En naranja se identifica el bucle que contiene tres de los cuatro ligandos que constituyen el sitio T1* ***B.*** *Esquema de la topología de un dominio cupredoxina típico presentando las hebras-β y los bucles que las conectan. Esta topología corresponde a la molécula de Azurina que posee en su estructura un tramo de su secuencia que se organiza en una hélice-α. El átomo de cobre se presenta como una esfera violeta y los residuos coordinantes esferas azules.*

Este tipo de estrategia fue explotada para generar una cupredoxina estable con un sitio de Cu_A que permitiera estudiarlo sistemáticamente tanto espectroscópica como electroquímicamente. Dado que una de las cupredoxinas mejor estudiadas desde un punto de vista electroquímico es Azurina y contiene naturalmente un sitio de cobre T1, reemplazar el bucle por aquel correspondiente a un sitio de Cu_A, proveniente de la CcO de *Paracoccus denitrificans*, originó una proteína que en su forma metalada exhibía un color púrpura intenso, como lo hacen los sitios Cu_A naturales, y se llamó Cu_A-Azu, Figura-13.[112,113] A partir de este modelo se pudo determinar cuáles son los elementos estructurales mínimos que resultan suficientes para formar un centro de Cu_A funcional. Además, permitió el estudio de la cinética de incorporación de cobre al sitio[114,115] y de selectividad por el ión metálico[116], los roles de sus diferentes ligandos (cisteína, metionina e histidinas)[79,117–120], aspectos relacionados al proceso de TE[121,122], dependencia con el pH[123], entre otros. Si bien este fue el primer modelo estable, previamente se había logrado diseñar dos modelos biosintéticos del sitio de Cu_A, uno de ellos fue mediante esta misma estrategia, pero empleando como proteína hospedadora del bucle de Cu_A la metaloproteína Amicianina, que naturalmente contiene un sitio de cobre T1, dando lugar a la quimera Cu_A-Ami.[124,125] Y previo a ella, dado la similitud del plegamiento cupredoxina de la subunidad II de la CcO con aquella de las quinol oxidasas (para más detalle ver introducción del Capítulo 4) se logró mediante mutaciones del extremo carboxilo de este dominio, introducir los residuos cisteína, imprescindibles para organizar este tipo de centro, que se perdieron durante la evolución de esa subfamilia de proteínas.[126]

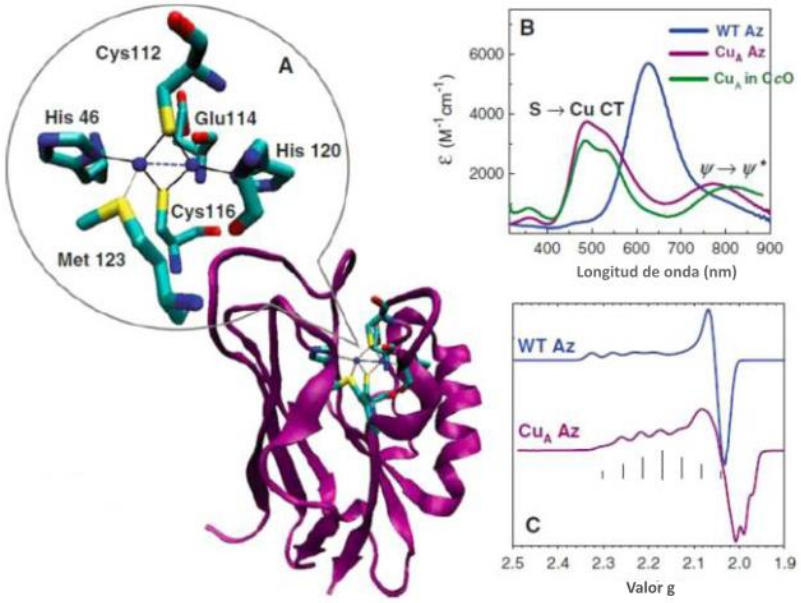


Figura 13: *(Figura adaptada Savelieff et al 2010)*[113] ***A.*** *Estructura tridimensional de Cu_A-Azu (pdb ICC3) representada mediante los elementos de estructura secundaria (hebras-β, hélice-α y bucles),y un detalle del centro metálico (sitio Cu_A).* ***B****. Espectros de absorción electrónica de un sitio T1 (azul) y Cu_A (verde) silvestres y el de la quimera Cu_A-Azu (violeta).* ***C.*** *Espectros EPR de un sitio T1 (azul) y el de la quimera Cu_A-Azu (violeta).*

Recientemente se ha logrado incorporar este tipo de sitio en estructuras terciarias cualitativamente distintas a las cupredoxinas, íntegramente compuestas por de α-hélices, ya sean matrices nativas[127] mediante rediseño de su estructura de manera local, o mediante diseño *de novo*[128] como se comentará brevemente en la sección siguiente.

Esta estrategia también fue aplicada sobre sistemas que contenían sitios T1[111,129,130], siendo estos casos aún más sencillos que la quimera Cu_A-Azu, ya que el cambio es menos drástico. En todos los casos la cavidad que la matriz proteica delimita para el sitio T1 será la misma, y a *priori* sólo habrá perturbaciones geométricas debidas a interacciones estéricas entre el bucle implantado y la matriz hospedadora. Este conjunto de estudios permitió revelar información muy variada de este tipo de sistemas. En todos los casos se emplearon como matrices hospedadores proteínas que albergaban sitios T1 naturalmente, como Azurina[131–133], Amicianina[134–136], Plastocianina[131,132], Nitrito reductasa[137] y Pseudoazurina[131,138], sin embargo, los bucles implantados fueron tanto naturales como artificiales[139]. De entre las características que se modificaron tenemos principalmente el largo del bucle implantado, la hidrofobicidad y la voluminosidad de las cadenas laterales de los residuos, la presencia de prolinas (que anulan en muchos sitios silvestres la posibilidad de formar un enlace puente de hidrógeno con el sulfuro de la cisteína coordinante), y se han investigado tanto aspectos estructurales, espectroscópicos, termodinámicos como potenciales de reducción, sus contribuciones entálpicas y entrópicas, y pKas de residuos coordinantes, así como también aspectos cinéticos como energías de activación del proceso de TE[133,136,139–143]. Además, se tuvo especial interés en probar combinaciones entre sitios T1 rómbicos y axiales, ya sea como bucle implantado o matriz hospedadora. Además de sitios T1, se ha reportado el implante en la matriz de Azurina el bucle que conforma el único sitio T2 hallado en una cupredoxina, perteneciente a Nitrosocianina, en un estudio conjunto con mutantes puntuales de la Azurina que reconstituyen ciertas características del sitio T2 permitiendo encarar de una manera más completa el análisis.[144] También se ha evaluado el efecto de la permutación de la posición de los ligandos en la estructura del bucle en construcciones de este tipo.[145]

Dentro de este gran cuerpo de experimentos no han sido testeadas quimeras donde la matriz hospedadora sea una cupredoxina con mayor distancia evolutiva entre la proteína que aporta el bucle y aquella que aporta la matriz hospedadora, lo que claramente podría generar perturbaciones no vistas hasta el momento. Este es uno de los aspectos que se pretende evaluar en esta tesis, al emplear una matriz que evolucionó para albergar y modular las características de un sitio binuclear de cobre, el Cu_A.[84,146] Además, la elección de bucle con características particulares como es el caso de aquel de la cupredoxina hallada recientemente en *Nitrosopumilis maritimus*[34], lo que permite generar sistemas con características únicas, como es el caso de la quimera *Nmar-Tt*-Cu_A que trataremos hacia el final del Capítulo 3[37].

1.2.2.3-Diseño racional *de novo* de metaloproteínas

Esta es una estrategia aún más radical y compleja, y que se basa esencialmente en construir un polipéptido cuya secuencia no esté directamente relacionada con ninguna otra de origen biológico y se pliegue adoptando una estructura tridimensional dada que una un metal.[147] Grandes avances en el campo del diseño *de novo* de proteínas fueron realizados por el grupo del Dr. David Baker[148–153], sin embargo, el avance con metaloproteínas específicamente aún se encuentra en sus comienzos. La mayor parte del avance en este campo se focalizó en introducir sitios metálicos en matrices proteicas compuestas principalmente por α-hélices, Figura-14[154–156]. Dado que estos plegados proteicos suelen encontrarse conteniendo grupos hemo en la naturaleza, esta fue una de las primeras opciones de grupos prostéticos[157,158]. Así se lograron obtener metaloproteínas funcionales no sólo como modelos para el estudio de procesos de TE proteica[159] sino también como modelos para catálisis enzimática como anilina hidroxilasa[160], peroxidasa[161] y oxigenasa[162], y otro tipo de funciones como unión de moléculas pequeñas como oxigeno molecular[163].

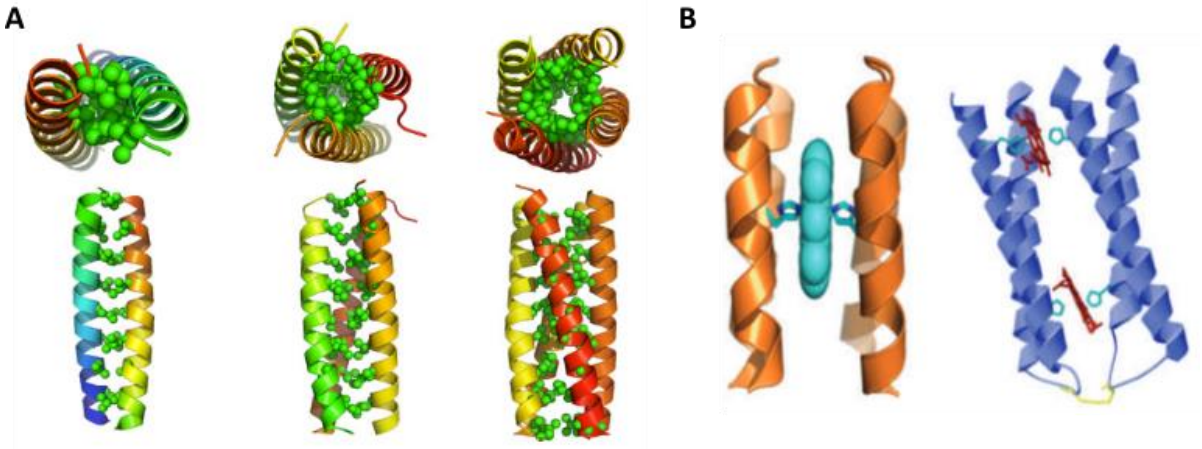


Figura 14: *(Figura adaptada Korendovych et al 2020 y Lu et al 2009)*[97,154] ***A.*** *Detalle de algunas estructuras de súper hélices (conocidas en inglés como estructuras coiled-coils). Se esquematizan los residuos que interactúan en el interior de la superestructura como esferas verdes.* ***B.*** *Algunos ejemplos de súper hélices con grupos hemos en el interior de la construcción.*

Sin embargo, no se tardó mucho en incorporar otros metales o cofactores en este tipo de estructuras proteicas basadas en α-hélices.[164] Entre ellos vale la pena mencionar que se lograron introducir sitios monoatómicos de cobre en matrices de este mismo tipo. Entre los primeros intentos la introducción de sitios con la misma esfera de coordinación que los sitios T1 llevaron a la generación de metaloproteínas de color rojizo,[165] con características espectroscópicas similares a aquellas encontradas en sitios T2, que presentaban al menos una cisteína en su esfera de coordinación, lo que sugiere fuertes distorsiones en la geometría del complejo. Sin embargo, en el estado reducido se recuperaron las características estructurales típicas de sitios T1 reducidos naturales. Además, se logró incorporar exitosamente sitios T2 con

distintos patrones de coordinación, sitios rojos como el de Nitrosocianina[26] o sitios T2 típicos con actividad enzimática muy variada[166–168]. Asimismo existen reportes donde se logró reconstruir un sitio binuclear de Cu_A púrpura en una matriz de este tipo, Figura-15.[128]

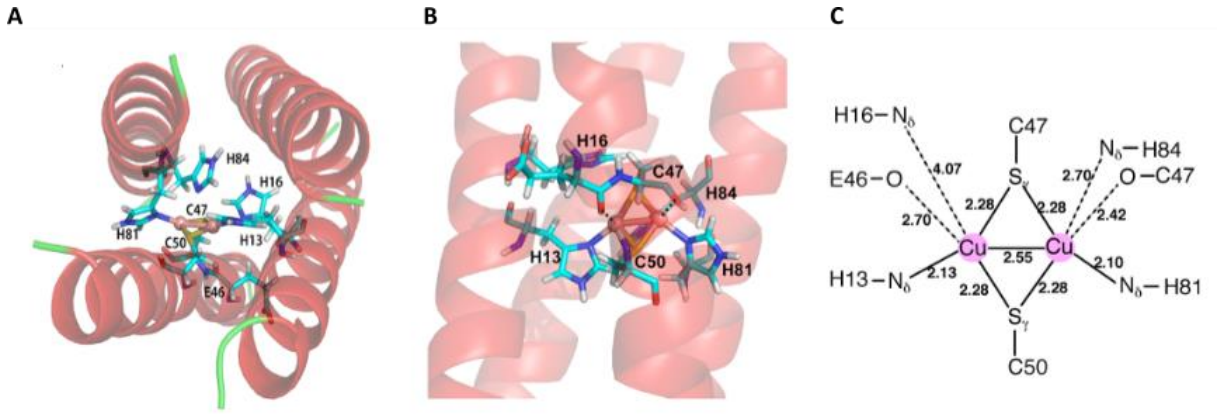


Figura 15: *(Figura adaptada Shiga et al 2012)*[128] ***A.*** *Mirada desde la base del modelo de la estructura tridimensional.* ***B.*** *Mirada lateral del modelo. En ambos esquemas la matriz se encuentra representada en base a su estructura secundaria, los ligandos presentando sus enlaces y los átomos de cobre como esferas rojas.* ***C.*** *Detalle de las distancias obtenidas a partir de una minimización de la estructura propuesta, las interacciones axiales débiles se encuentran indicadas con líneas punteadas.*

Rápidamente además de variar el sito metálico y el plegado general de la matriz que se esté empleando, fue posible modificar de manera más sutil el entorno del metal, permitiendo una modulación fina de aspectos estéricos e hidrofóbicos.[169] Tal como ocurrió con las mutaciones puntuales, el empleo de residuos no canónicos no tardó en sumarse al juego y permitió expandir las características fisicoquímicas de los andamiajes proteicos.[170,171] Al mismo tiempo la posibilidad de introducir cofactores metálicos no naturales empieza a ganar terreno y abre un gran abanico de nuevas posibilidades.[172–177] Por otro lado, se está avanzando en el diseño *de novo* de otras estructuras proteicas basadas, por ejemplo, en hojas β, en mucha menor medida claro debido a que son sistemas más complejos de parametrizar.[178–181]

1.3-Transferencia electrónica

La reacción de TE constituye la reacción química más elemental, y se encuentra en el corazón de la gran mayoría de los procesos que sustentan la vida, donde vale la pena mencionar dos casos paradigmáticos: la cadena de transporte de electrones presente en la respiración celular y la fotosíntesis. Ambos casos, sumados a las innumerables reacciones que involucran algún paso de TE en su proceso, son llevadas a cabo principalmente por proteínas y otras moléculas orgánicas en un contexto celular complejo. Pero antes de adentrarnos en el corazón de esta tesis y tratar estos sistemas complejos se presentarán brevemente los lineamientos

básicos de la TE de Marcus para especies en solución y luego su extensión a sistemas interfaciales, ambos de relevancia para el análisis a lo largo de este trabajo.

1.3.1-Teoría de Transferencia electrónica de Marcus.

Hoy en día el modelo de TE más exitoso y el primero al que se recurre al estudiar reacciones de TE es el modelo semiclásico de Marcus, y subsecuentes modificaciones.[182,183] Distintos autores como Dogonadze, Hush, Levich, Wolines, Kuznetsov, Ulstrup y Hynes, entre otros, desde un punto de vista cuántico introdujeron modificaciones que permitieron la extensión de este teoría, que fue originalmente desarrollado para sistemas sencillos de reactivos en solución, a reacciones heterogéneas sobre electrodos metálicos.[184–187]

En el formalismo semiclásico de Marcus la reacción de TE se describe a través de la intersección de dos curvas armónicas de energía libre, que representan la energía de los estados inicial y final, en función de la configuración nuclear de los reactivos y productos. En la intersección de ambas curvas los reactivos y productos poseen la misma energía y las mismas coordenadas nucleares, ver Figura-16. Esta teoría se basa en que los reactivos deben sufrir una reorganización nuclear para alcanzar este punto de cruce y permitir que tenga lugar el proceso de tuneleo electrónico.

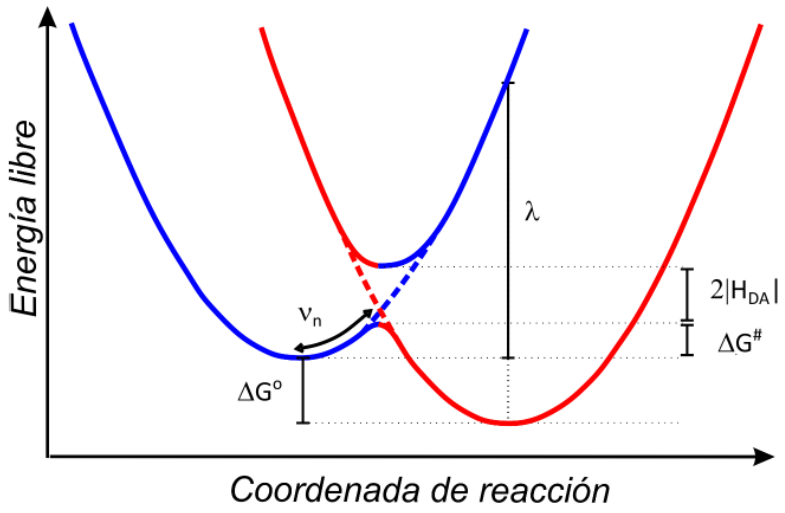


Figura 16: *Esquema de una superficie de energía libre par reactivos (azul) y productos (rojo) en función de una coordenada de reacción generalizada. Se presentan los parámetros cinéticos y termodinámicos relevantes en el contexto de este modelo: la energía libre de reacción (ΔG^o), frecuencia nuclear efectiva (ν_n), energía de reorganización (λ), energía libre de activación ($\Delta G^{\#}$) y el acoplamiento electrónico ($|H_{DA}|$).*

La constante de velocidad de TE (k_{TE}) puede expresarse como la productoria de tres factores:

$$k_{TE} = \nu_n \kappa_{el} \kappa_n \qquad \textbf{Ecuación-1}$$

Donde ν_n es la frecuencia nuclear efectiva que lleva a los reactivos hasta la región de intersección, mientras que κ_{el} es el coeficiente de transmisión electrónica y κ_n es el factor de reorganización nuclear. κ_{el} es una función del cociente ν_{el}/ν_n, donde ν_{el} es la frecuencia del salto electrónico durante un solo pasaje por el punto de intersección. κ_{el} puede adoptar valores entre 0 y 1, definiendo el régimen de TE. Entonces, cuando $\kappa_{el} \ll 1$ el proceso de denominará *diabático*, o más comúnmente denominado *no adiabático*. Por otra parte, cuando κ_{el} sea igual a 1, el proceso se denominará *adiabático*.

Puntualmente κ_{el} adopta la siguiente expresión:

$$\kappa_{el} = \frac{2P}{1 + P} \qquad \textbf{Ecuación-2}$$

donde P representa al probabilidad de transición desde el estado inicial al estado final en un solo pasaje a través de la intersección de las dos superficies de energía libre, es decir, es la probabilidad de transferir un electrón entre un aceptor y un dador. Cuando el perfil de energía libres se asume como parabólico y con igual curvatura entre dador y aceptor se puede definir P a través de la expresión de Landau-Zener:

$$P = P_{LZ} = 1 - \exp\left[-\frac{\nu_{el}}{2\nu_n}\right] \qquad \textbf{Ecuación-3}$$

Donde ν_{el} se puede expresar de la siguiente manera:

$$\nu_{el} = \frac{4\pi^2 |H_{DA}|^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \qquad \textbf{Ecuación-4}$$

ν_{el}, como ya mencionamos, representa la frecuencia de salto electrónico entre dador y aceptor una vez alcanzado el punto de cruce en las superficies de energía libre, y dependerá de la separación entre ambos (r_{DA}) a través del acoplamiento electrónico entre dador y aceptor, representado por el elemento de matriz de acoplamiento $|H_{DA}|$ (o simplemente H_{DA}). Este factor posee una dependencia con la distancia según la expresión:

$$|H_{DA}| = |H_{DA}|^o \exp\left[-\frac{\beta}{2}(r - r_o)\right] \qquad \textbf{Ecuación-5}$$

donde $|H_{DA}|^o$ representa el acoplamiento cuando $r = r_o$. Entonces combinando las expresiones 2, 3 y 5 se tiene que ahora κ_{el} puede expresarse según:

$$\kappa_{el} = \frac{2\left(1 - exp\left(-\frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right)\right)\right)}{2 + \ exp\left(-\frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right)\right)} \qquad \textbf{Ecuación-6}$$

Donde ν_{el}^{o} queda expresado como:

$$\nu_{el}^{o} = \frac{4\pi^2 |H_{DA}|^{o\,2}}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \qquad \textbf{Ecuación-7}$$

De este modo, para el caso no adiabático donde vale $\kappa_{el} \ll 1$, equivale a decir que:

$$\frac{\nu_{el}}{\nu_n} = \frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right) \ll 1 \qquad \textbf{Ecuación-8}$$

Y bajo estas condiciones, la función exponencial en la expresión-6 puede aproximarse según:

$$exp\left(-\frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right)\right) \approx 1 - \frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right) \qquad \textbf{Ecuación-9}$$

Reemplazando esta nueva expresión en la ecuación-6 es trivial demostrar que esta se reduce a la siguiente expresión:

$$\kappa_{el} = \frac{\nu_{el}}{\nu_n} = \frac{\nu_{el}^{o}}{\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right) \qquad \textbf{Ecuación-10}$$

De esta manera la expresión de la k_{TE} queda:

$$k_{TE} = \nu_{el}\kappa_n = \nu_{el}^{o}\, exp\left(-\beta(r - r_o)\right)\kappa_n \qquad \textbf{Ecuación-11}$$

Por otra parte, si se considera el caso contrario, $\kappa_{el} \cong 1$, equivale a:

$$\frac{\nu_{el}}{\nu_n} = \frac{\nu_{el}^{o}}{2\nu_n} exp\left(-\beta(r - r_o)\right) \gg 1 \qquad \textbf{Ecuación-12}$$

Ahora la expresión de la k_{TE} adopta la siguiente forma:

$$k_{TE} = \nu_n\kappa_n \qquad \textbf{Ecuación-13}$$

De esta manera queda expuesto como la distancia entre dador y aceptor define el régimen de TE, adiabática y no adiabática.

Como puede observarse la k_{TE} dependerá exponencialmente de la distancia entre dador y aceptor de electrones, a través de la magnitud de $|H_{DA}|^2$ en el factor preexponencial. Mientras que, por otra parte, se prevé una independencia con la distancia en el régimen adiabático. Según lo expuesto hasta aquí en el régimen no adiabático de TE la velocidad del proceso se encuentra limitado por una baja probabilidad de salto electrónico entre reactivos y

productos debido a un acoplamiento electrónico muy pobre. En esta situación, la frecuencia nuclear, ν_n, es mucho mayor que la electrónica, ν_{el}, y el sistema no pasa demasiado tiempo en el estado de transición, es decir, en el punto de entrecruzamiento de las superficies de energía libre, antes de relajar nuevamente a la configuración de reactivos, el mínimo en la curva, o deformarse más allá de este punto de cruce, curva roja en la Figura-17 izquierda. Sin embargo, es posible que una vez alcanzado este punto ocurra la TE y ahora el sistema recorra la superficie de energía libre de productos, curva azul en la Figura-17 izquierda, relajando a su mínimo correspondiente. La reacción bajo un régimen adiabático es más compleja, dado que la frecuencia electrónica es del mismo orden o mayor que la frecuencia nuclear. En esta situación el movimiento electrónico se vuelve dependiente del movimiento nuclear, y la reacción de TE ocurre gradual y conjuntamente con la deformación nuclear, atravesando un camino sobre una única superficie de energía libre que une el mínimo de los reactivos con el mínimo de los productos, Figura-17 derecha. El grado de interrelación entre ambas curvas depende de la magnitud del acoplamiento electrónico, $|H_{DA}|$.

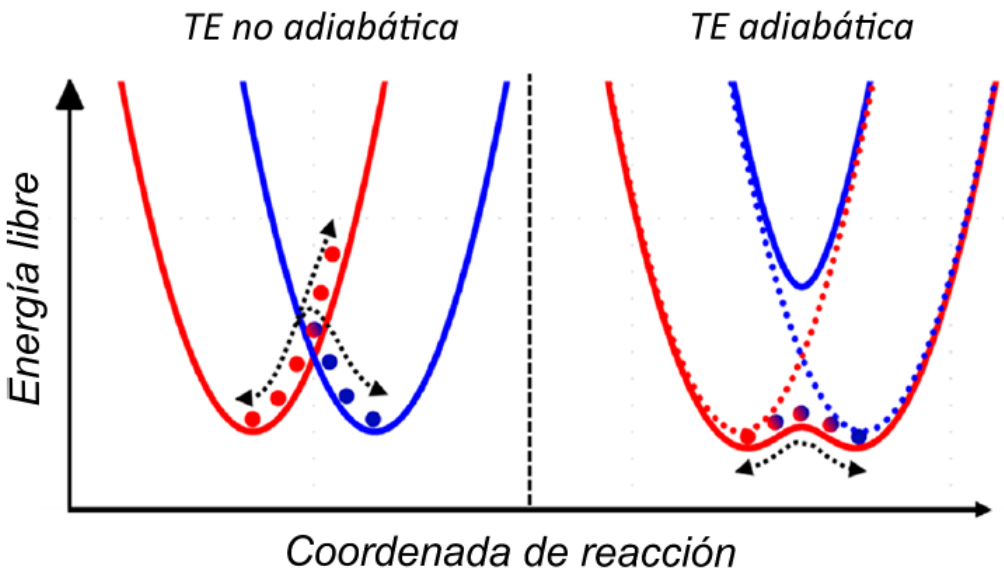


Figura 17: *(Figura adaptada de Piechota et al 2019)*[188] *Esquemas de los perfiles de energía libre de una reacción de TE no adiabática, izquierda, y adiabático, derecha. En el régimen no adiabático dado que el acoplamiento es muy bajo el coeficiente electrónico es muy bajo y la reacción tiene muy poca probabilidad de ocurrir. Una vez alcanzado el punto de cruce el sistema tiende a permanecer sobre la superficie de reactivos a pesar de poder alcanzar el punto de cruce. Sin embargo, como la probabilidad de TE es no nula, la reacción puede ocurrir en alguna oportunidad una vez alcanzado el punto de cruce. En el régimen adiabático el acoplamiento es tan grande que la probabilidad de TE es unitaria, y el sistema puede interconvertirse de reactivos a productos moviéndose gradualmente por una única superficie de energía libre.*

Por otro lado, el factor de Franck-Condon bajo el límite semiclásico de altas temperaturas tiene la siguiente expresión:

$$\kappa_n = exp\left(-\frac{(\lambda + \Delta G^o)^2}{4\lambda k_B T}\right) \qquad \textbf{Ecuación-14}$$

Es así que se obtiene la famosa expresión para las reacciones de TE no adiabáticas:

$$k_{TE} = \frac{4\pi^2 |H_{DA}|^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}}\, exp\left(-\frac{(\lambda + \Delta G^o)^2}{4\lambda k_B T}\right) \qquad \textbf{Ecuación-15}$$

A partir de las ecuaciones presentadas más arriba queda claro que la energía de activación del proceso puede expresarse en función de la energía libre de reacción, ΔG^o, y la energía de reorganización, λ, según la siguiente expresión:

$$\Delta G^{\#} = \frac{(\lambda + \Delta G^o)^2}{4\lambda} \qquad \textbf{Ecuación-16}$$

La energía de reorganización fue definida por Marcus como la energía requerida para llevar a los reactivos desde su configuración de equilibrio, es decir, su mínimo de energía libre, hasta la configuración nuclear de productos, sin que se lleve a cabo la reacción de TE. Es decir, se deforman los reactivos para alcanzar la configuración nuclear de productos sin abandonar su parábola, ver Figuras-16 y 18. Es importante notar que cuando la energía libre de reacción es cero, la energía libre de activación es $\Delta G^{\#} = \lambda/4$. Este importante parámetro puede en principio dividirse en dos contribuciones principales, una contribución interna, λ_{int}, y otra externa, λ_{ext}. La contribución interna incluye la contribución debida a los desplazamientos de la posición de equilibrio, $x_i - x_{i,o}$, de todos los modos normales con constante k_i involucrados en la distorsión de reactivos hasta la geometría de productos.

$$\lambda_{int} = \sum_i \frac{1}{2} k_i \left(x_i - x_{i,o}\right)^2 \qquad \textbf{Ecuación-17}$$

La contribución externa, o también llamada de esfera externa, se encuentra relacionada con la energía necesaria para que el solvente circundante, definido como un dieléctrico de constantes dieléctricas estática y óptica, ε_s y ε_{op}, respectivamente, responda frente a un cambio de carga transferida entre dador y aceptor, Δe , con radios r_D y r_A separados por una distancia r_{DA}, según la expresión siguiente:

$$\lambda_{ext} = \frac{\Delta e^2}{4\pi\varepsilon_o}\left(\frac{1}{2r_D} - \frac{1}{2r_A} + \frac{1}{r_{DA}}\right)\left(\frac{1}{\varepsilon_{op}} - \frac{1}{\varepsilon_s}\right) \qquad \textbf{Ecuación-18}$$

El último factor de la expresión anterior, $\left({\varepsilon_{op}}^{-1} - {\varepsilon_s}^{-1}\right)$, es conocido como el factor de Pekar.

El último parámetro de relevancia es la energía libre de reacción, ΔG^o. En función de la magnitud relativa del ΔG^o y λ se pueden definir diferentes situaciones para la TE, Figura-16. A medida que se incrementa la ΔG^o la reacción se vuelve más rápida debido a que, tal como

indica la expresión-15, la energía de activación disminuye. Esta se conoce como la *región normal* de TE. Conforme aumenta el valor de ΔG^o se llega a un punto en el que $\Delta G^o = \lambda$, de modo que la energía de activación del proceso es nula, y esta representa la situación en la que la velocidad es máxima. Este punto se corresponde con un punto de cruce entre las parábolas sobre el mínimo en la parábola de reactivos. Si se sigue incrementando el valor de ΔG^o, nuevamente el numerador de la expresión-16 es distinto de cero y la energía de activación comienza incrementarse nuevamente conforme se vuelve más espontánea la reacción. Este último caso se conoce como *región invertida* de TE.

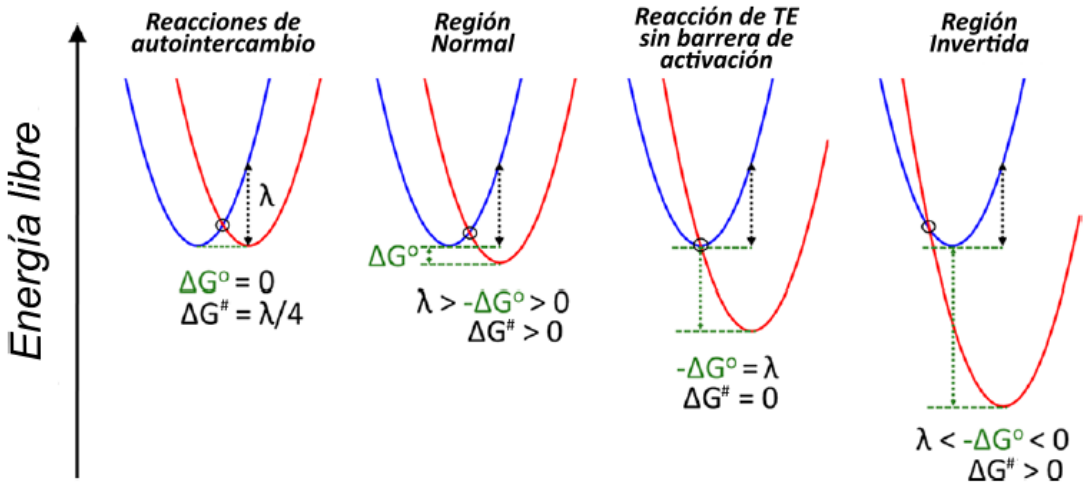


Figura 18: *(Figura adaptada de Piechota et al 2019)*[188] *Esquemas de los perfiles de energía libre de una reacción de TE bajo distintas relaciones de magnitud de energías libres de reacción, ΔG^o, energía libre de activación, $\Delta G^{\#}$, y energías libres de reorganización, λ.*

A lo largo de este trabajo se emplearán diversas técnicas electroquímicas tanto sobre soluciones proteicas como sobre películas proteicas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados, ver sección siguiente. En ambos casos la reacción de TE se da entre el centro metálico de la proteína y un electrodo metálico. Es por ello que se deberá tener en cuenta un modelo extendido de la teoría de Marcus, desarrollado por Dogonadze y Kuznetsov, para reacciones en fase heterogénea.[184,185,189,190] En su propuesta demostraron que la velocidad de TE entre una especie y un electrodo metálico puede calcularse como la suma de las probabilidades parciales de las transiciones electrónicas entre el orbital redox r de energía ϵ_r y los estados electrónicos $\{k\}$ con energías $\{\epsilon_k\}$ en el electrodo. En este formalismo, existen tantas superficies de energía libre como estados electrónicos haya en el metal, por encima y por debajo del nivel de Fermi del metal, cada uno con un dado acoplamiento electrónico con la superficie de energía libre de la especie molecular, ver Figura-19-A. El acoplamiento electrónico viene dado por $H = 2\sum_k h_{rk}$, donde h_{rk} representa la magnitud del acoplamiento entre el reactivo, r, y el k-ésimo estado electrónico del metal. Cuando se considera un semiconductor en lugar de un metal se deberán considerar los estados electrónicos por arriba

(banda de conducción) y por debajo (banda de valencia) de la separación entre ambos conjuntos de estado electrónicos accesibles, conocida por su denominación en inglés *energy gap*. No habrán estados electrónicos con esas energías, y por lo tanto no habrá TE en ese intervalo de energías, Figura-19-B.

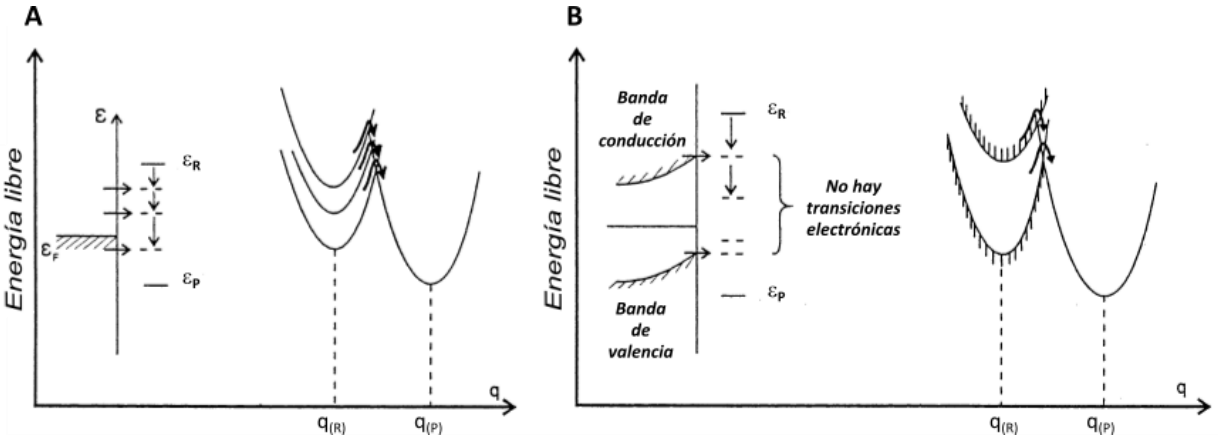


Figura 19: *(Figura adaptada de Kuznetsov y Ulstrup 2000)*[185] *Esquema de energías electrónicas del material conductor, metal en la izquierda y semiconductor en la derecha, presentando las parábolas de energía libre para el conductor y la especie molecular con la que reacciona. En este caso se representa un proceso catódico en el que el electrón es transferido desde el material conductor a la especie molecular.*

En este formalismo la k_{TE} para un proceso de TE heterogéneo, no adiabático, puede escribirse como sigue para el caso de electrodos metálicos:

$$k_{TE}(\eta) = \frac{4\pi^2|H|^2}{h\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\epsilon)\, \rho(\epsilon)\, exp\left(-\frac{(\lambda + (\epsilon_F - \epsilon) + e\eta^o)^2}{4\lambda k_B T}\right) d\epsilon \qquad \textbf{Ecuación-19}$$

Donde $H = 2\sum_k h_{rk}$ es reemplazado por un promedio efectivo, $|H|$, $\rho(\epsilon)$ indica la densidad de estados del metal (DoS) y $f(\epsilon)$ es la distribución de Fermi-Dirac. ϵ_F se refiere al nivel de Fermi del metal.

$$f(\epsilon) = \frac{1}{1 + exp[(\epsilon + \epsilon_F)/k_B T]} \qquad \textbf{Ecuación-20}$$

La expresión anterior se conoce como el modelo de Marcus DoS, utilizada típicamente en reacciones de TE heterogénea para el régimen no adiabático.

1.3.2-La interfaz electrodo-solución

Las membranas biológicas no sólo permitieron el origen de la vida al permitir generar entornos acuosos delimitados cuyas propiedades podían diferenciarse del entorno en el que se encontraban dando origen a las protocelulas, mejor conocidas como microesferas o coacervados,[191] sino que su rol se fue complejizando con el correr del tiempo llegando a formar parte y cumplir roles protagónicos en muchos de los procesos más relevantes para la vida hoy en día. Entre estas funciones podemos destacar procesos como la fotosíntesis y respiración celular entre una decena de otros procesos enzimáticos y de transporte que se dan tanto en organismos procariotas, que cuentan son unas pocas estructuras membranosas dependiendo del grupo filogenético del que formen parte, como en organismos eucariotas llevadas a cabo en organelas especializadas, que desde un punto evolutivo no son otra cosa que células procariotas endocitadas y conservadas en el citoplasma celular.[192–194] Las estructuras supramoleculares que operan dentro de estas membranas como en sus inmediaciones enfrentan entornos cuyas propiedades fisicoquímicas distan mucho de las propiedades del seno del citosol.[195–199] Una de las más importantes es la presencia de un medio anisotrópico cuyas propiedades siguen algún tipo de gradiente dependiente de la distancia a la interfaz membrana-solución. Típicamente las membranas celulares constan de una, o varias, bicapas lipídicas formadas por una mezcla sumamente variada y no trivial de lípidos anfifílicos, cuyos grupos polares, que pueden estar cargados, se encuentran orientados hacia el seno acuoso, mientras que sus grupos no polares se reúnen conformando un espacio virtual sumamente hidrofóbico, Figura-20. Esta disposición, sumada a la alta complejidad que presentan estas interfaces en sistemas biológicos llevan a que se generen campos eléctricos locales determinando perfiles de potencial eléctrico, $\psi(r)$, de gran relevancia para los procesos que allí tienen lugar.[200] El origen de este perfil de potencial eléctrico puede agruparse en tres categorías: la diferencia de concentraciones iónicas entre ambos lados de la membrana, la presencia de una distribución de cargas eléctricas sobre las superficies y la orientación de dipolos en la región de los grupos polares que delimitan el límite entre la membrana y la solución.

La diferencia de concentraciones de eletrolitos y polielectrolitos a ambos lados de la membrana genera un potencial transmembrana, $\Delta\psi$, que puede adoptar un valor de 100 mV en una membrana de 4 nm ancho lo que equivale a un campo eléctrico interfacial de $2{,}5.10^7$ $V.m^{-1}$.[201,202] La segunda componente es debida a la presencia de una distribución de cargas sobre la superficie de la membrana, ya sean iones adsorbidos sobre esta o mismo cargas asociadas a los grupo polares expuestos por esta, determinando el llamado potencial de superficie, ψ_s, sumado a la doble capa iónica que se extiende desde la superficie hacia el seno de la solución, apantallando el efecto de estas cargas. Se estima que la magnitud de esta contribución es del mismo orden que la del $\Delta\psi$. Por último, la contribución restante se debe a la orientación de un gran número de dipolos moleculares, potencial de dipolo, ψ_D, que generan un gran campo eléctrico local, de hasta 10^9 $V.m^{-1}$, que debido a su origen es de corto alcance y decae rápidamente en el espacio.[203–206]

La presencia de estos campos eléctricos indudablemente influenciará la actividad proteica en sus cercanías, lo que resulta de gran interés cuando se estudian proteínas involucradas en TE. Típicamente los estudios pioneros en el campo se realizaban sobre moléculas en solución, en medios altamente isotrópicos, de modo que no era posible tener en cuenta estas variables, que si se encuentran en medios biológicos complejos. En la siguiente sección se comenta la estrategia empleada para considerar tales efectos en el estudio de metaloproteínas con actividad redox.

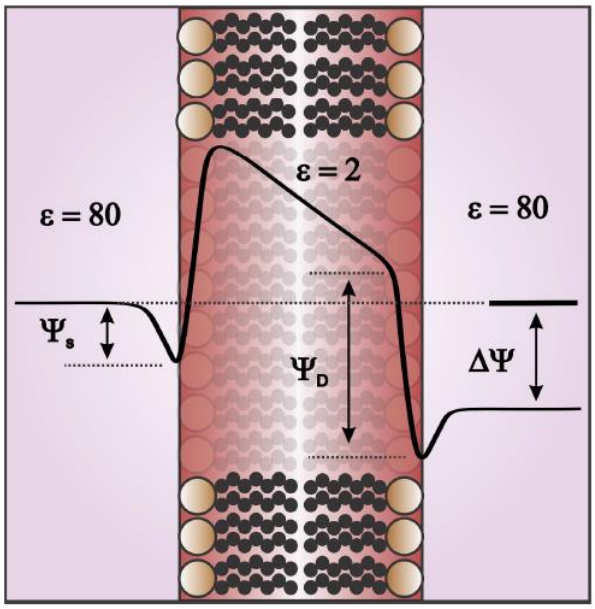


Figura 20: *(Figura adaptada de Murgida et al 2004)*[207] *Representación esquemática de los perfiles de potencial en interfaces biológicas.*

1.3.3-Electrodos biocompatibilizados: monocapas autoensambladas

Muchos de los estudios de TE proteica basaron su estrategia en acoplar un sitio redox foráneo sobre la superficie proteica de modo de poder llevar a cabo una reacción intermolecular de TE entre éste y el sitio nativo. Un caso de relevancia sistemáticamente reportado por el grupo del Dr. Gray en el que se incorporó a la superficie proteica de distintos citocromos[208,209] y Azurina[210] un complejo metálico de rutenio, $Ru(bipi)_2(Im)(His)^{+3}$, explotando al existencia de residuos histidina superficiales, ya sean naturales o introducidos mediante mutaciones. En estos casos se siguió la reacción entre mediante experimentos de espectroscopia de absorción de estados transitorios, o también conocida como *Flash* fotólisis. Otro caso similar es aquel reportado por el Dr. Pecht donde se explota la existencia de un grupo disulfuro situado en el extremo opuesto al sitio de cobre T1 en Azurina.[211–214] Este caso tiene la ventaja de que no fue necesario introducir un grupo foráneo que pudiera alterar ninguna característica del sistema nativo. En esta oportunidad se empleó la técnica de radiólisis pulsada (RP) en la que se irradian moléculas de solvente con electrones de alta energía (~2-10

MeV) por períodos cortos de tiempo (0,1-1μs) para generar especies altamente reactivas como radicales (OH^{*}) y electrones solvatados (e_{ac}^{-}) que rápidamente reaccionan a través de una serie de reacciones que involucran moléculas de solvente y otras como el N_2O y aniones formato (HCO_2^-) para dar moléculas menos reactivas y más selectivas como el radical CO_2^-. Estos radicales reducen le grupo disulfuro ($RSSR$) para dar un radical disulfuro ($RSS^{*}R^{-}$) que posteriormente reducirá el centro de cobre T1 que se encuentra a ~ 25 Å a través de una reacción de TE intraproteica, ver Figura-21. Siguiendo el cambio en las intensidades de las señales para $RSS^{*}R^{-}$ y Azu[Cu(II)] en el tiempo es posible obtener la k_{TE}. Por supuesto que no se tardó en extender estos estudios a la variante quimérica Cu_A-Azu desarrollada por Dr. Lu y colaboradores.[121]

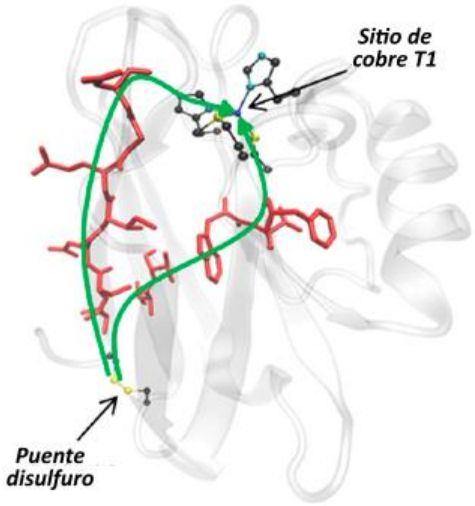


Figura 21: *(Figura adaptada de Farver et al 2012)*[211] *Molécula de Azurina (estructura secundaria en gris) indicando en rojo los residuos involucrados en el camino electrónico desde el puente disulfuro, señalado con dos esferas amarillas, y el centro de cobre T1. Con flechas verdes se encuentran indicados dos caminos electrónicos estimados computacionalmente.*

Si bien estas estrategias fueron muy importantes en el entendimiento de la TE proteica que preocupaban a los científicos en ese entonces, como ser la relevancia de la matriz proteica en el acoplamiento electrónico entre sitios redox[215], sin embargo, al ser llevadas a cabo en solución fallaban en reproducir aspectos importantes presentes en medios biológicos como se comentó previamente. Estrategias desarrolladas de manera independiente en el campo de la electroquímica llevaron a intentar estudiar procesos de TE en fase heterogénea. Esta idea se basó principalmente en contar con una metodología de trabajo que permita estudiar la TE en condiciones que emulen el proceso entre una proteína redox y un medio anisotrópico, como ser una segunda proteína y una membrana. Esto llevó al desarrollo de distintas formas de biocompatibilizar las superficies de los electrodos. Una de las estrategias más exitosas y ampliamente empleadas es la utilización de monocapas autoensambladas, o SAMs del inglés *self assembled monolayers*, de alcanotioles sustituidos en su posición ω. Esta forma de

biocompatibilización permitió el gran desarrollo de la bioelectroquímica de los últimos 30 años. Su éxito se debe a su fácil manipulación y a su versatilidad.

Al exponer la superficie metálica del electrodo, a una solución de ω-alcanotioles, estos se unen mediante el grupo tiol a la superficie metálica mientras las cadenas carbonadas se organizan entre sí recreando una hemicapa lipídica, o monocapa, gracias al efecto hidrofóbico, ver Figura-22-A. Su armado es espontáneo, de allí su nombre. Es importante que la superficie metálica se encuentre perfectamente limpia de otro modo cualquier impureza adsorbida sobre su superficie o mismo una fina capa del óxido correspondiente podrían entorpecer el armado de la monocapa. Usualmente se emplean electrodos de oro a plata que se someten a diferentes tratamientos químicos y electroquímicos previo a su exposición a tioles.[216]

Por otra parte, una ventaja intrínseca y casi obvia de estos sistemas es que permiten emular en cierta medida características propias de membranas biológicas, donde las cadenas no polares forman un u interior hidrofóbico, y los grupos polares se orientan hacia la solución. De esta manera el perfil de potencial complejo como aquel detallado en la sección anterior, ver Figura-22-B. Estos sistemas presentan contribuciones debidas a solvente (doble capa) y orientación de dipolos superficiales, ψ_S y ψ_D respectivamente, y además la diferencia entre el potencial de la solución y el potencial de carga cero del metal, $\Delta\phi$, resultan equivalentes a la contribución transmembrana comentada previamente, $\Delta\psi$. Esto permite no solo estudiar metaloproteínas en entornos biomiméticos, sino también permite la modulación sistemática de la magnitud de alguna de las componentes anteriores a través del empleo de condiciones experimentales adecuadas como el largo de cadena hidrocarbonada, grupo/s terminales, potencial del electrodo, pH, fuerza iónica y tipo de electrolito soporte, entre otras.

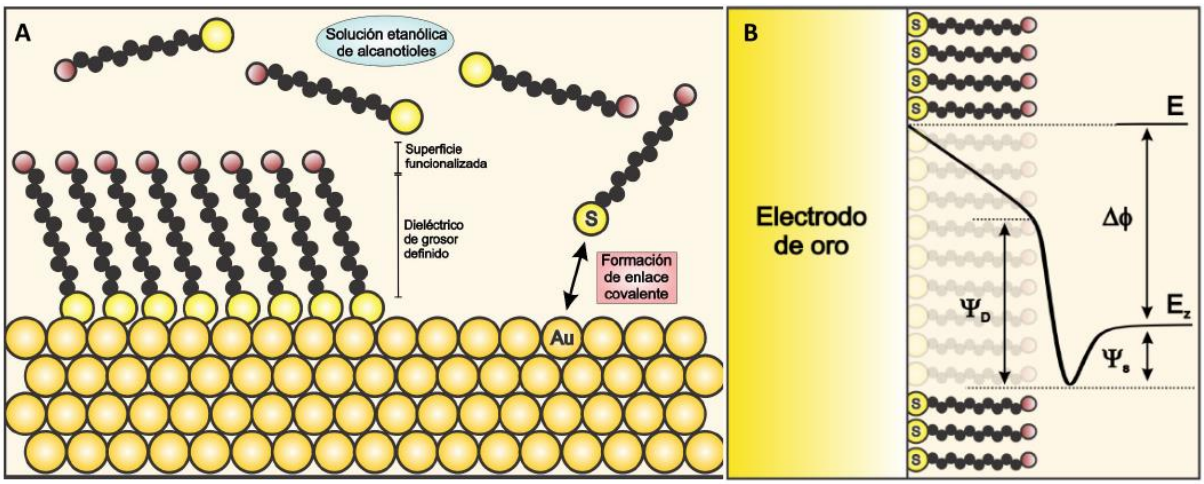


Figura 22: *(Figura adaptada de Zitare 2016*[217]*)* ***A.*** *Representación esquemática del armado de la monocapa de ω-alcanotioles, donde el grupo tiol se enlaza covalentemente con la superficie metálica, mientras que fuerzas de depleción impulsadas por efecto hidrofóbico eliminan el agua entre las cadenas hidrocarbonadas formando una monocapa* ***B.*** *Representación esquemática del perfil de potenciales interfaciales para el arreglo electrodo/monocapa/solución acuosa.*

Más allá de su simplicidad ofrecen otras ventajas a la hora de diseñar experimentos, una de ellas es la capacidad de funcionalización del extremo del ω-alcanotiol expuesto hacia la solución. El grupo terminal puede ser en la práctica casi cualquiera que se desee. Esta característica ha sido explotada para diversos propósitos entre ellos controlar la forma en la que se logra generar la película proteica sobre la superficie. Muchas proteínas presentan grupos, "parches", de residuos superficiales cargados o hidrofóbicos que se encuentran conservados que son responsables de establecer la interacción entre ambos sitios redox. Esto se logró explotar para obtener una adsorción proteica fisiológica, o fisiosorción, que resulta el modo más benigno de inmovilización. También es posible introducir grupos terminales que sea capaces de coordinar al átomo metálico en la proteína. Esta estrategia de inmovilización es conocida en la jerga como "cableado" de la proteína, ya que favorece fuertemente el acoplamiento electrónico entre el centro metálico y el electrodo. Un caso paradigmático lo representa el citocromo c, donde el ligando axial débil metionina puede ser reemplazado por un grupo imidazol proveniente de la monocapa.[218,219] Otra estrategia consiste en incorporar grupos terminales en las monocapas que puedan reaccionar con cadenas laterales de residuos superficiales en las proteínas permitiendo anclarlas mediante enlaces covalentes.[220] La combinación de ω-alcanotioles con diferentes grupos terminales generando monocapas mixtas es otra posibilidad que permite lograr una buena adsorción de metaloproteínas, y será empleada en esta tesis.

Por otro lado, controlando el número de grupos metilenos es posible controlar de manera muy eficiente la distancia entre el centro redox y la superficie del electrodo, determinando de esta manera el grado del acoplamiento electrónico entre dador y aceptor de electrones para la reacción de TE. Esto será fundamental a lo largo del desarrollo de esta tesis dado que se estudiará puntualmente el cambio de régimen de TE a medida que aumenta el acoplamiento electrónico y por ende la velocidad de reacción. Existe un extenso cuerpo de experimentos en torno a propiedades de monocapas de tioles y de otros tipos[221–224]. En particular, de interés para nosotros, se estudiaron las propiedades electrónicas de monocapas y como estas determinan un buen acoplamiento electrónico entre la superficie del electrodo y el analito a través de tuneleo electrónico a través de los enlaces de la cadena carbonada, en inglés "*through-bond tunnelling*".[225–231] Un análisis en función de la distancia permite obtener el factor de tuneleo, β de la ecuación-5, a partir de algún observable como ser la corriente, J, o la k_{TE} en función de la distancia a la superficie del electrodo. Se han reportado valores muy variados , entre $0{,}6$ y $1\ \text{Å}^{-1}$, para sistemas simples de monocapas de alcanotioles que dependen en cierta medida de la técnica de estudio empleada y las condiciones experimentales.[228] En línea con estos resultados, para sistemas proteicos adsorbidos sobre monocapas de tioles se han reportado valores cercanos a $\sim 1\ \text{Å}^{-1}$.[232]

Típicamente el material del electrodo donde se arman estas SAMs suele ser oro o plata aunque pueden emplearse otros metales como el cobre, platino y paladio,[233,234] sin embargo, pueden también se pueden usar electrodos de carbono, grafito o carbono vítreo, donde ahora son lípidos polares en lugar de tioles los que generan una monocapa. En estos casos las cadenas hidrofóbicas interactúan con la superficie del electrodo, exponiendo los grupos polares hacia la solución. Esta metodología permitió emplear difosfatidil glicerol, o

mejor conocido como cardiolipina, para recrear una superficie con características similares a aquellas encontradas en la membrana mitocondrial interna.[235–238] Esta estrategia resulta muy atractiva para ciertos sistemas como es el caso del citocromo c, sin embargo, no permite un control del espesor de la monocapa, lo que resulta un factor clave en nuestro esquema de trabajo. La elección de electrodos de plata en gran parte de los experimentos electroquímicos en el pasado fue impulsado fuertemente debido a sus propiedades plasmónicas, muy superiores a las del oro, que resultan ideales para la técnica espectroscopia Raman intensificada por superficies, (SERs del inglés *surface enhanced Raman spectroscopy*) y su combinación con Raman resonante (SERRs del inglés *surface enhanced resonance Raman spectroscopy*). Una de las metaloproteínas redox mejor estudiadas, el citocromo *c*, posee la particularidad de responder particularmente bien al empleo de esta técnica de superficie lo que permitió indagar en gran profundidad su comportamiento interfacial.[201,207,239–241] Por otra parte, el oro posee un rango de potencial más amplio que la plata, lo que lo convierte en un mejor opción para experimentos electroquímicos. Además, las SAMs suelen ser estables en el rango típico empleado para el estudio de metaloproteínas ya que sus potenciales de desorción reductiva se encuentran cercanos a -1 V (vs Ag/AgCl).[242,243]

1.3.4-Obtención electroquímica de parámetros redox: voltametría cíclica

Dentro del campo de la electroquímica existe una plétora de técnicas muy variadas que permiten interrogar el sistema bajo diversas condiciones aplicando distinto tipo de perturbaciones sobre el sistema. Dentro de las diversas técnicas disponibles las voltametrías, en las que se barre un rango de potenciales mientras se registra la corriente son de los más empleados. En particular la voltametría cíclica es uno de los más versátiles y fáciles de utilizar tanto para obtener parámetros cinéticos como termodinámicos.[244]

En la voltametría se aplica un barrido gradual de potencial, el que es establecido respecto a una referencia, dentro de un rango de valores cuyos valores límite pueden ser muy variados. En el caso particular de la voltametría se emplea un esquema como el que se presenta en la Figura-23-A. Si este barrido de potencial se realiza centrado en el potencial de reducción de una cupla redox se obtendrán señales voltamétricas (voltagramas) como aquellos de la Figura-23. La corriente registrada describirá una curva en forma acampanada, típicamente llamada “pico” en la jerga electroquímica, que corresponderá a la corriente de electrones entregada por el electrodo (reacción catódica de reducción) o recibida por este (reacción anódica de oxidación). Si el analito se encuentra adsorbido sobre la superficie del electrodo tras haber reducido todas las moléculas esta corriente vuelva a su nivel basal, que corresponderá con el valor de corriente base debido a procesos no faradaicos, de carga de la doble capa, Figura-23-B. Si por el contrario se trata de una especie que se encuentra en solución la señal voltamétrica no vuelve a cero inmediatamente, sino que tiende a cero de manera casi asintótica, describiendo la típica forma presentada en la Figura-23-C. Esto se debe a la corriente debida al

proceso difusivo que renueva constantemente la presencia de analito sin reaccionar sobre la superficie del electrodo.

La velocidad de barrido, υ, se encuentra definida por el voltaje que es barrido por unidad de tiempo ($V.s^{-1}$). El control de este parámetro permite acceder a información cinética y determina el régimen del proceso, reversible cuasi-reversible o irreversible, y con ello la forma de los voltagramas. Si la velocidad de barrido es menor que el valor de k_{TE} la reacción ocurre reversiblemente, si es del mismo orden la reacción será cuasi-reversible y si por el contrario es mucho mayor la reacción será irreversible. Este parámetros será de vital importancia en el método empleado para obtener los valores de k_{TE} tal como se tratará en el siguiente capítulo.

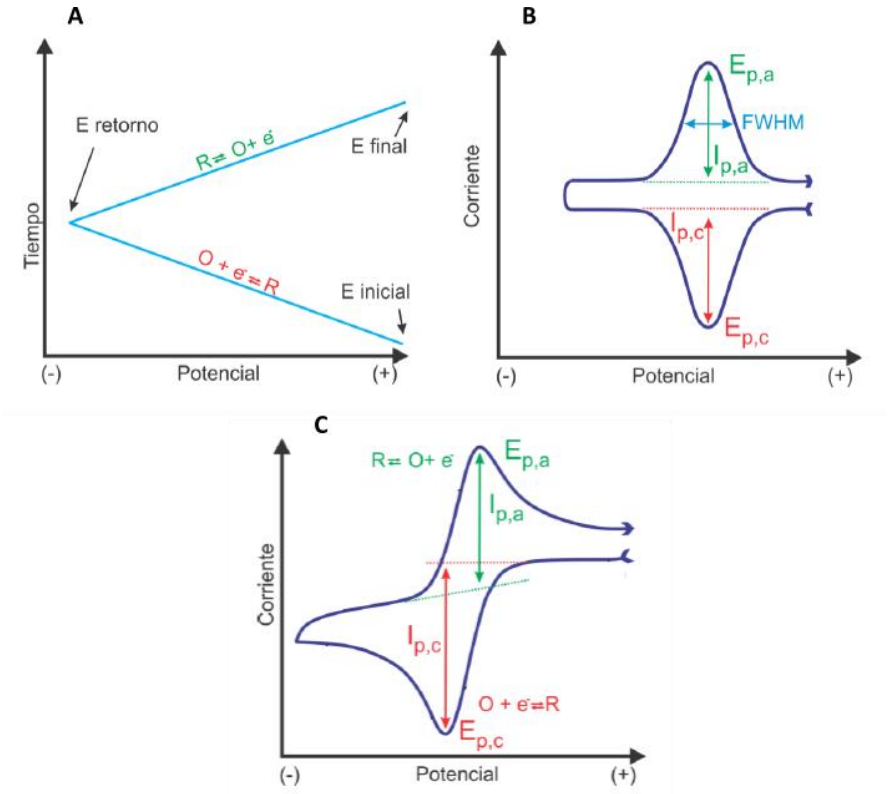


Figura 23: ***A.*** *Rampa de potencial empleado en un experimento de voltametría cíclica.* ***B.*** *Esquema de una voltametría cíclica de especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo.* ***C.*** *Esquema de una voltametría cíclica de especies en solución, con su característica. Se indican las corrientes de pico, I_{pa} y I_{pc}, los potenciales de pico, E_{pa} y E_{pc}, con sus respectivas líneas de base, y para el caso de la voltametría de especies adsorbidas se indica el ancho de la señal a la altura de medio pico, FWHM.*

Dentro de los parámetros más importantes y útiles que se pueden extraer de los voltagramas se encuentran los valores de los potenciales de pico anódicos y catódicos, E_{pa} y E_{pc}, es decir el valor de potencial en el máximo de corriente, I_{pa} y I_{pc}. Esto se debe a que a partir de ellos puede obtenerse el valor del potencial de reducción de la especie en estudio simplemente tomando el promedio de ambos valores, $E_{1/2}$. Esto vale siempre y cuando el coeficiente de difusión de las especie oxidada y reducida no varíe sustancialmente, lo que es perfectamente válido para sistemas proteicos como los estudiados en este trabajo.

$$E° \approx E_{1/2} = \frac{(E_{pc} + E_{pa})}{2} \qquad \textbf{Ecuación-21}$$

Otro parámetro de relevancia corresponde con las corrientes de pico anódicas y catódicas, I_{pa} y I_{pc}. Idealmente las magnitudes de ambas deben ser iguales dado que eso indicaría que todo el analito que fue reducido fue posteriormente reoxidado, y que no existen fuente de irreversibilidad química o estructural en las muestras, o posibles desorciones de analito en el caso de experimentos de voltametría de especies adsorbidas. Para voltametría en solución las I_p pueden obtenerse empleando las siguientes expresiones a una temperatura de 25°C, para el régimen reversible e irreversible:

Reversible: $$I_p = (2{,}69 \,.\, 10^5)\, n^{3/2}\, A\, D_o^{1/2}\, C_o^*\, \upsilon^{1/2} \qquad \textbf{Ecuación-22}$$

Irreversible $$I_p = (2{,}99 \,.\, 10^5)\, \alpha^{1/2}\, A\, D_o^{1/2}\, C_o^*\, \upsilon^{1/2} \qquad \textbf{Ecuación-23}$$

Donde, n indica el número de electrones involucrados en el proceso, A es el área electroactiva del electrodo, D_o es el coeficiente de difusión, C_o^* es la concentración en el seno de la solución, α es el coeficiente de trasmisión, y υ la velocidad de barrido. Notar que para voltametría en solución la corriente escala con el cuadrado de la velocidad de barrido, $I_p \propto \upsilon^{1/2}$. Para voltametría de especies adsorbidas, sin embargo, adquieren otro aspecto, debido a la falta de la corriente difusiva constante, y se tiene que:

Reversible: $$I_p = \frac{n^2\, F^2 A\, \upsilon\, \Gamma_o^*}{4\, RT} \qquad \textbf{Ecuación-24}$$

Irreversible $$I_p = \frac{\alpha\, F^2 A\, \upsilon\, \Gamma_o^*}{2{,}718\, RT} \qquad \textbf{Ecuación-25}$$

Entonces, para especies adsorbidas la corriente escala linealmente con la velocidad de barrido, $I_p \propto \upsilon$, De este modo, la dependencia de la I_p con υ sirve de diagnóstico para verificar la validez del tipo de proceso que se pretende estudiar, y descartar posibles desvíos de la idealidad, como adsorción inespecífica sobre el electrodo, por ejemplo. Por otra parte, su tratamiento en la región irreversible permite acceder al valor de α en ambos casos, y en particular para voltametría en solución, en la región reversible permite acceder al valor del D_o. Para este tipo de análisis el valor de A, área electroactiva, es determinado previamente empleando voltametría de una solución de concentración conocida de un analito del que se cuente con el

valor de D_o, por ejemplo, una solución de ferro/ferricianuro. El análisis del cociente de I_p también permite una determinación rápida del valor de α, dado que picos simétricos se encotrarán asociados a un $\alpha = 0{,}5$.

Por otro lado, la diferencia de los potenciales de pico anódico y catódicos, ΔE_p, también es un parámetro importante. Para procesos electroquímicos en la región reversible este valor debería ser 57 mV y 0 mV para experimentos en solución y adsorbidos, respectivamente. La evaluación de este parámetro también permite decidir en qué régimen se encuentra la reacción en estudio en términos de las velocidades de barrido empleadas. Para el caso de voltametría de especies adsorbidas es posible definir otro parámetro diagnóstico, el ancho de pico observado cuando $I = I_p/2$, denominado con las siglas FWHM, del inglés *full width at half máximum*. Para el caso reversible este parámetro adopta un valor de 90,6 mV a una temperatura de 25°C y asumiendo una reacción de un electrón ($n = 1$), y va en aumento al incrementar la velocidad de barrido. El alejamiento de este valor puede ser un indicio de diversos escenarios, entre ellos podemos mencionar no haber alcanzado el régimen reversible para las velocidades de barrido empleadas, la existencia de irreversibilidad química, es decir, el estado reducido y oxidado no responden de igual manera frente a la reacción con electrodo, la existencia de poblaciones con diferentes valores de $E°$ y/o de k_{TE}, interacciones laterales entre el analito adsorbido, entre otras.

En base a lo expuesto en esta sección y sumado al método de Laviron propuesto para obtener el valor de k_{TE}^o, es decir, el valor de k_{TE} a sobrepotencial cero, comentado en el capítulo siguiente, queda claro que la técnica de voltametría cíclica resulta idónea para interrogar un sistema proteico que atraviesa procesos de TE. Esto combinado con diferentes condiciones experimentales, como ser experimentos a temperatura variable, permite obtener a su vez parámetros fisicoquímicos de gran relevancia (E_{Red}^o, ΔH_{Red}^o, ΔS_{Red}^o, λ, $\Delta G_{TE}^{\#}$, etc) en el marco de diferentes teorías de TE.

1.4- Técnicas espectroscópicas y auxiliares

Se han utilizado tres técnicas espectroscópicas a lo largo de la tesis complementando el análisis electroquímico principal. Estas técnicas permiten obtener información sobre la estructura electrónica y, por ende, también estructural de la primera esfera de coordinación de los sitios de cobre que abordaremos. En el caso particular de los sitios de cobre T1, T2 y de Cu_A se han empelado históricamente tres técnicas espectroscópicas: de absorción electrónica en la región UV-visible del espectro, Raman resonante (Rr) y espectroscopia electrónica paramagnética (EPR), como medio para determinar sus propiedades estructurales y geométricas principales.[21,22,245,246] Dentro del conjunto de técnicas electroquímicas empleadas, además de la voltametría cíclica, se utilizó voltametría de corriente alterna (VCA) y cronoamperometría. A continuación, se presentará brevemente los fundamentos de estas técnicas.

1.4.1- Espectroscopia de absorción electrónica en la región UV-visible.

Este método es uno de los más ampliamente utilizados y convenientes para estudiar la estructura electrónica de un analito. Las moléculas poseen no uno sino varios niveles de energía electrónicos accesibles, y se pueden inducir transiciones entre estos estados mediante la absorción de un fotón. El espectro de absorción UV-visible de biomoléculas generalmente suele brindar mucha información especialmente cuando contiene cromóforos asociados a ella (cofactores metálicos, grupos prostéticos, etc), y fueron utilizados históricamente para monitorear distintos tipos de procesos (degradaciones, transiciones estructurales, cambios en la coordinación de metales, unión de ligandos, procesos de reducción, entre otros). Por supuesto también constituye una de las principales técnicas de cuantificación de muestras con cromóforos.

En el caso de centros metálicos se pueden distinguir tres grupos de transiciones en función de los orbitales involucrados, cuya energía está generalmente contenida en la región que permite monitorear esta técnica: transiciones que involucran electrones π o σ (enlazantes o antienlazantes) originando transiciones $\sigma \rightarrow \pi$ o $\pi \rightarrow \pi^*$ centradas principalmente en el ligando, transiciones que involucran transferencia de carga metal → ligando (TCML), o ligando → metal (TCLM), y transiciones entre niveles d o f, centrados principalmente en el metal.[247] La primera categoría suelen ser transiciones de alta energía típicamente en la zona UV. Las dos categorías siguientes son de gran importancia para el caso de sitios metálicos en metaloproteínas ya que constituyen el espectro de absorción que se observa en estas, ver Figura-24.

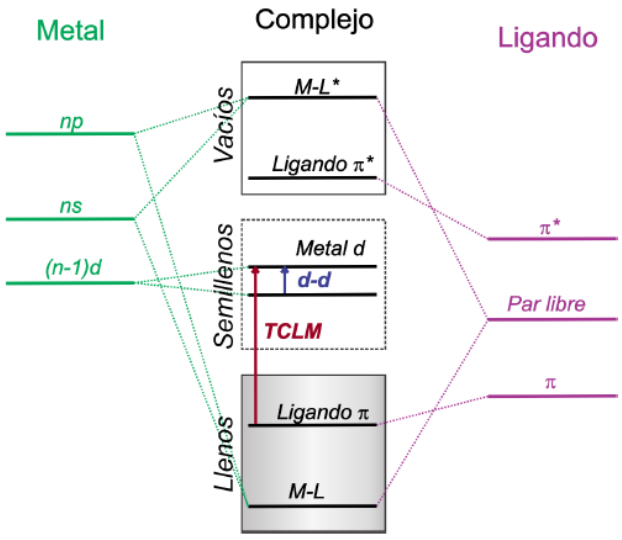


Figura 24: *Diagrama de orbitales moleculares (OM) simplificado para un complejo metálico genérico indicando las transiciones de TCLM en rojo y transiciones $d \rightarrow d$ centradas en el metal en azul, que típicamente se encuentran en el rango de espectro UV-visible.*

Un gran número de los iones de los metales de transición absorben luz en la región del UV-visible. Desde un punto de vista biológico los iones más relevantes son aquellos de las primera y segunda serie de transición, que involucran electrones de orbitales $3d$ y $4d$. La energía de los orbitales d sufre un desdoblamiento dependiente de la geometría del campo de ligandos, ver Figura-25. La diferencia de energía entre los conjuntos de orbitales desdoblados se conoce como fuerzas del campo de ligandos, Δ. De especial interés serán las geometrías tetraédricas para entender propiedades espectroscópicas de los sitios Cu_A tratados en el Capítulo 4.

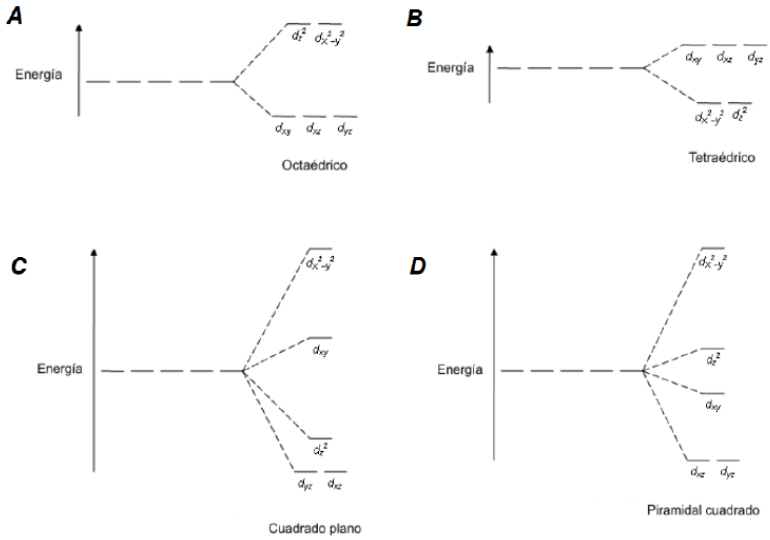


Figura 25: *Algunos ejemplos de desdoblamiento energético del conjunto de orbitales atómicos d en campos octaédricos (**A**), tetraédrico (**B**), cuadrado plano (**C**) y piramidal cuadrado (**D**).*

Las transiciones electrónicas están regidas por lo que se conoce como reglas de selección, que indican cuáles serán las transiciones permitidas, o mejor dicho con mayor probabilidad. La primera de ellas indica que las transiciones serán monoelectrónicas, es decir que cada transición implicará sólo un único electrón. La segunda es la regla de selección de espín que indica que no se pueden cambiar el estado de espín del electrón durante la transición ($\Delta S = 0$). La tercera regla de selección, la regla de Laporte, dice que en una molécula o ión centrosimétrico las transiciones permitidas serán aquellas que involucren un cambio de polaridad ($g \leftrightarrow u$). Si bien estas reglas permiten categorizar las diferentes transiciones posibles, aún así no son absolutas y pueden violarse. Por ejemplo la regla de Laporte prohíbe transiciones $d \rightarrow d$, sin embargo, estas ocurren con una baja probabilidad. Esto se debe a un mecanismo llamado *acoplamiento vibrónico*, en el que las vibraciones moleculares rompen la simetría molecular, y por un breve período de tiempo al molécula no posee un centro de simetría, permitiendo el mezclado de orbitales p y d. Dado que la escala temporal de una vibración, del orden de los $\sim 10^{-13}$ segundos, es mayor que el requerido para que tenga lugar una transición electrónica, del orden de los $\sim 10^{-15}$ segundos, una transición de tipo $d \rightarrow d$ que involucra un orbital con un carácter pd se vuelve permitida, aunque con una baja

intensidad. En una molécula, que no posee un centro simétrico, por ejemplo, una tetraédrica, la mezcla pd puede ocurrir en mayor medida, y por ende la probabilidad de este tipo de transiciones es mayor que en moléculas centrosimétricas. Por esta razón los complejos tetraédricos son más intensamente coloreados que complejos octaédricos. Por otra parte, la regla de selección de espín también puede ser sorteada si existe *acoplamiento espín-órbita*, sin embargo, en los metales de la primera serie de transición ese efecto es leve y las bandas asociadas a transiciones prohibidas por espín son poco intensas.[247,248]

1.4.2- Espectroscopia Raman

Los cambios energéticos detectados en espectroscopias vibracionales son aquellos que son requeridos para generar movimientos nucleares. Si sólo la nube electrónica está involucrada en el proceso de dispersión, los fotones interactuantes serán dispersados sin cambios apreciables en sus frecuencias. Este proceso se llama dispersión Rayleigh (dispersión elástica) y es el dominante en la interacción de luz y materia. Si, por otro lado, durante el proceso de dispersión se inducen movimientos nucleares habrá entonces transferencia de energía del fotón incidente a la molécula o de la molécula al fotón emitido (dispersión inelástica). Este es un fenómeno inherentemente débil y sólo uno de cada $10^6 - 10^8$ fotones participa de dispersión Raman, sin embargo, los métodos modernos permiten su detección sin mayores problemas.[249]

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, rotacionales y vibracionales. 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 genera durante la polarización de la molécula y que es poblado previo a la dispersión inelástica de un fotón. El fotón emitido puede tener mayor o menor energía que el fotón absorbido, y como consecuencia del proceso de absorción-emisión la molécula se encontrará en un estado vibracional distinto al del estado de partida, ver Figura-26. En particular, si el estado de partida es de menor energía que el de llegada el corrimiento se llama de Stokes, si por el contrario el estado de partida es mayor que el de llegada, se llamará de anti-Stokes. Estos corrimientos se presentan con respecto de la frecuencia de excitación. A una dada temperatura habrá ciertas moléculas en estados vibracionales excitados y es esto lo que posibilita la existencia de la señal Raman anti-Stokes. Por otra parte, a una dada temperatura, los estados vibracionales excitados estarán menos poblados que el estado fundamental, lo que hará que naturalmente la intensidad de la señal anti-Stokes sea mucho menos intensa que aquella de Stokes, ver Figura-27.

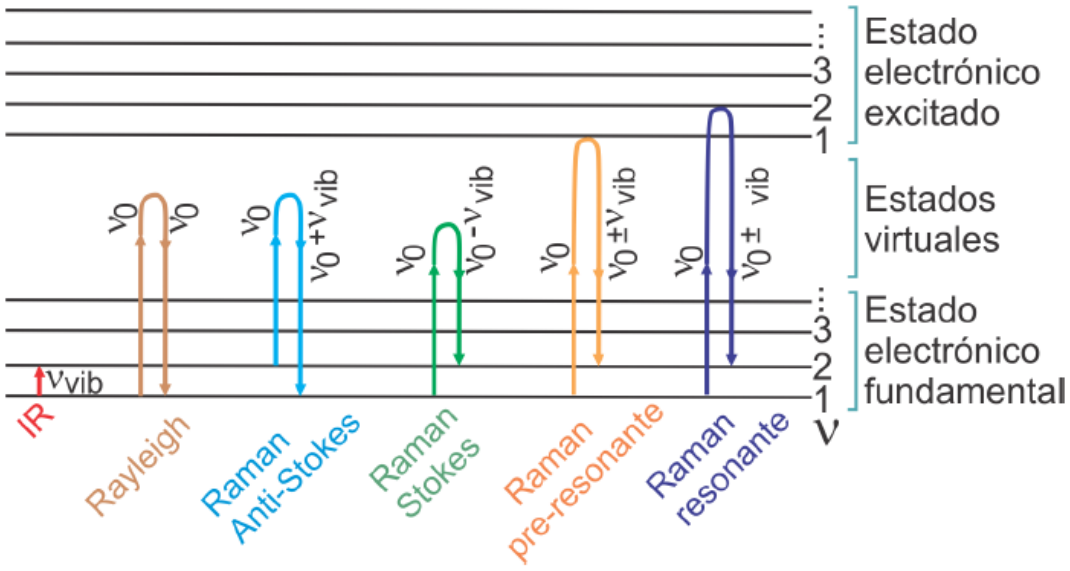


Figura 26: *Representación de los múltiples estados electrónicos con sus correspondientes estados vibracionales, y los estados virtuales. El fenómeno de absorción IR involucra la absorción de un cuanto equivalente a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales. Los diferentes fenómenos dispersivos se clasifican dependiendo de la energía de la radiación dispersada en relación a la radiación incidente, ν_o, y a su vez, según la relación de ν_o con la energía necesaria para promover una transición electrónica (pre-resonancia o resonancia)*

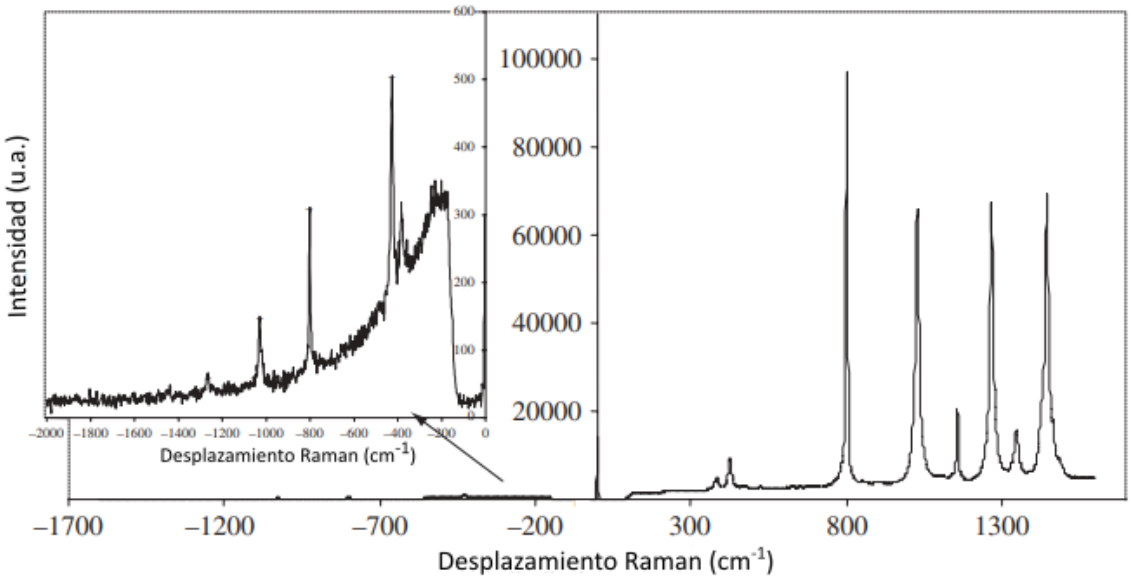


Figura 27: *(Figura adaptada de Smith y Dent 2005)*[249] *Dispersión Raman de Stokes (derecha) y anti-Stokes (izquierda) para una molécula de ciclohexano. En el panel izquierdo se realizó una extensión del espectro anti-Stokes debido a su baja intensidad comparado con el de Stokes.*

Existe una regla de selección básica requerida para que una vibración de una señal Raman activa, y es la siguiente: las vibraciones que causen el mayor cambio en la polarizabilidad de la molécula darán señales más intensas. Típicamente, vibraciones simétricas contribuyen con los cambios más intensos de polarizabilidad y dominan el espectro. Esto contrasta fuertemente con la espectroscopia de absorción infrarroja donde las bandas más intensas son aquellas que cambian el dipolo y, por ende, las vibraciones asimétricas dominan esos espectros. La intensidad total de la luz dispersada resulta proporcional a la polarizabilidad de la molécula, y obedece la siguiente expresión:

$$I_D = \frac{8\pi}{9c^2}\omega_o^4 I_o \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{IF}|^2 \qquad \textbf{Ecuación-26}$$

Donde I_o y ω_o representan la intensidad y la frecuencia de la luz incidente, respectivamente, ρ y σ son dos coordenadas cartesianas de entre $\{x, y, z\}$, c la velocidad de la luz, y α es la polarizabilidad de la molécula. Por lo tanto, como adelantamos líneas más arriba, para que un modo normal sea visible en este tipo de espectroscopia la transición debe producir un cambio en la polarizabilidad de la molécula. Esta es una magnitud tensorial que puede ser expresada como:

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \qquad \textbf{Ecuación-27}$$

Donde se puede asumir que el tensor es simétrico, una aproximación usual en espectroscopia, y entonces cada uno de los componentes puede ser escrito como una expansión en serie alrededor dela geometría de equilibrio:

$$\alpha = \alpha_o + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q}\right)_o Q + \frac{1}{2}\left(\frac{\partial^2\alpha}{\partial Q^2}\right)_o Q^2 + \cdots \qquad \textbf{Ecuación-28}$$

Donde α_o es el valor de equilibrio para el elemento tensorial y Q representa desviaciones del equilibrio a través de una coordenada normal. La primera derivada, $\alpha' = \alpha_o + (\partial\alpha/\partial Q)_o Q$, es responsable de determinar la presencia de vibraciones fundamentales en un espectro Raman. Dicho tensor es el siguiente:

$$\alpha' = \begin{pmatrix} \alpha'_{xx} & \alpha'_{xy} & \alpha'_{xz} \\ \alpha'_{yx} & \alpha'_{yy} & \alpha'_{yz} \\ \alpha'_{zx} & \alpha'_{zy} & \alpha'_{zz} \end{pmatrix} \qquad \textbf{Ecuación-29}$$

Dado que la polarizabilidad es una función respuesta de una molécula a un campo eléctrico externo, la polarizabilidad y sus derivadas son tensores de segundo rango, lo cual significa que para que una transición vibracional pueda ser visible en el espectro Raman es necesario que al menos uno de los seis componentes del tensor Raman sea distinto de cero.

Una descripción más detallada del fenómeno Raman puede hacerse empleando teoría de perturbaciones de segundo orden donde ahora la polarizabilidad se puede expresar en términos de una suma de las contribuciones de las funciones de onda de todos los estados

excitados (virtuales). De este modo es posible llegar a la ecuación de Kramers-Heisenberg-Dirac (KHD):

$$\left(\alpha_{\sigma\rho}\right)_{IF} = \frac{1}{h}\sum_{n=1}\left(\frac{\langle F|m_p|I\rangle\langle I|m_\sigma|G\rangle}{\omega_{GI} - \omega_L + i\Gamma_n} + \frac{\langle I|m_\sigma|G\rangle\langle F|m_\rho|I\rangle}{\omega_{IF} + \omega_L + i\Gamma_n}\right) \qquad \textbf{Ecuación-30}$$

Donde ρ y σ al igual que antes son dos coordenadas cartesianas de entre $\{x, y, z\}$, m es el momento dipolar de la transición, ω_L es la frecuencia del fotón incidente, y G, I y F son los estados vibrónicos inicial (o fundamental), excitado (o virtual) y final. Además ω_{GI} y ω_{IF} son las frecuencias de las transiciones $G \rightarrow I$ e $I \rightarrow F$, y por último, Γ_n es una constante de amortiguamiento que se encuentra relacionada con la vida media del estado excitado n. Las integrales que aparecen en el numerador de la expresión anterior son términos que mezclan las funciones de onda vibracionales inicial y excitada para poder describir la configuración electrónica de la molécula tras interactuar con el fotón. Es importante notar que el estado excitado o virtual es un estado real de la molécula distorsionada, pero como los núcleos no tienen tiempo de alcanzar una posición de equilibrio, en la escala temporal en la que tiene lugar la absorción/emisión, este estado no representa ningún estado de la molécula estática. Entonces, cuando se utiliza esta expresión, el proceso de distorsión queda descrito a través de una mezcla de todos los estados vibrónicos, excitados y fundamentales, para describir el estado de la molécula que sólo existe por un breve instante de tiempo cuando el fotón es absorbido. A partir de esta ecuación se puede visualizar el origen de la intensificación por resonancia, que da lugar a la técnica conocida como Raman resonante. Si observamos en detalle la ecuación KHD podemos notar que cuando la frecuencia del fotón incidente se aproxima a aquella correspondiente a la transición $G \rightarrow I$, el denominador tendería a cero, haciendo divergir la expresión a no ser por el factor de amortiguamiento, Γ_n. Y dado que el término $i\Gamma_n$ es pequeño comparado con las energías ω_{GI} y ω_L, el término crece debido a $i\Gamma_n$ cuando $\omega_L \rightarrow \omega_{GI}$, constituyendo una fuente de intensificación de la señal Raman. Por otra parte, en el segundo término, las energías ω_{GI} y ω_L se están sumando, de modo que el denominador es siempre mayor que aquel del primer término, con lo cual este segundo término contribuye poco en el proceso de polarización, y puede ser despreciado en tratamientos subsiguientes que involucren resonancia. De este modo, en condiciones de resonancia las intensidades Raman de las señales del cromóforos son selectivamente intensificadas en hasta cinco órdenes de magnitud, de modo que sobrepasa cualquier otra señal proveniente del resto de la molécula proteica. [248,249]

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. Esta técnica es, en principio, aplicable a cualquier especie con al menos un electrón desapareado como radicales, tripletes o complejos de metales de transición. Dentro de este último caso se enmarca el estudio de metaloproteínas, donde un espectro de

EPR es capaz de brindar información acerca del detalle de la estructura electrónica y la geometría del sitio, y se empleó como técnica diagnóstica para caracterizar sitios de cobre T1 y Cu_A en sus formas oxidadas.[15,21,250] El fundamento de la técnica de 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 expresión:

$$E = -g\beta_e SB$$

Ecuación-31

Donde E es el cambio de energía del electrón que interactúa con el campo magnético externo de intensidad B, g es el factor de desdoblamiento cuyo valor ronda en torno a 2, β_e es el magnetón de Bohr para un electrón (9,274 10^{-21} 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 con $S = 1/2$, el único caso relevante en esta tesis, la diferencia en los niveles desdoblados por el campo magnético equivale a $\Delta E = g\beta_e B$, lo que implica una proporción de aproximadamente 0,1% mayor de electrones en el nivel estabilizado respecto del nivel desestabilizado, para valores típicos de B (entre 0,1 y 1 Tesla) a temperatura ambiente. La medición de un espectro de EPR implica poblar el estado más energético, para lo cual se aplican microondas que deben cumplir la denominada condición de resonancia:

$$h\nu = g\beta_e B$$

Ecuación-32

Donde $h\nu$ corresponde a un cuanto energético, donde h es la constante de Planck y ν la frecuencia del campo magnético oscilante aplicado para la medición. La condición de resonancia implica que sólo habrá absorción cuando el campo sea tal que valga la igualdad de la ecuación-32. Así, cuanto mayor sea la diferencia en la proporción de las poblaciones en los estados desdoblados, mayor será la absorción del cuanto energético, lo que indica según la ecuación de Boltzmann que la sensibilidad de la técnica aumenta a bajas temperaturas, típicamente entre 4-77 K para metaloproteínas. En la ecuación-32 se ve que ΔE depende tanto de ν como de B, siendo posible obtener un espectro de EPR empleando cualquiera de estos dos parámetros. 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 de EPR constan típicamente del barrido de un determinado rango de valores de B con ν constante, ver Figura-28-A. Si bien los valores de B y ν utilizados en los experimentos dependen de cada caso en particular, típicamente se encuentran entre 0,1 y 1 T y en torno a los 9 GHz (conocida como banda X), respectivamente, para metaloproteínas.

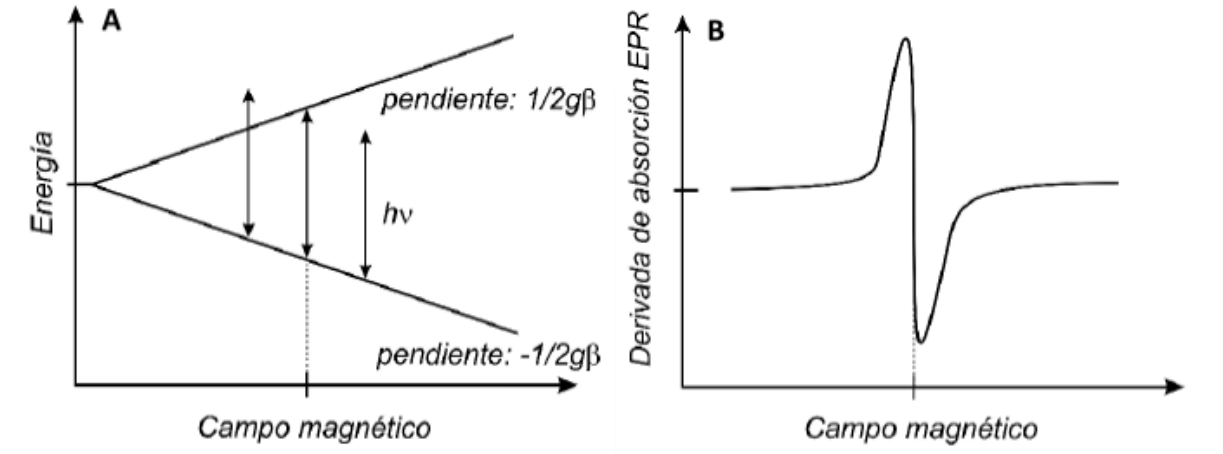


Figura 28: *(Figura adaptada de Que et al)*[248] ***A.*** *Desdoblamiento energético del electrón de S = ½ por su interacción con el campo magnético aplicado. La doble flecha vertical indica el cuanto energético de las microondas, que cumple la condición de resonancia para un único valor de B, y sólo habrá absorción para el caso de la flecha que se encuentra en medio.* ***B.*** *Respuesta de EPR (primera derivada como suele presentarse) para el sistema presentado en A.*

El factor g fue introducido inicialmente en la expresión de μ_e para "corregir" la discrepancia entre el espín magnético que predice la teoría clásica y le medido experimentalmente, que era aproximadamente el doble. Para un electrón libre su valor es g = 2,0023, pero esta magnitud no sólo resulta sensible al detalle estructural y a distinto tipo de interacciones, sino que es altamente anisotrópico. Esta propiedad, consecuencia directa de la interacción espín-órbita, hace al factor g un tensor con nueve componentes, que para los casos de interés biológico pueden reducirse a solo tres rotando el sistema de coordenadas cartesianas. Así, empleando la denominación del sistema de coordenadas principales se definen los tres valores principales de respuesta, g_x, g_y y g_z , que para una molécula en solución, donde no existe ninguna orientación preferencial, responden a la siguiente expresión:

$$g\theta_\varphi = \sqrt{g_x^2 cos^2(\varphi) sen^2(\theta) + g_y^2 sen^2(\varphi) sen^2(\theta) + g_z^2 cos^2(\theta)} \qquad \textbf{Ecuación-33}$$

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 de 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-33 se resuelve de manera numérica para simular el espectro de EPR y, a partir de un ajuste iterativo de un espectro experimental obtener los valores de g_x, g_y y g_z. Los resultados posibles de tales ajustes pueden categorizarse en los siguientes casos: $g_x = g_y = g_z$ (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, los relevantes serán el caso

axial prolato (de ahora en más simplemente axial) y el caso rómbico, Figura-28-B. En estos sistemas se denomina $g_{\parallel}$ al valor de g_z ,mientras que $g_{\perp}$ 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 de 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 externo aplicado (B), su respuesta se desdobla en $0{,}5\ I + 1$ frecuencias. Para el caso particular de un núcleo de cobre ($I = 3/2$), el acoplamiento hiperfino genera un desdoblamiento de la señal de EPR en cuatro señales de igual intensidad (siete señales en el caso de un sitio de Cu_A), con un espaciamiento energético que responde a la *constante de acoplamiento hiperfino* (A), parámetro que también se obtiene a partir de un ajuste de los datos experimentales, Figura-29. Es importante señalar que a pesar de que en algunos casos la estructura hiperfina del espectro de EPR no pueda ser resuelta, los valores de g aún pueden obtenerse con gran precisión.

En esta tesis, se emplearán los espectros de EPR de distintas variantes conteniendo sitios T1 principalmente para evaluar su integridad estructural y evaluar la conservación de las características distintivas de este tipo de centros metálicos. Además, contribuirán en la caracterización estructural y geométrica de este tipo de centros en las proteínas quiméricas.

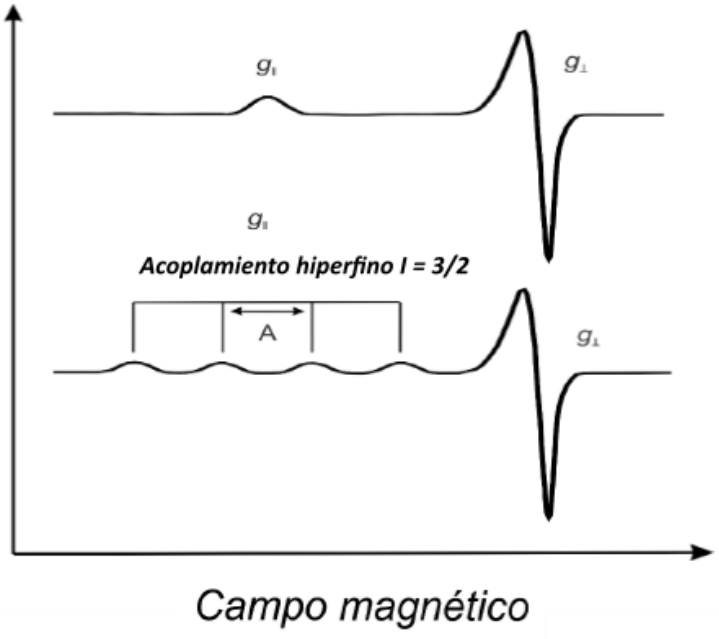


Figura 29: *(Figura adaptada de Que et al)*[248] *Espectros calculados para una respuesta axial sin (arriba) y con (abajo) acoplamiento hiperfino a un núcleo de espín 3/2, como en el caso del cobre.*

1.4.4- Voltametría de corriente alterna (VCA)

La gran diferencia con respecto a la voltametría de corriente continua radica en la forma en la que se perturba el sistema. En la voltametría convencional se realiza una perturbación grande del sistema al aplicar un barrido de potencial llevando al sistema fuera del equilibrio y se observa la señal, la que típicamente es transitoria. Otro enfoque sería perturbar el sistema con una señal alternante de pequeña magnitud y observar como el sistema responde a la perturbación de manera estacionaria, es decir, siempre cerca del equilibrio. Este enfoque trae aparejado dos ventajas principales, (i) dado que la perturbación es pequeña se puede tratar la respuesta de corriente en función del potencial, i-E, del sistema de manera lineal lo que permite simplificar la matemática asociada y (ii) permite realizar medidas sobre una amplia ventana de frecuencias (o temporal) en el rango de 10^{-4} a $10^{6}\ Hz$ (o lo que es equivalente 10^{4} a $10^{-6}\ seg.$). Al trabajar siempre cerca del equilibrio, no es necesario conocer el comportamiento de i-E para rangos amplios de potencial, y esto permite realizar importantes simplificaciones al tratar aspectos cinéticos y difusivos de la respuesta de los sistemas. Sin embargo, esta técnica será empleada estrictamente para especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo de modo que la componente difusional de por si es nula.

En su concepción más elemental el experimento de voltametría de corriente alterna (VCA) es equivalente a un experimento de impedancia electroquímica, usualmente referidos como de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) debido a que usualmente la impedancia medida se grafica en función de una frecuencia. En un experimento VCA el esquema de potencial aplicado sobre electrodo de trabajo consiste en un potencial promedio a corriente continua, E_{DC}, que se va escaneando de manera lenta en el tiempo, al que se suma una onda sinusoidal de potencial a corriente alterna, E_{AC}, cuya amplitud será mucho menor que aquella de E_{DC}, con valores típicamente en el rango de 5-15 mV (perturbación pequeña), ver Figura-30-A. La respuesta registrada es la magnitud de la componente AC de la corriente a la frecuencia de medida. Conforme se incrementa la frecuencia de la perturbación el sistema tiende a responder en menor medida, dado que ahora el orden de magnitud de la perturbación es comparable con el del proceso de TE, esto se traduce en una caída de la señal. Una vez que la frecuencia sea mucho mayor que la velocidad del proceso, es decir, mayor que la k_{TE}, el sistema deja de reaccionar frente a la perturbación y la señal se vuelve nula, ver Figura-30-B. Este es un aspecto esencial para determinar el valor de k_{TE} a través del método desarrollado por Creager y Wooster,[251] tal como se comentará en el siguiente capítulo.

Todos los métodos basados en impedancia faradaica tienden a ser tratados empleando análogos eléctricos sencillos. El caso más utilizado es el circuito de Randles que se presenta en la Figura-30-C. Este circuito consta únicamente de resistencias y capacitores, puntualmente considera dos componentes resistivos, uno debido a la solución y otro debido al proceso de transferencia de carga, R_{sol} y R_{TC}, y dos componentes capacitivos, uno debido a la carga de la doble capa iónica y otra debida al analito adsorbido, C_{DC} y C_{AD}. Los elementos modelados en paralelo son introducidos de esta manera ya que la corriente registrada será debida a dos procesos, la carga de la doble capa (corriente no faradaica, i_{nf}) y el proceso de transferencia

de carga (corriente faradaica, i_f). Los componentes del circuito responden a las siguientes expresiones:

$$C_{DC} = \left(\frac{C}{A}\right) A \qquad \textbf{Ecuación-34}$$

$$C_{AD} = \frac{F^2 A\Gamma}{4RT} \qquad \textbf{Ecuación-35}$$

$$R_{TC} = \frac{2RT}{F^2 A\Gamma k_{TE}^o} = \frac{1}{2C_{AD} k_{TE}^o} \qquad \textbf{Ecuación-36}$$

Donde A indica el área del electrodo, (C/A) indica la capacitancia de la doble capa por unidad de área, Γ indica la concentración superficial del analito adsorbido, y F y R corresponden a la constante de Faraday y de los gases, respectivamente.

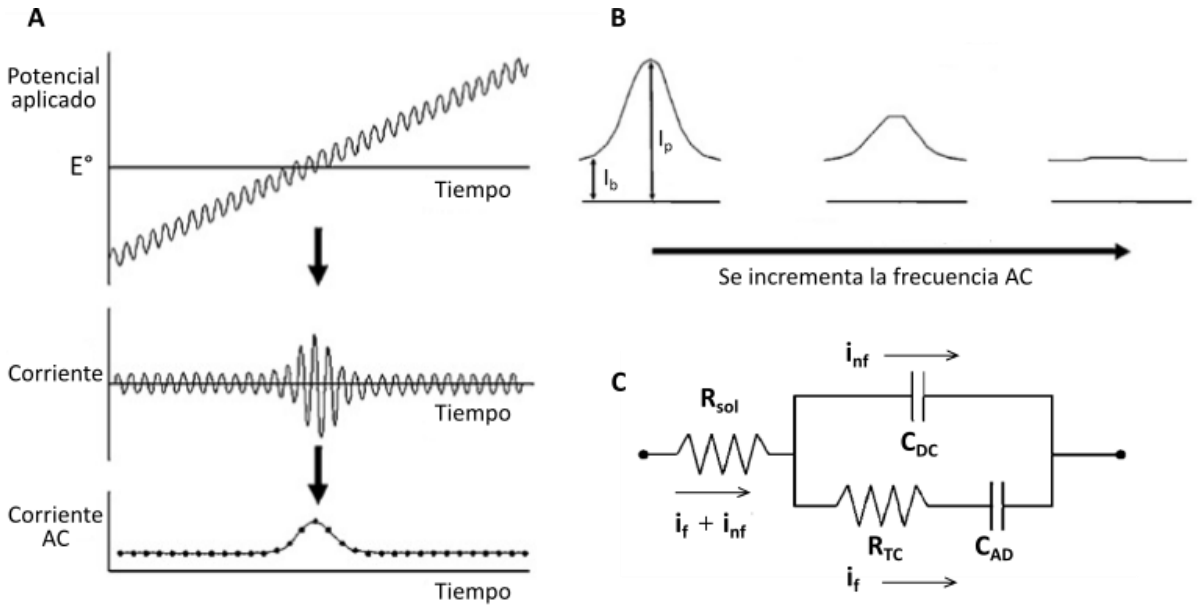


Figura 30: *(Figura adaptada de Eckermann et al 2010)*[252] ***A.*** *Esquema que representa la forma en la que se perturba el sistema en un experimento de voltametría de corriente alterna, y el tipo de respuesta esperada (perfil de corriente y corriente continua).* ***B.*** *Voltagrama en AC indicando los parámetros relevantes, las corrientes de pico y base, I_p y I_b, en función de la frecuencia creciente. Se ve como la corriente tiende a cero al incrementar lo suficiente la frecuencia.* ***C.*** *Circuito equivalente de Randles, indicando sus componentes.*

1.4.5- Cronoamperometría

En un experimento de cronoamperometría típico, se aplica un salto de potencial instantáneo que lleva al sistema a una situación fuera del equilibrio. Sea una reacción de reducción general del tipo: $O + n\,e^- \rightarrow R$, y además consideremos un valor de potencial E_1 como un valor cualquiera en la región de potenciales donde no ocurre un proceso faradaico, es decir, el analito expuesto a ese potencial sobre el electrodo no reacciona. Por otro lado, consideremos valor de potencial E_2 situado en una región de potenciales bajo los cuales la molécula de reactivo en su estado oxidado, O, reacciona tan rápidamente con el electrodo para dar su especie reducida, R, que bajo esa situación la concentración de O es prácticamente cero. Esta última situación se conoce como una *situación controlada por el transporte de masa*, que en este caso en particular es por difusión, entonces se llamará de *control difusional*. Entonces el experimento de cronoamperometría consiste en aplicar un esquema de perturbación como aquel presentado en la Figura-31-A, en el que se el potencial de electrodo se lleva instantáneamente de E_1 a E_2, lo lleva a que las moléculas que se encuentren en las inmediaciones de la superficie del electrodo reaccionen instantáneamente (en la práctica). De esta manera se genera un gradiente de concentración en función de la distancia, Figura-31-B, lo que genera, a su vez, un flujo continuo de reactivo O hacia el electrodo. Conforme pasa el tiempo, el gradiente se hace menos pronunciado y se extiende en dirección al seno de la solución, de modo que cada vez menos reactivo O alcanza la superficie por unidad de tiempo. Dado que la reducción de reactivo O se corresponde con un proceso faradaico, esta es registrada como una corriente catódica y el perfil de corriente en función del tiempo, Figura-31-C, se observa como una curva decreciente con su máximo situado en $t = t_o$, el tiempo en que se instauró el E_2.

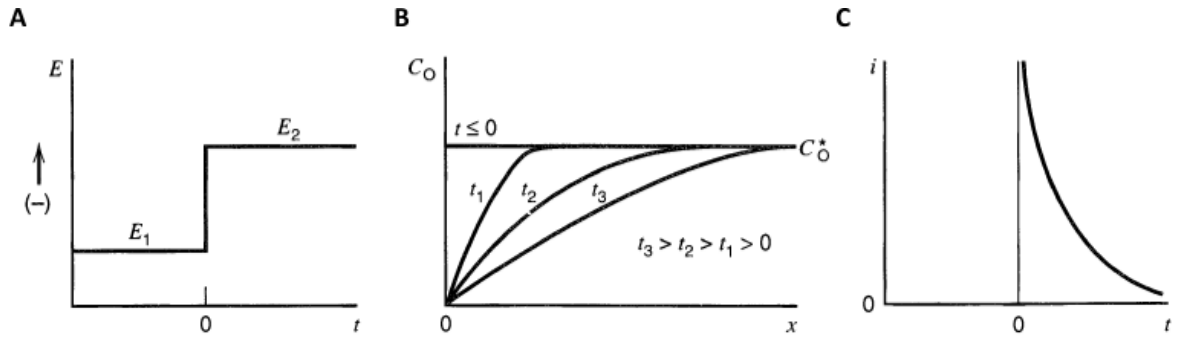


Figura 31: *(Figura adaptada de Bard et al)*[244] ***A.*** *Esquema que representa la forma en la que se perturba el sistema en un experimento de cronoamperometría típico (un único salto de potencial, en este caso hacia potenciales reductores).* ***B.*** *Perfil de concentración superficial en función de la distancia al electrodo a distintos tiempos de aplicado el salto de potencial.* C_o^* *indica la concentración del analito en su estado oxidado en solución.* ***C.*** *Perfil de corriente en función del tiempo.*

Bajo las condiciones anteriormente comentadas, la corriente responderá a la llamada ecuación de Cottrell que relaciona la dependencia temporal de la corriente registrada con el

área del electrodo, A, la concentración del analito en el seno de la solución, C_o^* y su coeficiente de difusión, D_o.

$$i(t) = \frac{n\,F\,A\,D_o^{1/2}\,C_o^*}{\pi^{1/2}\,t^{1/2}} \qquad \textbf{Ecuación-37}$$

1.5-Referencias

[1] J. Liu, S. Chakraborty, P. Hosseinzadeh, Y. Yu, S. Tian, I. Petrik, A. Bhagi, Y. Lu, Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers, Chem. Rev. 114 (2014) 4366–4469. https://doi.org/10.1021/cr400479b.

[2] R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology, Chem. Rev. 96 (1996) 2239–2314. https://doi.org/10.1021/cr9500390.

[3] A. Pyle, Metal ions in the structure and function of RNA, J Biol Inorg Chem. 7 (2002) 679–690. https://doi.org/10.1007/s00775-002-0387-6.

[4] P. Hosseinzadeh, Y. Lu, Design and fine-tuning redox potentials of metalloproteins involved in electron transfer in bioenergetics, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1857 (2016) 557–581. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.08.006.

[5] I.S. MacPherson, M.E.P. Murphy, Type-2 copper-containing enzymes, Cell. Mol. Life Sci. 64 (2007) 2887–2899. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7310-9.

[6] K. Brown, M. Tegoni, M. Prudêncio, A.S. Pereira, S. Besson, J.J. Moura, I. Moura, C. Cambillau, A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase, Nat Struct Mol Biol. 7 (2000) 191–195. https://doi.org/10.1038/73288.

[7] P. Chen, E.I. Solomon, O2 activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms, PNAS. 101 (2004) 13105–13110. https://doi.org/10.1073/pnas.0402114101.

[8] Z. Ma, F.E. Jacobsen, D.P. Giedroc, Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing, Chem. Rev. 109 (2009) 4644–4681. https://doi.org/10.1021/cr900077w.

[9] A.C. Rosenzweig, Copper Delivery by Metallochaperone Proteins, Acc. Chem. Res. 34 (2001) 119–128. https://doi.org/10.1021/ar000012p.

[10] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper Oxidases and Oxygenases, Chem. Rev. 96 (1996) 2563–2606. https://doi.org/10.1021/cr950046o.

[11] C.A. Salgueiro, J.M. Dantas, Multiheme Cytochromes, in: C.A. Salgueiro, J.M. Dantas (Eds.), Multiheme Cytochromes, Springer, Berlin, Heidelberg, 2016: pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-642-44961-1_1.

[12] K.D. Bewley, K.E. Ellis, M.A. Firer-Sherwood, S.J. Elliott, Multi-heme proteins: Nature's electronic multi-purpose tool, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1827 (2013) 938–948. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.03.010.

[13] E.T. Adman, Copper Protein Structures, in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, D.S. Eisenberg (Eds.), Advances in Protein Chemistry, Academic Press, 1991: pp. 145–197. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60536-7.

[14] E.I. Solomon, D.E. Heppner, E.M. Johnston, J.W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, R.G. Hadt, L. Tian, Copper Active Sites in Biology, Chem. Rev. 114 (2014) 3659–3853. https://doi.org/10.1021/cr400327t.

[15] P.M.H. Kroneck, Walking the seven lines: binuclear copper A in cytochrome c oxidase and nitrous oxide reductase, J Biol Inorg Chem. 23 (2018) 27–39. https://doi.org/10.1007/s00775-017-1510-z.

[16] T. Rasmussen, B.C. Berks, J. Sanders-Loehr, D.M. Dooley, W.G. Zumft, A.J. Thomson, The Catalytic Center in Nitrous Oxide Reductase, CuZ, Is a Copper−Sulfide Cluster, Biochemistry. 39 (2000) 12753–12756. https://doi.org/10.1021/bi001811i.

[17] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, Crystal Structure of a Laccase from the FungusTrametes versicolor at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, J. Biol. Chem. 277 (2002) 37663–37669. https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200.

[18] S.M. Jones, E.I. Solomon, Electron transfer and reaction mechanism of laccases, Cell. Mol. Life Sci. 72 (2015) 869–883. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6.

[19] A.M. Nersissian, J.S. Valentine, C. Immoos, M.G. Hill, P.J. Hart, G. Williams, R.G. Herrmann, Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: Plant-specific mononuclear blue copper proteins, Protein Science. 7 (1998) 1915–1929. https://doi.org/10.1002/pro.5560070907.
[20] H.B. Gray, B.G. Malmström, R.J.P. Williams, Copper coordination in blue proteins, J. Biol. Inorg. Chem. 5 (2000) 551–559. https://doi.org/10.1007/s007750000146.
[21] E.I. Solomon, R.K. Szilagyi, S. DeBeer George, L. Basumallick, Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins, Chem. Rev. 104 (2004) 419–458. https://doi.org/10.1021/cr0206317.
[22] E.I. Solomon, R.G. Hadt, Recent advances in understanding blue copper proteins, Coordination Chemistry Reviews. 255 (2011) 774–789. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.008.
[23] I.M.C. van Amsterdam, M. Ubbink, M. van den Bosch, F. Rotsaert, J. Sanders-Loehr, G.W. Canters, A New Type 2 Copper Cysteinate Azurin: INVOLVEMENT OF AN ENGINEERED EXPOSED CYSTEINE IN COPPER BINDING THROUGH INTERNAL REARRANGEMENT *, Journal of Biological Chemistry. 277 (2002) 44121–44130. https://doi.org/10.1074/jbc.M202977200.
[24] G.S. Siluvai, M. Mayfield, M.J. Nilges, S. DeBeer George, N.J. Blackburn, Anatomy of a Red Copper Center: Spectroscopic Identification and Reactivity of the Copper Centers of Bacillus subtilis Sco and Its Cys-to-Ala Variants, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 5215–5226. https://doi.org/10.1021/ja910759v.
[25] R.L. Lieberman, D.M. Arciero, A.B. Hooper, A.C. Rosenzweig, Crystal Structure of a Novel Red Copper Protein from Nitrosomonas europaea, Biochemistry. 40 (2001) 5674–5681. https://doi.org/10.1021/bi0102611.
[26] K.J. Koebke, L. Ruckthong, J.L. Meagher, E. Mathieu, J. Harland, A. Deb, N. Lehnert, C. Policar, C. Tard, J.E. Penner-Hahn, J.A. Stuckey, V.L. Pecoraro, Clarifying the Copper Coordination Environment in a de Novo Designed Red Copper Protein, Inorg. Chem. 57 (2018) 12291–12302. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01989.
[27] C.R. Andrew, H. Yeom, J.S. Valentine, B.G. Karlsson, G. van Pouderoyen, G.W. Canters, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, N. Bonander, Raman Spectroscopy as an Indicator of Cu-S Bond Length in Type 1 and Type 2 Copper Cysteinate Proteins, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 11489–11498. https://doi.org/10.1021/ja00104a032.
[28] D.M. Arciero, B.S. Pierce, M.P. Hendrich, A.B. Hooper, Nitrosocyanin, a Red Cupredoxin-like Protein from Nitrosomonas europaea, Biochemistry. 41 (2002) 1703–1709. https://doi.org/10.1021/bi015908w.
[29] L. Basumallick, R. Sarangi, S. DeBeer George, B. Elmore, A.B. Hooper, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, 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. 127 (2005) 3531–3544. https://doi.org/10.1021/ja044412+.
[30] Y. Lu, E.B. Gralla, J.A. Roe, J.S. Valentine, The redesign of a type 2 into a type 1 copper protein: construction and characterization of yeast copper, zinc superoxide dismutase mutants, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 3560–3562. https://doi.org/10.1021/ja00035a064.
[31] YI LU, L.B. LACROIX, M.D. LOWERY, E.I. SOLOMON, C.J. BENDER, J. PEISACH, J.A. ROE, E.B. GRALLA, J.S. VALENTINE, Construction of a blue copper site at the native zinc site of yeast copper-zinc superoxide dismutase, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 5907–5918.
[32] S. Suzuki, K. Kataoka, K. Yamaguchi, T. Inoue, Y. Kai, Structure–function relationships of copper-containing nitrite reductases, Coordination Chemistry Reviews. 190–192 (1999) 245–265. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00069-7.
[33] S. Suzuki, K. Kataoka, K. Yamaguchi, Metal Coordination and Mechanism of Multicopper Nitrite Reductase, Acc. Chem. Res. 33 (2000) 728–735. https://doi.org/10.1021/ar9900257.
[34] P. Hosseinzadeh, S. Tian, N.M. Marshall, J. Hemp, T. Mullen, M.J. Nilges, Y.-G. Gao, H. Robinson, D.A. Stahl, R.B. Gennis, Y. Lu, A Purple Cupredoxin from Nitrosopumilus maritimus Containing a Mononuclear Type 1 Copper Center with an Open Binding Site, J. Am. Chem. Soc. 138 (2016) 6324–6327. https://doi.org/10.1021/jacs.5b13128.

[35] C. Figueiredo, A.L. De Lacey, M. Pita, Electrochemical studies of galactose oxidase, Electrochemical Science Advances. n/a (n.d.) e2100171. https://doi.org/10.1002/elsa.202100171.
[36] M.S. Rogers, A.J. Baron, M.J. McPherson, P.F. Knowles, D.M. Dooley, Galactose Oxidase Pro-Sequence Cleavage and Cofactor Assembly Are Self-Processing Reactions, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 990–991. https://doi.org/10.1021/ja993385y.
[37] J. Szuster, A.J. Leguto, U.A. Zitare, J.P. Rebechi, A.J. Vila, D.H. Murgida, Electrochemical characterization of an engineered red copper protein featuring an unprecedented entropic control of the reduction potential, Bioelectrochemistry. 146 (2022) 108095. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108095.
[38] H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura, S. Yoshikawa, A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O2 reduction site of fully oxidized cytochrome c oxidase could suppress the proton pump, Proceedings of the National Academy of Sciences. 106 (2009) 2165–2169. https://doi.org/10.1073/pnas.0806391106.
[39] J. Koepke, E. Olkhova, H. Angerer, H. Müller, G. Peng, H. Michel, High resolution crystal structure of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1787 (2009) 635–645. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.04.003.
[40] H. Decker, N. Hellmann, E. Jaenicke, B. Lieb, U. Meissner, J. Markl, Minireview: Recent progress in hemocyanin research, Integrative and Comparative Biology. 47 (2007) 631–644. https://doi.org/10.1093/icb/icm063.
[41] T. Nakamura, H.S. Mason, An electron spin resonance study of copper valence in oxyhemocyanin, Biochemical and Biophysical Research Communications. 3 (1960) 297–299. https://doi.org/10.1016/0006-291X(60)90244-8.
[42] N. Fujieda, T. Ikeda, M. Murata, S. Yanagisawa, S. Aono, K. Ohkubo, S. Nagao, T. Ogura, S. Hirota, S. Fukuzumi, Y. Nakamura, Y. Hata, S. Itoh, Post-Translational His-Cys Cross-Linkage Formation in Tyrosinase Induced by Copper(II)−Peroxo Species, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 1180–1183. https://doi.org/10.1021/ja108280w.
[43] J.P. Klinman, Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates, Chem. Rev. 96 (1996) 2541–2562. https://doi.org/10.1021/cr950047g.
[44] J.P. Klinman, The Copper-Enzyme Family of Dopamine β-Monooxygenase and Peptidylglycine α-Hydroxylating Monooxygenase: Resolving the Chemical Pathway for Substrate Hydroxylation *, Journal of Biological Chemistry. 281 (2006) 3013–3016. https://doi.org/10.1074/jbc.R500011200.
[45] C.R. Hess, M.M. McGuirl, J.P. Klinman, Mechanism of the Insect Enzyme, Tyramine β-Monooxygenase, Reveals Differences from the Mammalian Enzyme, Dopamine β-Monooxygenase *, Journal of Biological Chemistry. 283 (2008) 3042–3049. https://doi.org/10.1074/jbc.M705911200.
[46] T. Skotland, T. Ljones, Direct spectrophotometric detection of ascorbate free radical formed by dopamine β-monooxygenase and by ascorbate oxidase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 630 (1980) 30–35. https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90134-8.
[47] E.J. Diliberto, P.L. Allen, Mechanism of dopamine-beta-hydroxylation. Semidehydroascorbate as the enzyme oxidation product of ascorbate, J Biol Chem. 256 (1981) 3385–3393.
[48] S.T. Prigge, A.S. Kolhekar, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, Amidation of Bioactive Peptides: The Structure of Peptidylglycine α-Hydroxylating Monooxygenase, Science. 278 (1997) 1300–1305. https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1300.
[49] P. Chen, J. Bell, B.A. Eipper, E.I. Solomon, Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α-Hydroxylating Monooxygenase. Spectroscopic Definition of the Resting Sites and the Putative CuIIM−OOH Intermediate, Biochemistry. 43 (2004) 5735–5747. https://doi.org/10.1021/bi0362830.
[50] M.C. Brenner, J.P. Klinman, Correlation of copper valency with product formation in single turnovers of dopamine beta-monooxygenase, Biochemistry. 28 (1989) 4664–4670. https://doi.org/10.1021/bi00437a023.

[51] S. Larsson, B. Källebring, P. Wittung, B.G. Malmström, The CuA center of cytochrome-c oxidase: electronic structure and spectra of models compared to the properties of CuA domains, PNAS. 92 (1995) 7167–7171. https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7167.
[52] N.J. Blackburn, M.E. Barr, W.H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 A copper-copper bond in the CuA center of cytochrome oxidase, Biochemistry. 33 (1994) 10401–10407. https://doi.org/10.1021/bi00200a022.
[53] D.R. Gamelin, D.W. Randall, M.T. Hay, R.P. Houser, T.C. Mulder, G.W. Canters, S. de Vries, W.B. Tolman, Y. Lu, E.I. Solomon, Spectroscopy of Mixed-Valence CuA-Type Centers: Ligand-Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 5246–5263. https://doi.org/10.1021/ja973161k.
[54] M.B. Robin, P. Day, Mixed Valence Chemistry-A Survey and Classification, in: H.J. Emeléus, A.G. Sharpe (Eds.), Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry, Academic Press, 1968: pp. 247–422. https://doi.org/10.1016/S0065-2792(08)60179-X.
[55] E.I. Solomon, X. Xie, A. Dey, Mixed valent sites in biological electron transfer, Chem. Soc. Rev. 37 (2008) 623–638. https://doi.org/10.1039/B714577M.
[56] M.N. Morgada, L.A. Abriata, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, D.H. Murgida, A.J. Vila, Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations, Angewandte Chemie International Edition. 53 (2014) 6188–6192. https://doi.org/10.1002/anie.201402083.
[57] M.O. Ross, O.S. Fisher, M.N. Morgada, M.D. Krzyaniak, M.R. Wasielewski, A.J. Vila, B.M. Hoffman, A.C. Rosenzweig, Formation and electronic structure of an atypical CuA site, J. Am. Chem. Soc. (2019). https://doi.org/10.1021/jacs.8b13610.
[58] C.E. Slutter, D. Sanders, P. Wittung, B.G. Malmström, R. Aasa, J.H. Richards, H.B. Gray, J.A. Fee, Water-Soluble, Recombinant CuA-Domain of the Cytochrome ba3 Subunit II from Thermus thermophilus, Biochemistry. 35 (1996) 3387–3395. https://doi.org/10.1021/bi9525839.
[59] P.A. Williams, N.J. Blackburn, D. Sanders, H. Bellamy, E.A. Stura, J.A. Fee, D.E. McRee, The Cu A domain of Thermus thermophilus ba 3 -type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution, Nat Struct Mol Biol. 6 (1999) 509–516. https://doi.org/10.1038/9274.
[60] T. Bertrand, C. Jolivalt, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougin, Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics, Biochemistry. 41 (2002) 7325–7333. https://doi.org/10.1021/bi0201318.
[61] F.J. Enguita, D. Marçal, L.O. Martins, R. Grenha, A.O. Henriques, P.F. Lindley, M.A. Carrondo, Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from Bacillus subtilis*, Journal of Biological Chemistry. 279 (2004) 23472–23476. https://doi.org/10.1074/jbc.M314000200.
[62] A.B. Taylor, C.S. Stoj, L. Ziegler, D.J. Kosman, P.J. Hart, The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p, Proceedings of the National Academy of Sciences. 102 (2005) 15459–15464. https://doi.org/10.1073/pnas.0506227102.
[63] I. Bento, C. Peixoto, V.N. Zaitsev, P.F. Lindley, Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites, Acta Cryst D. 63 (2007) 240–248. https://doi.org/10.1107/S090744490604947X.
[64] J.P. Kallio, S. Auer, J. Jänis, M. Andberg, K. Kruus, J. Rouvinen, A. Koivula, N. Hakulinen, Structure–Function Studies of a Melanocarpus albomyces Laccase Suggest a Pathway for Oxidation of Phenolic Compounds, Journal of Molecular Biology. 392 (2009) 895–909. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.053.
[65] T. HALTIA, K. BROWN, M. TEGONI, C. CAMBILLAU, M. SARASTE, K. MATTILA, K. DJINOVIC-CARUGO, Crystal structure of nitrous oxide reductase from Paracoccus denitrificans at 1.6 A resolution, Biochemical Journal. 369 (2003) 77–88. https://doi.org/10.1042/bj20020782.
[66] K. Paraskevopoulos, S.V. Antonyuk, R.G. Sawers, R.R. Eady, S.S. Hasnain, Insight into Catalysis of Nitrous Oxide Reductase from High-resolution Structures of Resting and Inhibitor-bound Enzyme from Achromobacter cycloclastes, Journal of Molecular Biology. 362 (2006) 55–65. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.064.

[67] A. Pomowski, W.G. Zumft, P.M.H. Kroneck, O. Einsle, N2O binding at a [4Cu:2S] copper–sulphur cluster in nitrous oxide reductase, Nature. 477 (2011) 234–237. https://doi.org/10.1038/nature10332.
[68] S.I. Gorelsky, S. Ghosh, E.I. Solomon, Mechanism of N2O Reduction by the μ4-S Tetranuclear CuZ Cluster of Nitrous Oxide Reductase, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 278–290. https://doi.org/10.1021/ja055856o.
[69] C. Zhang, T.C. Hollocher, The reaction of reduced cytochromes c with nitrous oxide reductase of Wolinella succinogenes, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1142 (1993) 253–261. https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90153-7.
[70] M. Koutný, I. Kučera, R. Tesařík, J. Turánek, R.J.M. Van Spanning, Pseudoazurin mediates periplasmic electron flow in a mutant strain of Paracoccus denitrificans lacking cytochrome c550, FEBS Letters. 448 (1999) 157–159. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00345-2.
[71] J.W.B. Moir, S.J.Y. 1994 Ferguson, Properties of a Paracoccus denitrificans mutant deleted in cytochrome c550 indicate that a copper protein can substitute for this cytochrome in electron transport to nitrite, nitric oxide and nitrous oxide, Microbiology. 140 (n.d.) 389–397. https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-389.
[72] T. Rasmussen, T. Brittain, B. C. Berks, N. J. Watmough, A. J. Thomson, Formation of a cytochrome c – nitrous oxide reductase complex is obligatory for N 2 O reduction by Paracoccus pantotrophus, Dalton Transactions. 0 (2005) 3501–3506. https://doi.org/10.1039/B501846C.
[73] N. Hakulinen, J. Rouvinen, Three-dimensional structures of laccases, Cell. Mol. Life Sci. 72 (2015) 857–868. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5.
[74] W.G. Scott, Ribozymes, Current Opinion in Structural Biology. 17 (2007) 280–286. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.05.003.
[75] T.R. Cech, Ribozymes, the first 20 years, Biochemical Society Transactions. 30 (2002) 1162–1166. https://doi.org/10.1042/bst0301162.
[76] J.A. Doudna, T.R. Cech, The chemical repertoire of natural ribozymes, Nature. 418 (2002) 222–228. https://doi.org/10.1038/418222a.
[77] X. Xie, S.I. Gorelsky, R. Sarangi, D.K. Garner, H.J. Hwang, K.O. Hodgson, B. Hedman, Y. Lu, E.I. Solomon, Perturbations to the Geometric and Electronic Structure of the CuA Site: Factors that Influence Delocalization and Their Contributions to Electron Transfer, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 5194–5205. https://doi.org/10.1021/ja7102668.
[78] G.N. Ledesma, D.H. Murgida, H.K. Ly, H. Wackerbarth, J. Ulstrup, A.J. Costa-Filho, A.J. Vila, The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in CuA Sites, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 11884–11885. https://doi.org/10.1021/ja0731221.
[79] H.J. Hwang, S.M. Berry, M.J. Nilges, Y. Lu, Axial Methionine Has Much Less Influence on Reduction Potentials in a CuA Center than in a Blue Copper Center, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 7274–7275. https://doi.org/10.1021/ja0501114.
[80] N.M. Marshall, D.K. Garner, T.D. Wilson, Y.-G. Gao, H. Robinson, M.J. Nilges, Y. Lu, Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range, Nature. 462 (2009) 113–116. https://doi.org/10.1038/nature08551.
[81] P. Hosseinzadeh, N.M. Marshall, K.N. Chacón, Y. Yu, M.J. Nilges, S.Y. New, S.A. Tashkov, N.J. Blackburn, Y. Lu, Design of a single protein that spans the entire 2-V range of physiological redox potentials, PNAS. 113 (2016) 262–267. https://doi.org/10.1073/pnas.1515897112.
[82] S.M. Berry, M.H. Baker, N.J. Reardon, Reduction potential variations in azurin through secondary coordination sphere phenylalanine incorporations, Journal of Inorganic Biochemistry. 104 (2010) 1071–1078. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.06.004.
[83] S.Y. New, N.M. Marshall, T.S.A. Hor, F. Xue, Y. Lu, Redox tuning of two biological copper centers through non-covalent interactions: same trend but different magnitude, Chem. Commun. 48 (2012) 4217–4219. https://doi.org/10.1039/C2CC30901G.
[84] J. Szuster, U.A. Zitare, M.A. Castro, A.J. Leguto, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, CuA-based chimeric T1 copper sites allow for independent modulation of reorganization energy and reduction potential, Chem. Sci. (2020). https://doi.org/10.1039/D0SC01620A.

[85] R.F. Abdelhamid, Y. Obara, Y. Uchida, T. Kohzuma, D.M. Dooley, D.E. Brown, H. Hori, π–π interaction between aromatic ring and copper-coordinated His81 imidazole regulates the blue copper active-site structure, J Biol Inorg Chem. 12 (2007) 165–173. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0176-8.
[86] S. Yanagisawa, K. Sato, M. Kikuchi, T. Kohzuma, C. Dennison, Introduction of a π–π Interaction at the Active Site of a Cupredoxin: Characterization of the Met16Phe Pseudoazurin Mutant, Biochemistry. 42 (2003) 6853–6862. https://doi.org/10.1021/bi030030p.
[87] K. Kataoka, K. Yamaguchi, S. Sakai, K. Takagi, S. Suzuki, Characterization and function of Met150Gln mutant of copper-containing nitrite reductase from Achromobacter cycloclastes IAM1013, Biochemical and Biophysical Research Communications. 303 (2003) 519–524. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00381-4.
[88] M. Choi, N. Sukumar, A. Liu, V.L. Davidson, Defining the Role of the Axial Ligand of the Type 1 Copper Site in Amicyanin by Replacement of Methionine with Leucine, Biochemistry. 48 (2009) 9174–9184. https://doi.org/10.1021/bi900836h.
[89] C.J. Carrell, J.K. Ma, W.E. Antholine, J.P. Hosler, F.S. Mathews, V.L. Davidson, Generation of Novel Copper Sites by Mutation of the Axial Ligand of Amicyanin. Atomic Resolution Structures and Spectroscopic Properties, Biochemistry. 46 (2007) 1900–1912. https://doi.org/10.1021/bi0619674.
[90] J.F. Hall, L.D. Kanbi, R.W. Strange, S.S. Hasnain, Role of the Axial Ligand in Type 1 Cu Centers Studied by Point Mutations of Met148 in Rusticyanin, Biochemistry. 38 (1999) 12675–12680. https://doi.org/10.1021/bi990983g.
[91] L.J.C. Jeuken, P. van Vliet, M.Ph. Verbeet, R. Camba, J.P. McEvoy, F.A. Armstrong, G.W. Canters, Role of the Surface-Exposed and Copper-Coordinating Histidine in Blue Copper Proteins: The Electron-Transfer and Redox-Coupled Ligand Binding Properties of His117Gly Azurin, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 12186–12194. https://doi.org/10.1021/ja0006144.
[92] J.D. King, L. Harrington, B.M. Lada, G. He, J.W. Cooley, R.E. Blankenship, Site-directed mutagenesis of the highly perturbed copper site of auracyanin D, Archives of Biochemistry and Biophysics. 564 (2014) 237–243. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.10.003.
[93] S. DeBeer George, L. Basumallick, R.K. Szilagyi, D.W. Randall, M.G. Hill, A.M. Nersissian, J.S. Valentine, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, Spectroscopic Investigation of Stellacyanin Mutants: Axial Ligand Interactions at the Blue Copper Site, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 11314–11328. https://doi.org/10.1021/ja035802j.
[94] F. Xu, A.E. Palmer, D.S. Yaver, R.M. Berka, G.A. Gambetta, S.H. Brown, E.I. Solomon, Targeted Mutations in a Trametes villosa Laccase AXIAL PERTURBATIONS OF THE T1 COPPER, J. Biol. Chem. 274 (1999) 12372–12375. https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12372.
[95] C.A.P. Libeu, M. Kukimoto, M. Nishiyama, S. Horinouchi, E.T. Adman, Site-Directed Mutants of Pseudoazurin: Explanation of Increased Redox Potentials from X-ray Structures and from Calculation of Redox Potential Differences, Biochemistry. 36 (1997) 13160–13179. https://doi.org/10.1021/bi9704111.
[96] S. Yanagisawa, M.J. Banfield, C. Dennison, The Role of Hydrogen Bonding at the Active Site of a Cupredoxin: The Phe114Pro Azurin Variant, Biochemistry. 45 (2006) 8812–8822. https://doi.org/10.1021/bi0606851.
[97] Y. Lu, N. Yeung, N. Sieracki, N.M. Marshall, Design of functional metalloproteins, Nature. 460 (2009) 855–862. https://doi.org/10.1038/nature08304.
[98] R. David, M.P.O. Richter, A.G. Beck-Sickinger, Expressed protein ligation, European Journal of Biochemistry. 271 (2004) 663–677. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03978.x.
[99] L. Berrade, J.A. Camarero, Expressed protein ligation: a resourceful tool to study protein structure and function, Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 3909. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0122-3.
[100] R.M. Hofmann, T.W. Muir, Recent advances in the application of expressed protein ligation to protein engineering, Current Opinion in Biotechnology. 13 (2002) 297–303. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00326-9.
[101] T.W. Muir, Semisynthesis of Proteins by Expressed Protein Ligation, Annual Review of Biochemistry. 72 (2003) 249–289. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161900.

[102] D.W. Low, M.G. Hill, Rational Fine-Tuning of the Redox Potentials in Chemically Synthesized Rubredoxins, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 11536–11537. https://doi.org/10.1021/ja982920b.
[103] S.M. Berry, M. Ralle, D.W. Low, N.J. Blackburn, Y. Lu, Probing the Role of Axial Methionine in the Blue Copper Center of Azurin with Unnatural Amino Acids, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 8760–8768. https://doi.org/10.1021/ja029699u.
[104] D.K. Garner, M.D. Vaughan, H.J. Hwang, M.G. Savelieff, S.M. Berry, J.F. Honek, Y. Lu, 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. 128 (2006) 15608–15617. https://doi.org/10.1021/ja062732i.
[105] K. M. Clark, S. Tian, W.A. van der Donk, Y. Lu, Probing the role of the backbone carbonyl interaction with the Cu A center in azurin by replacing the peptide bond with an ester linkage, Chemical Communications. 53 (2017) 224–227. https://doi.org/10.1039/C6CC07274G.
[106] K.M. Clark, Y. Yu, N.M. Marshall, N.A. Sieracki, M.J. Nilges, N.J. Blackburn, W.A. van der Donk, Y. Lu, 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. 132 (2010) 10093–10101. https://doi.org/10.1021/ja102632p.
[107] J.S. Valentine, P.A. Doucette, S. Zittin Potter, Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis, Annual Review of Biochemistry. 74 (2005) 563–593. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647.
[108] F.L. Sousa, R.J. Alves, M.A. Ribeiro, J.B. Pereira-Leal, M. Teixeira, M.M. Pereira, The superfamily of heme–copper oxygen reductases: Types and evolutionary considerations, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1817 (2012) 629–637. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.09.020.
[109] F.J. Stevens, Homology versus analogy: possible evolutionary relationship of immunoglobulins, cupredoxins, and Cu,Zn-superoxide dismutase, Journal of Molecular Recognition. 21 (2008) 20–29. https://doi.org/10.1002/jmr.861.
[110] F.D. Rienzo, R.R. Gabdoulline, M.C. Menziani, R.C. Wade, Blue copper proteins: A comparative analysis of their molecular interaction properties, Protein Science. 9 (2000) 1439–1454. https://doi.org/10.1110/ps.9.8.1439.
[111] C. Dennison, Investigating the structure and function of cupredoxins, Coordination Chemistry Reviews. 249 (2005) 3025–3054. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.021.
[112] M. Hay, J.H. Richards, Y. Lu, Construction and characterization of an azurin analog for the purple copper site in cytochrome c oxidase, PNAS. 93 (1996) 461–464. https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.461.
[113] M.G. Savelieff, Y. Lu, CuA centers and their biosynthetic models in azurin, J Biol Inorg Chem. 15 (2010) 461–483. https://doi.org/10.1007/s00775-010-0625-2.
[114] X. Wang, M.C. Ang, Y. Lu, Kinetics of Copper Incorporation into an Engineered Purple Azurin, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 2947–2948. https://doi.org/10.1021/ja982636k.
[115] M.T. Hay, Y. Lu, Metal-binding properties of an engineered purple CuA center in azurin, J. Biol. Inorg. Chem. 5 (2000) 699–712. https://doi.org/10.1007/s007750000158.
[116] M.T. Hay, R.M. Milberg, Y. Lu, Preparation and Characterization of Mercury and Silver Derivatives of an Engineered Purple Copper Center in Azurin, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 11976–11977. https://doi.org/10.1021/ja962280h.
[117] H.J. Hwang, N. Nagraj, Y. Lu, Spectroscopic Characterizations of Bridging Cysteine Ligand Variants of an Engineered Cu2(SCys)2 CuA Azurin, Inorg. Chem. 45 (2006) 102–107. https://doi.org/10.1021/ic051375u.
[118] M.G. Savelieff, Y. Lu, pH dependent copper binding properties of a CuA azurin variant with both bridging cysteines replaced with serines, Inorganica Chimica Acta. 361 (2008) 1087–1094. https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.08.007.
[119] X. Wang, S.M. Berry, Y. Xia, Y. Lu, The Role of Histidine Ligands in the Structure of Purple CuA Azurin, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 7449–7450. https://doi.org/10.1021/ja991304s.
[120] S.M. Berry, X. Wang, Y. Lu, Ligand replacement study at the His120 site of purple CuA azurin, Journal of Inorganic Biochemistry. 78 (2000) 89–95. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00214-7.

[121] O. Farver, Y. Lu, M.C. Ang, I. Pecht, Enhanced rate of intramolecular electron transfer in an engineered purple CuA azurin, PNAS. 96 (1999) 899–902. https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.899.
[122] O. Farver, H.J. Hwang, Y. Lu, I. Pecht, Reorganization Energy of the CuA Center in Purple Azurin: Impact of the Mixed Valence-to-Trapped Valence State Transition, J. Phys. Chem. B. 111 (2007) 6690–6694. https://doi.org/10.1021/jp0672555.
[123] H.J. Hwang, Y. Lu, pH-dependent transition between delocalized and trapped valence states of a CuA center and its possible role in proton-coupled electron transfer, PNAS. 101 (2004) 12842–12847. https://doi.org/10.1073/pnas.0403473101.
[124] C. Dennison, E. Vijgenboom, S. de Vries, J. van der Oost, G.W. Canters, Introduction of a CuA site into the blue copper protein amicyanin from Thiobacillus versutus, FEBS Letters. 365 (1995) 92–94. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00429-D.
[125] L.H. Jones, A. Liu, V.L. Davidson, An Engineered CuA Amicyanin Capable of Intermolecular Electron Transfer Reactions, J. Biol. Chem. 278 (2003) 47269–47274. https://doi.org/10.1074/jbc.M308863200.
[126] J. van der Oost, P. Lappalainen, A. Musacchio, A. Warne, L. Lemieux, J. Rumbley, R. b. Gennis, R. Aasa, T. Pascher, B. g. Malmström, 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., The EMBO Journal. 11 (1992) 3209–3217. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05398.x.
[127] E.N. Mirts, S.A. Dikanov, A. Jose, E.I. Solomon, Y. Lu, A Binuclear CuA Center Designed in an All α-Helical Protein Scaffold, J. Am. Chem. Soc. 142 (2020) 13779–13794. https://doi.org/10.1021/jacs.0c04226.
[128] D. Shiga, Y. Funahashi, H. Masuda, A. Kikuchi, M. Noda, S. Uchiyama, K. Fukui, K. Kanaori, K. Tajima, Y. Takano, H. Nakamura, M. Kamei, T. Tanaka, Creation of a Binuclear Purple Copper Site within a de Novo Coiled-Coil Protein, Biochemistry. 51 (2012) 7901–7907. https://doi.org/10.1021/bi3007884.
[129] C. Dennison, The role of ligand-containing loops at copper sites in proteins, Natural Product Reports. 25 (2008) 15–24. https://doi.org/10.1039/B707987G.
[130] C. Dennison, Ligand and loop variations at type 1 copper sites: influence on structure and reactivity, Dalton Trans. (2005) 3436–3442. https://doi.org/10.1039/B507440C.
[131] S. Yanagisawa, C. Dennison, Loop-Contraction Mutagenesis of Type 1 Copper Sites, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 15711–15719. https://doi.org/10.1021/ja047295r.
[132] C. Li, M.J. Banfield, C. Dennison, Engineering Copper Sites in Proteins: Loops Confer Native Structures and Properties to Chimeric Cupredoxins, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 709–718. https://doi.org/10.1021/ja0661562.
[133] C. Li, S. Yanagisawa, B.M. Martins, A. Messerschmidt, M.J. Banfield, C. Dennison, Basic requirements for a metal-binding site in a protein: The influence of loop shortening on the cupredoxin azurin, PNAS. 103 (2006) 7258–7263. https://doi.org/10.1073/pnas.0600774103.
[134] C. Buning, G.W. Canters, P. Comba, C. Dennison, L. Jeuken, M. Melter, J. Sanders-Loehr, Loop-Directed Mutagenesis of the Blue Copper Protein Amicyanin from Paracoccus versutus and Its Effect on the Structure and the Activity of the Type-1 Copper Site, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 204–211. https://doi.org/10.1021/ja992796b.
[135] C. Dennison, E. Vijgenboom, W.R. Hagen, G.W. Canters, Loop-Directed Mutagenesis Converts Amicyanin from Thiobacillus versutus into a Novel Blue Copper Protein, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 7406–7407. https://doi.org/10.1021/ja953256r.
[136] R. Remenyi, L.J.C. Jeuken, P. Comba, G.W. Canters, An amicyanin C-terminal loop mutant where the active-site histidine donor cannot be protonated, J. Biol. Inorg. Chem. 6 (2001) 23–26. https://doi.org/10.1007/s007750000178.
[137] K. Sato, S.J. Firbank, C. Li, M.J. Banfield, C. Dennison, The Importance of the Long Type 1 Copper-Binding Loop of Nitrite Reductase for Structure and Function, Chemistry – A European Journal. 14 (2008) 5820–5828. https://doi.org/10.1002/chem.200701997.
[138] S. Yanagisawa, C. Dennison, Loop-Contraction Mutagenesis of a Type 1 Copper Site, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 4974–4975. https://doi.org/10.1021/ja0345827.
[139] K. Sato, C. Li, I. Salard, A.J. Thompson, M.J. Banfield, C. Dennison, Metal-binding loop length and not sequence dictates structure, PNAS. 106 (2009) 5616–5621. https://doi.org/10.1073/pnas.0811324106.

[140] G. Battistuzzi, M. Borsari, G.W. Canters, G. di Rocco, E. de Waal, Y. Arendsen, A. Leonardi, A. Ranieri, M. Sola, Ligand Loop Effects on the Free Energy Change of Redox and pH-Dependent Equilibria in Cupredoxins Probed on Amicyanin Variants, Biochemistry. 44 (2005) 9944–9949. https://doi.org/10.1021/bi050261r.
[141] M. Velarde, R. Huber, S. Yanagisawa, C. Dennison, A. Messerschmidt, Influence of Loop Shortening on the Metal Binding Site of Cupredoxin Pseudoazurin, Biochemistry. 46 (2007) 9981–9991. https://doi.org/10.1021/bi701113w.
[142] L. Paltrinieri, M. Borsari, G. Battistuzzi, M. Sola, C. Dennison, B.L. de Groot, S. Corni, C.A. Bortolotti, How the Dynamics of the Metal-Binding Loop Region Controls the Acid Transition in Cupredoxins, Biochemistry. 52 (2013) 7397–7404. https://doi.org/10.1021/bi400860n.
[143] G. Battistuzzi, M. Borsari, C. Dennison, C. Li, A. Ranieri, M. Sola, S. Yanagisawa, Active site loop dictates the thermodynamics of reduction and ligand protonation in cupredoxins, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1794 (2009) 995–1000. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.001.
[144] S.M. Berry, E.L. Bladholm, E.J. Mostad, A.R. Schenewerk, Incorporation of the red copper nitrosocyanin binding loop into blue copper azurin, J Biol Inorg Chem. 16 (2011) 473–480. https://doi.org/10.1007/s00775-010-0746-7.
[145] Y. Yu, I.D. Petrik, K.N. Chacón, P. Hosseinzadeh, H. Chen, N.J. Blackburn, Y. Lu, Effect of circular permutation on the structure and function of type 1 blue copper center in azurin, Protein Science. 26 (2017) 218–226. https://doi.org/10.1002/pro.3071.
[146] A. Espinoza-Cara, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, S. Klinke, L.H. Otero, D.H. Murgida, A.J. Vila, Engineering a bifunctional copper site in the cupredoxin fold by loop-directed mutagenesis, Chem. Sci. 9 (2018) 6692–6702. https://doi.org/10.1039/C8SC01444B.
[147] W.F. DeGrado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastri, A. Lombardi, De Novo Design and Structural Characterization of Proteins and Metalloproteins, Annual Review of Biochemistry. 68 (1999) 779–819. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.779.
[148] P.-S. Huang, S.E. Boyken, D. Baker, The coming of age of de novo protein design, Nature. 537 (2016) 320–327. https://doi.org/10.1038/nature19946.
[149] D. Baker, What has de novo protein design taught us about protein folding and biophysics?, Protein Science. 28 (2019) 678–683. https://doi.org/10.1002/pro.3588.
[150] Z. Du, H. Su, W. Wang, L. Ye, H. Wei, Z. Peng, I. Anishchenko, D. Baker, J. Yang, The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction, Nat Protoc. 16 (2021) 5634–5651. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9.
[151] F. Richter, A. Leaver-Fay, S.D. Khare, S. Bjelic, D. Baker, De Novo Enzyme Design Using Rosetta3, PLOS ONE. 6 (2011) e19230. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019230.
[152] R.A. Langan, S.E. Boyken, A.H. Ng, J.A. Samson, G. Dods, A.M. Westbrook, T.H. Nguyen, M.J. Lajoie, Z. Chen, S. Berger, V.K. Mulligan, J.E. Dueber, W.R.P. Novak, H. El-Samad, D. Baker, De novo design of bioactive protein switches, Nature. 572 (2019) 205–210. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1432-8.
[153] G. Bhardwaj, V.K. Mulligan, C.D. Bahl, J.M. Gilmore, P.J. Harvey, O. Cheneval, G.W. Buchko, S.V.S.R.K. Pulavarti, Q. Kaas, A. Eletsky, P.-S. Huang, W.A. Johnsen, P.J. Greisen, G.J. Rocklin, Y. Song, T.W. Linsky, A. Watkins, S.A. Rettie, X. Xu, L.P. Carter, R. Bonneau, J.M. Olson, E. Coutsias, C.E. Correnti, T. Szyperski, D.J. Craik, D. Baker, Accurate de novo design of hyperstable constrained peptides, Nature. 538 (2016) 329–335. https://doi.org/10.1038/nature19791.
[154] I.V. Korendovych, W.F. DeGrado, De novo protein design, a retrospective, Quarterly Reviews of Biophysics. 53 (2020). https://doi.org/10.1017/S0033583519000131.
[155] J.W. Bryson, S.F. Betz, H.S. Lu, D.J. Suich, H.X. Zhou, K.T. O'Neil, W.F. DeGrado, Protein Design: A Hierarchic Approach, Science. 270 (1995) 935–941. https://doi.org/10.1126/science.270.5238.935.
[156] A. Lombardi, F. Pirro, O. Maglio, M. Chino, W.F. DeGrado, De Novo Design of Four-Helix Bundle Metalloproteins: One Scaffold, Diverse Reactivities, Acc. Chem. Res. 52 (2019) 1148–1159. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00674.

[157] C. Ct, L. Jd, N. Mj, D. Pl, R. De, D. Wf, Design of a Heme-Binding 4-Helix Bundle, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 856–865.
[158] D.E. Robertson, R.S. Farid, C.C. Moser, J.L. Urbauer, S.E. Mulholland, R. Pidikiti, J.D. Lear, A.J. Wand, W.F. DeGrado, P.L. Dutton, Design and synthesis of multi-haem proteins, Nature. 368 (1994) 425–432. https://doi.org/10.1038/368425a0.
[159] M.A. Case, G.L. McLendon, Metal-Assembled Modular Proteins: Toward Functional Protein Design, Acc. Chem. Res. 37 (2004) 754–762. https://doi.org/10.1021/ar960245+.
[160] T. Sasaki, E.T. Kaiser, Helichrome: synthesis and enzymic activity of a designed hemeprotein, ACS Publications. (2002). https://doi.org/10.1021/ja00183a065.
[161] A. Das, M.H. Hecht, Peroxidase activity of de novo heme proteins immobilized on electrodes, Journal of Inorganic Biochemistry. 101 (2007) 1820–1826. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.07.024.
[162] B.H. Monien, F. Drepper, M. Sommerhalter, W. Lubitz, W. Haehnel, Detection of Heme Oxygenase Activity in a Library of Four-helix Bundle Proteins: Towards the de Novo Synthesis of Functional Heme Proteins, Journal of Molecular Biology. 371 (2007) 739–753. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.047.
[163] R.L. Koder, J.L.R. Anderson, L.A. Solomon, K.S. Reddy, C.C. Moser, P.L. Dutton, Design and engineering of an O2 transport protein, Nature. 458 (2009) 305–309. https://doi.org/10.1038/nature07841.
[164] F. Yu, V.M. Cangelosi, M.L. Zastrow, M. Tegoni, J.S. Plegaria, A.G. Tebo, C.S. Mocny, L. Ruckthong, H. Qayyum, V.L. Pecoraro, Protein Design: Toward Functional Metalloenzymes, Chem. Rev. 114 (2014) 3495–3578. https://doi.org/10.1021/cr400458x.
[165] J.S. Plegaria, M. Duca, C. Tard, T.J. Friedlander, A. Deb, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, De Novo Design and Characterization of Copper Metallopeptides Inspired by Native Cupredoxins, Inorg. Chem. 54 (2015) 9470–9482. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01330.
[166] M. Tegoni, F. Yu, M. Bersellini, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, Designing a functional type 2 copper center that has nitrite reductase activity within α-helical coiled coils, PNAS. 109 (2012) 21234–21239. https://doi.org/10.1073/pnas.1212893110.
[167] V.M. Cangelosi, A. Deb, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, A De Novo Designed Metalloenzyme for the Hydration of CO2, Angewandte Chemie. 126 (2014) 8034–8037. https://doi.org/10.1002/ange.201404925.
[168] K.J. Koebke, V.L. Pecoraro, Development of de Novo Copper Nitrite Reductases: Where We Are and Where We Need To Go, ACS Catal. 8 (2018) 8046–8057. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b02153.
[169] K.J. Koebke, F. Yu, E. Salerno, C. Van Stappen, A.G. Tebo, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, Modifying the Steric Properties in the Second Coordination Sphere of Designed Peptides Leads to Enhancement of Nitrite Reductase Activity, Angewandte Chemie. 130 (2018) 4018–4021. https://doi.org/10.1002/ange.201712757.
[170] K.J. Koebke, F. Yu, C. Van Stappen, T.B.J. Pinter, A. Deb, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, Methylated Histidines Alter Tautomeric Preferences that Influence the Rates of Cu Nitrite Reductase Catalysis in Designed Peptides, J. Am. Chem. Soc. 141 (2019) 7765–7775. https://doi.org/10.1021/jacs.9b00196.
[171] K.J. Koebke, V.L. Pecoraro, Noncoded Amino Acids in de Novo Metalloprotein Design: Controlling Coordination Number and Catalysis, Acc. Chem. Res. 52 (2019) 1160–1167. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00032.
[172] T. Hayashi, D. Murata, M. Makino, H. Sugimoto, T. Matsuo, H. Sato, Y. Shiro, Y. Hisaeda, Crystal Structure and Peroxidase Activity of Myoglobin Reconstituted with Iron Porphycene, Inorg. Chem. 45 (2006) 10530–10536. https://doi.org/10.1021/ic061130x.
[173] F.V. Cochran, S.P. Wu, W. Wang, V. Nanda, J.G. Saven, M.J. Therien, W.F. DeGrado, Computational De Novo Design and Characterization of a Four-Helix Bundle Protein that Selectively Binds a Nonbiological Cofactor, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 1346–1347. https://doi.org/10.1021/ja044129a.
[174] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, Preparation of Artificial Metalloenzymes by Insertion of Chromium(III) Schiff Base Complexes into Apomyoglobin Mutants, Angewandte Chemie International Edition. 42 (2003) 1005–1008. https://doi.org/10.1002/anie.200390256.

[175] M.E. Wilson, G.M. Whitesides, Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium(I) moiety, ACS Publications. (2002). https://doi.org/10.1021/ja00469a064.
[176] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T.R. Ward, Artificial Transfer Hydrogenases Based on the Biotin−(Strept)avidin Technology: Fine Tuning the Selectivity by Saturation Mutagenesis of the Host Protein, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 8320–8328. https://doi.org/10.1021/ja061580o.
[177] H.J. Hwang, J.R. Carey, E.T. Brower, A.J. Gengenbach, J.A. Abramite, Y. Lu, Blue Ferrocenium Azurin: An Organometalloprotein with Tunable Redox Properties, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 15356–15357. https://doi.org/10.1021/ja054983h.
[178] A. D'Souza, S. Bhattacharjya, De Novo-Designed β-Sheet Heme Proteins, Biochemistry. 60 (2021) 431–439. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00662.
[179] N. Koga, R. Koga, G. Liu, J. Castellanos, G.T. Montelione, D. Baker, Role of backbone strain in de novo design of complex α/β protein structures, Nat Commun. 12 (2021) 3921. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24050-7.
[180] J.R. Pace, B.J. Lampkin, C. Abakah, A. Moyer, J. Miao, K. Deprey, R.A. Cerulli, Y.-S. Lin, J.D. Baleja, D. Baker, J.A. Kritzer, Stapled β-Hairpins Featuring 4-Mercaptoproline, J. Am. Chem. Soc. 143 (2021) 15039–15044. https://doi.org/10.1021/jacs.1c04378.
[181] A.A. Vorobieva, P. White, B. Liang, J.E. Horne, A.K. Bera, C.M. Chow, S. Gerben, S. Marx, A. Kang, A.Q. Stiving, S.R. Harvey, D.C. Marx, G.N. Khan, K.G. Fleming, V.H. Wysocki, D.J. Brockwell, L.K. Tamm, S.E. Radford, D. Baker, De novo design of transmembrane β barrels, Science. 371 (2021) eabc8182. https://doi.org/10.1126/science.abc8182.
[182] R.A. Marcus, Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory, Annual Review of Physical Chemistry. 15 (1964) 155–196. https://doi.org/10.1146/annurev.pc.15.100164.001103.
[183] R.A. Marcus, On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions, J. Chem. Phys. 43 (1965) 679–701. https://doi.org/10.1063/1.1696792.
[184] R.R. Dogonadze, A.M. Kuznetsov, A.A. Chernenko, THEORY OF HOMOGENEOUS AND HETEROGENEOUS ELECTRONIC PROCESSES IN LIQUIDS, Russ. Chem. Rev. 34 (1965) 759. https://doi.org/10.1070/RC1965v034n10ABEH001561.
[185] A.M. Kuznetsov, J. Ulstrup, Theory of electron transfer at electrified interfaces, Electrochimica Acta. 45 (2000) 2339–2361. https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00336-4.
[186] J.D. Morgan, P.G. Wolynes, Adiabaticity of electron transfer at an electrode, J. Phys. Chem.; (United States). 91:4 (1987). https://doi.org/10.1021/j100288a023.
[187] J.T. HYNES, Outer-sphere electron-transfer reactions and frequency-dependent friction, J. Phys. Chem. (1952). 90 (1986) 3701–3706.
[188] E.J. Piechota, G.J. Meyer, Introduction to Electron Transfer: Theoretical Foundations and Pedagogical Examples, J. Chem. Educ. 96 (2019) 2450–2466. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00489.
[189] W.R. Fawcett, M. Opallo, The Kinetics of Heterogeneous Electron Transfer Reaction in Polar Solvents, Angewandte Chemie International Edition in English. 33 (1994) 2131–2143. https://doi.org/10.1002/anie.199421311.
[190] R.K. Sen, E. Yeager, W.E. O'Grady, Theory of Charge Transfer at Electrochemical Interfaces, Annual Review of Physical Chemistry. 26 (1975) 287–314. https://doi.org/10.1146/annurev.pc.26.100175.001443.
[191] B. Ghosh, R. Bose, T.-Y.D. Tang, Can coacervation unify disparate hypotheses in the origin of cellular life?, Current Opinion in Colloid & Interface Science. 52 (2021) 101415. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.101415.
[192] A. Lazcano, J. Peretó, On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory, Journal of Theoretical Biology. 434 (2017) 80–87. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.036.
[193] M.W. Gray, Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later, MBoC. 28 (2017) 1285–1287. https://doi.org/10.1091/mbc.e16-07-0509.

[194] L. Margulis, M.J. Chapman, Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution, Trends in Microbiology. 6 (1998) 342–345. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01325-0.
[195] R.J. Ellis, A.P. Minton, Join the crowd, Nature. 425 (2003) 27. https://doi.org/10.1038/425027a.
[196] R.J. Ellis, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, Trends in Biochemical Sciences. 26 (2001) 597–604. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01938-7.
[197] R. Guo, S. Zong, M. Wu, J. Gu, M. Yang, Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2, Cell. 170 (2017) 1247-1257.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050.
[198] J. Gu, M. Wu, R. Guo, K. Yan, J. Lei, N. Gao, M. Yang, The architecture of the mammalian respirasome, Nature. 537 (2016) 639–643. https://doi.org/10.1038/nature19359.
[199] G. Wei, W. Xi, R. Nussinov, B. Ma, Protein Ensembles: How Does Nature Harness Thermodynamic Fluctuations for Life? The Diverse Functional Roles of Conformational Ensembles in the Cell, Chem. Rev. 116 (2016) 6516–6551. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00562.
[200] R.J. Clarke, The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection, Advances in Colloid and Interface Science. 89–90 (2001) 263–281. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00061-0.
[201] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Heterogeneous Electron Transfer of Cytochrome c on Coated Silver Electrodes. Electric Field Effects on Structure and Redox Potential, J. Phys. Chem. B. 105 (2001) 1578–1586. https://doi.org/10.1021/jp003742n.
[202] J.Chr. Skou, The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves, Biochimica et Biophysica Acta. 23 (1957) 394–401. https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90343-8.
[203] E.A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini, H. Almaleck, S. Diaz, G. Gordillo, Water in biological membranes at interfaces: does it play a functional role?, Anales de La Asociación Química Argentina. 92 (2004) 1–22.
[204] X. Chen, T. Yang, S. Kataoka, P.S. Cremer, Specific Ion Effects on Interfacial Water Structure near Macromolecules, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 12272–12279. https://doi.org/10.1021/ja073869r.
[205] Y. Chen, H.I. Okur, N. Gomopoulos, C. Macias-Romero, P.S. Cremer, P.B. Petersen, G. Tocci, D.M. Wilkins, C. Liang, M. Ceriotti, S. Roke, Electrolytes induce long-range orientational order and free energy changes in the H-bond network of bulk water, Science Advances. 2 (2016) e1501891. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501891.
[206] S.C. Flores, J. Kherb, P.S. Cremer, Direct and Reverse Hofmeister Effects on Interfacial Water Structure, J. Phys. Chem. C. 116 (2012) 14408–14413. https://doi.org/10.1021/jp3029352.
[207] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Electron-Transfer Processes of Cytochrome c at Interfaces. New Insights by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy, Acc. Chem. Res. 37 (2004) 854–861. https://doi.org/10.1021/ar0400443.
[208] D.S. Wuttke, M.J. Bjerrum, J.R. Winkler, H.B. Gray, Electron-Tunneling Pathways in Cytochrome c, Science. 256 (1992) 1007–1009. https://doi.org/10.1126/science.256.5059.1007.
[209] D.N. Beratan, J.N. Onuchic, J.R. Winkler, H.B. Gray, Electron-Tunneling Pathways in Oroteins, Science. (1992). https://doi.org/10.1126/science.1334572.
[210] R. Langen, I.-J. Chang, J.P. Germanas, J.H. Richards, J.R. Winkler, H.B. Gray, Electron Tunneling in Proteins: Coupling Through a β Strand, Science. 268 (1995) 1733–1735. https://doi.org/10.1126/science.7792598.
[211] O. Farver, N.M. Marshall, S. Wherland, Y. Lu, I. Pecht, Designed azurins show lower reorganization free energies for intraprotein electron transfer, PNAS. 110 (2013) 10536–10540. https://doi.org/10.1073/pnas.1215081110.
[212] O. Farver, I. Pecht, Electron transfer in blue copper proteins, Coordination Chemistry Reviews. 255 (2011) 757–773. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.005.
[213] O. Farver, I. Pecht, Long-range intramolecular electron transfer in azurins., Proceedings of the National Academy of Sciences. 86 (1989) 6968–6972. https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.6968.
[214] O. Farver, I. Pecht, Long range intramolecular electron transfer in azurins, ACS Publications. (2002). https://doi.org/10.1021/ja00040a043.
[215] R.S. Farid, C.C. Moser, P. Leslie Dutton, Electron transfer in proteins, Current Opinion in Structural Biology. 3 (1993) 225–233. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80157-5.

[216] L.J.C. Jeuken, Structure and Modification of Electrode Materials for Protein Electrochemistry, in: L.J.C. Jeuken (Ed.), Biophotoelectrochemistry: From Bioelectrochemistry to Biophotovoltaics, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 43–73. https://doi.org/10.1007/10_2015_5011.
[217] Zitare, Mecanismos regulatorios y manipulación de las propiedades de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física (FCEN-UBA), INQUIMAE.CONICET, Buenos Aire, Argentina, 2016.
[218] H. Yue, D. Khoshtariya, D.H. Waldeck, J. Grochol, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, On the Electron Transfer Mechanism Between Cytochrome c and Metal Electrodes. Evidence for Dynamic Control at Short Distances, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 19906–19913. https://doi.org/10.1021/jp0620670.
[219] H. Yamamoto, H. Liu, D.H. Waldeck, Immobilization of cytochrome c at Au electrodes by association of a pyridine terminated SAM and the heme of cytochrome, Chem. Commun. 0 (2001) 1032–1033. https://doi.org/10.1039/B101767P.
[220] H.K. Ly, M.A. Marti, D.F. Martin, D. Alvarez-Paggi, W. Meister, A. Kranich, I.M. Weidinger, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Thermal Fluctuations Determine the Electron-Transfer Rates of Cytochrome c in Electrostatic and Covalent Complexes, ChemPhysChem. 11 (2010) 1225–1235. https://doi.org/10.1002/cphc.200900966.
[221] G. Sánchez-Pomales, L. Santiago-Rodríguez, N.E. Rivera-Vélez, C.R. Cabrera, Control of DNA self-assembled monolayers surface coverage by electrochemical desorption, Journal of Electroanalytical Chemistry. 611 (2007) 80–86. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.08.003.
[222] D.K. Schwartz, Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation, Annual Review of Physical Chemistry. 52 (2001) 107–137. https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.52.1.107.
[223] A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, Chem. Rev. 96 (1996) 1533–1554. https://doi.org/10.1021/cr9502357.
[224] A. Badia, R.B. Lennox, L. Reven, A Dynamic View of Self-Assembled Monolayers, Acc. Chem. Res. 33 (2000) 475–481. https://doi.org/10.1021/ar9702841.
[225] A.M. Napper, H. Liu, D.H. Waldeck, The Nature of Electronic Coupling between Ferrocene and Gold through Alkanethiolate Monolayers on Electrodes: The Importance of Chain Composition, Interchain Coupling, and Quantum Interference, J. Phys. Chem. B. 105 (2001) 7699–7707. https://doi.org/10.1021/jp0105140.
[226] C.E.D. Chidsey, D.N. Loiacono, Chemical functionality in self-assembled monolayers: structural and electrochemical properties, Langmuir. 6 (1990) 682–691. https://doi.org/10.1021/la00093a026.
[227] C.E.D. Chidsey, Free Energy and Temperature Dependence of Electron Transfer at the Metal-Electrolyte Interface, Science. (1991). https://doi.org/10.1126/science.251.4996.919.
[228] W. Wang, T. Lee, M.A. Reed, Electron tunnelling in self-assembled monolayers, Rep. Prog. Phys. 68 (2005) 523–544. https://doi.org/10.1088/0034-4885/68/3/R01.
[229] H. Yamamoto, D.H. Waldeck, Effect of Tilt-Angle on Electron Tunneling through Organic Monolayer Films, J. Phys. Chem. B. 106 (2002) 7469–7473. https://doi.org/10.1021/jp014612x.
[230] K. Slowinski, R.V. Chamberlain, C.J. Miller, M. Majda, Through-Bond and Chain-to-Chain Coupling. Two Pathways in Electron Tunneling through Liquid Alkanethiol Monolayers on Mercury Electrodes, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 11910–11919. https://doi.org/10.1021/ja971921l.
[231] X.D. Cui, X. Zarate, J. Tomfohr, O.F. Sankey, A. Primak, A.L. Moore, T.A. Moore, D. Gust, G. Harris, S.M. Lindsay, Making electrical contacts to molecular monolayers, Nanotechnology. 13 (2001) 5–14. https://doi.org/10.1088/0957-4484/13/1/302.
[232] K. Fujita, N. Nakamura, H. Ohno, B.S. Leigh, K. Niki, H.B. Gray, J.H. Richards, Mimicking Protein−Protein Electron Transfer: Voltammetry of Pseudomonas aeruginosa Azurin and the Thermus thermophilus CuA Domain at ω-Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 13954–13961. https://doi.org/10.1021/ja047875o.
[233] J.A. Williams, C.B. Gorman, Alkanethiol Reductive Desorption from Self-Assembled Monolayers on Gold, Platinum, and Palladium Substrates, J. Phys. Chem. C. 111 (2007) 12804–12810. https://doi.org/10.1021/jp072869a.

[234] P.E. Laibinis, G.M. Whitesides, w-Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 1990–1995. https://doi.org/10.1021/ja00032a009.
[235] E. Lebègue, H. Smida, T. Flinois, V. Vié, C. Lagrost, F. Barrière, An optimal surface concentration of pure cardiolipin deposited onto glassy carbon electrode promoting the direct electron transfer of cytochrome-c, Journal of Electroanalytical Chemistry. 808 (2018) 286–292. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.12.024.
[236] Y. Huang, L. Liu, C. Shi, J. Huang, G. Li, Electrochemical analysis of the effect of Ca2+ on cardiolipin–cytochrome c interaction, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1760 (2006) 1827–1830. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.08.013.
[237] H. Park, J.-S. Park, Y.-B. Shim, Electrochemical and in situ UV–visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode, Journal of Electroanalytical Chemistry. 514 (2001) 67–74. https://doi.org/10.1016/S0022-0728(01)00627-1.
[238] A. Perhirin, E. Kraffe, Y. Marty, F. Quentel, P. Elies, F. Gloaguen, Electrochemistry of cytochrome c immobilized on cardiolipin-modified electrodes: A probe for protein–lipid interactions, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1830 (2013) 2798–2803. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.009.
[239] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy, Chem. Soc. Rev. 37 (2008) 937–945. https://doi.org/10.1039/B705976K.
[240] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 7 (2005) 3773–3784. https://doi.org/10.1039/B507989F.
[241] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Active-Site Structure and Dynamics of Cytochrome c Immobilized on Self-Assembled Monolayers—A Time-Resolved Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopic Study, Angewandte Chemie International Edition. 40 (2001) 728–731. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010216)40:4<728::AID-ANIE7280>3.0.CO;2-P.
[242] C.A. Widrig, C. Chung, M.D. Porter, The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. 310 (1991) 335–359. https://doi.org/10.1016/0022-0728(91)85271-P.
[243] C.-J. Zhong, J. Zak, M.D. Porter, Voltammetric reductive desorption characteristics of alkanethiolate monolayers at single crystal Au(111) and (110) electrode surfaces, Journal of Electroanalytical Chemistry. 421 (1997) 9–13. https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)01025-X.
[244] A.J. Bard, L.R. Faulkner, H.S. White, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, 2022.
[245] E.I. Solomon, D.W. Randall, T. Glaser, Electronic structures of active sites in electron transfer metalloproteins: contributions to reactivity, Coordination Chemistry Reviews. 200–202 (2000) 595–632. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00332-5.
[246] E.I. Solomon, Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry: Blue to Green to Red Copper Sites, Inorg. Chem. 45 (2006) 8012–8025. https://doi.org/10.1021/ic060450d.
[247] Housecroft, Catherine E., Sharpe, Alan G., Inorganic Chemistry, Fifth, Pearsons Education Limited, United Kingdom, Harlow, 2018.
[248] Que, Lawrence Jr, Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism, university Science Books, Sausalito, California, 2000.
[249] Ewen, Smith, Geoffrey, Dent, Modern Raman spectroscopy: A Practical Approach, John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England, 2005.
[250] J. Peisach, W.E. Blumberg, Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins, Archives of Biochemistry and Biophysics. 165 (1974) 691–708. https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90298-7.
[251] S.E. Creager, T.T. Wooster, A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers, Anal. Chem. 70 (1998) 4257–4263. https://doi.org/10.1021/ac980482l.

[252] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers, Coordination Chemistry Reviews. 254 (2010) 1769–1802. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Materiales

2.1.1- Reactivos

Los ω-alcanotioles usados para funcionalizar los electrodos de oro que fueron comprados a la compañía Sigma-Aldrich son los siguientes: 4-mercapto-1-butanol (HS-$(CH_2)_3$-CH_2OH), 6-mercapto-1-hexanol (HS-$(CH_2)_5$-CH_2OH), 8-mercapto-1-octanol (HS-$(CH_2)_7$-CH_2OH), 11-mercapto-1-undecanol (HS-$(CH_2)_{10}$-CH_2OH), 1-butanotiol (HS-$(CH_2)_3$-CH_3), 1-hexanotiol (HS-$(CH_2)_5$-CH_3), 1-octanotiol (HS-$(CH_2)_7$-CH_3), 1-undecanotiol (HS-$(CH_2)_{10}$-CH_3) y el 1-hexadecanotiol (HS-$(CH_2)_{15}$-CH_3). El 16-mercapto-1-hexadecanol (HS-$(CH_2)_{15}$-CH_2OH) fue adquirido a la empresa Dojindo. Todos los reactivos empleados para la preparación de soluciones de limpieza y modificación de electrodos, soluciones amortiguadoras, y otras varias, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y son de grado de pureza analítico. El agua empleada en todos los experimentos fue purificada por un sistema Millipore con una resistencia mayor a 18MΩ (agua mQ). El alambre de oro empleado para la construcción de los electrodos de trabajo y el alambre de platino utilizado como contra-electrodo fueron adquiridos a la empresa Vega y Camji.

2.1.2- Muestras proteicas

El fragmento de la subunidad II de la Citocromo *c* oxidasa *ba_3* 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) basado en el protocolo reportado por Slutter y colaboradores[1]. Puntualmente la expresión de la proteína silvestre y las quimeras con sitios T1 fue a cargo del Dr. Alcides J. Leguto, la expresión de las quimeras de uno y tres bucles con secuencias análogas humanas por el Dr. Marcos N. Morgada, y la quimera de tres bucles con secuencias de *Arabidopsis thaliana* a cargo de la Dra. María Eugenia Llases. A lo largo de la tesis doctoral realicé dos estadías intensivas en el IBR para participar de la producción de las muestras proteicas. La expresión del dominio soluble que contiene el sitio de Cu_A, de ahora en más *Tt*-Cu_A, se basa principalmente en la remoción de la secuencia, de alrededor de 32 residuos, que conforman el dominio α-hélice transmembrana, quedando únicamente el dominio cupredoxina. Los detalles de la estructura serán presentados con cierta profundidad en los Capítulos 3 y 4.

Protocolos de transformación, expresión y purificación:

- *Transformación de Escherichia coli*: Este paso se realiza mediante el método de inducción de la competencia (habilidad de incorporar ADN foráneo) mediante exposición de las bacterias a $CaCl_2$ seguida de un *shock* térmico. En primer lugar, se realiza una dilución de un cultivo concentrado de *E. coli* (cepas BL 21 o *OverExpress* C41 DE3) en 10ml de medio LB y se lo deja crecer a 37°C durante 90 minutos hasta una densidad óptica (OD_{600}) de 0,4-0,5 con agitación constante de 200 rpm. Luego se fraccionan alícuotas de 1 ml, cada una de las cuales será utilizada para una transformación independiente. Cada tubo es centrifugado a 4000 rpm y 4°C durante 3 minutos aproximadamente (en centrifuga Eppendorf 5424R), los sobrenadantes se descartan y el *pellet* bacteriano se resuspende en 500 µl de $CaCl_2$ 0,1 M frío. Se realiza una segunda centrifugación, y esta vez el pellet es resuspendido en 200 µl de $CaCl_2$ 0,1 M frío a los que se adicionan 2 µl de solución de plásmido. Si las transformaciones se realizan con productos de PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) las bacterias se resuspenden en 100 µl de una solución compuesta por 50 µl de producto de PCR purificado, 10 µl de $CaCl_2$ 1 M y H_2O mQ. Una vez resuspendidas se mantienen en hielo por una hora. Luego se realiza un *shock* térmico exponiendo las células a una temperatura de 42°C por un minuto y medio y luego se trasladan rápidamente a hielo por 3 minutos. Luego de este protocolo las células son incubadas en medio rico, medio SOC, por una hora a 37°C para permitir que las bacterias se recuperen. Finalmente son sembradas a medio LB sólido con antibiótico Kanamicina para seleccionar únicamente las bacterias transformadas, que adquieren la resistencia a este antibiótico al incorporar el plásmido.

- *Expresión de proteínas*: Se inoculó una colonia aislada del cultivo sólido con kanamicina (bacterias transformadas) en 10 ml de medio líquido LB con Kanamicina 50 $\mu g/ml$ (para que no prosperen bacterias que pudieran haber perdido el plásmido tras sucesivas replicaciones), y se dejan crecer por 24 hs a 37°C con agitación constante (220 rpm). El cultivo resultante se inocula en 1 litro de medio LB suplido con Kanamicina (50 $\mu g/ml$) y se deja crecer en las mismas condiciones que antes hasta una OD_{600} de entre 0,8-1. Una vez alcanzado ese punto se induce la expresión proteica mediante le agregado de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) con una concentración final de 0,5 mM. Luego de 18hs de expresión, se centrifuga el cultivo (15 minutos, 3600g, 4°C en centrifuga Sorvall RC5C) y resuspendido en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM a pH 8, típicamente entre 30 y 40 ml de volumen final, y se añade el inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), que específicamente inactiva un amplio espectro de hidrolasas de serina, hasta una concentración final de 1 mM.

- *Purificación de proteínas sin cola de histidinas (Tt-Cu_A)*: Las células son lisadas empleando un emulsificador (EmulsiFlex C3-Avestin), y luego centrifugadas (30 minutos, 20800g, 4°C). El sobrenadante es tratado con sulfato de estreptomicina (10 mg/ml finales, en frío con agitación) y centrifugado para eliminar el ADN de la solución. El último sobrenadante es tratado con sulfato de amonio (al 50%) lo que lleva a que la proteína de interés precipite, se

centrifuga (en centrifuga Eppendorf 5810R), y se resuspende el precipitado en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8 (típicamente en volumen final 5 o 10 ml). Se adiciona sulfato de cobre en concentración final 1 mM final directamente sobre el extracto enriquecido a bajas temperaturas. La aparición de un color púrpura intenso evidencia la formación de un sitio de Cu_A. El siguiente paso es precipitación ácida mediante diálisis contra una solución amortiguadora de ácido acético/acetato 50 mM pH 5,0 por no menos de 2 horas. El precipitado blanquecino es separado del sobrenadante coloreado (púrpura) mediante centrifugación, y este último es dializado contra una solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM, cloruro de potasio 100 mM, pH 6. La proteína es concentrada y sembrada en una columna de exclusión molecular (Superdex 75, HiLoad 16/60, GE Healthcare Life Sciences). Luego de seleccionar las fracciones con mayor concentración de proteína sin impureza, las muestras son concentradas hasta un volumen conveniente y congeladas a -20°C. La pureza de las muestras fue verificada a través de electroforesis en geles de poliacrilamida.

- *Purificación de proteínas con cola de histidinas (quimeras)*: Las células son lisadas empleando un emulsificador, y luego centrifugadas (30 minutos, 20800g, 4°C). El sobrenadante es tratado con sulfato de estreptomicina (10 $\mathrm{mg/ml}$ finales, en frío con agitación por inversión por un minuto) y centrifugado para eliminar el ADN de la solución. El sobrenadante (re centrifugado en caso de presentar turbidez) fue sembrado en una columna conteniendo Ni-sefarosa (His-Trap HP, GE Healthcare Life Sciences) empleando solución de siembra (Tris-HCl 100 mM, Cloruro de sodio 100 mM, pH 7,0). Gracias a la secuencia extra que codifica para histidinas introducida hacia la región N-terminal de la proteína, la proteína de interés queda retenida en la columna gracias a su alta afinidad por el Ni que contiene esta. Las impurezas débilmente retenidas son eluidas utilizando 4% de la solución de elución (solución de siembra + imidazol 500 mM) y 96% de solución de siembra. En un segundo paso, la proteína de interés es eluida empleando un gradiente de 4% a 100% de solución de elución en un volumen final de 50 ml. El eluido se concentra hasta 3-4 ml y se dializa (membrana de corte de 10kDa) para eliminar el imidazol contra una solución de Tris-HCl 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, DTT (ditiotreitol) 1mM, pH 7,0. Luego se adiciona ms EDTA y DTT hasta una concentración final de 5 mM en cada compuesto. Notar que la proteína aún sigue en su forma de apoproteína de modo que es necesario procurar que ningún metal entre al sitio activo, para eso el agregado de EDTA, y al mismo tiempo se debe preservar el estado reducido del residuo cisteína, para eso el DTT.

  Para eliminar la cola de histidinas, se incorporan entre 8-10 mg de trombina (correspondiente a al menos 400 U; Merck código T-4648), dejándose por 2 horas a temperatura ambiente, o en cámara fría.

  El último paso consiste, al igual que antes, en sembrar en una columna de exclusión molecular (Superdex 75, HiLoad 16/60, GE Healthcare Life Sciences), utilizando como solución de elución fosfato de potasio 100 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 6,0. Si las muestras se van a almacenar en su forma de apoproteína, se añade TCEP (tris(2-carboxietil) fosfina) en concentración final de 5 mM, como agente reductor evitando la oxidación de las cisteínas. Si no se procede al agregado de sulfato de cobre, concentración final 1mM, para metalar las muestras, lo que se verifica tras la aparición de un color verde. Si la metalación se realiza desde

muestras congeladas previamente tratadas con TCEP, este compuesto deberá será eliminado por diálisis o mediante centrifugado, previo a la metalación con sulfato de cobre.

2.2- Métodos electroquímicos

2.2.1- Armado y funcionalización de electrodos metálicos

Se emplearon alambres de oro de dos calibres diferentes, 0,2 y 0,5 mm, de pureza 99,99 % que fueron limpiados, previo a cualquier manipulación, en una mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en partes 3:1, conocida como mezcla "piraña", por 15 minutos a una temperatura de entre 150-200 °C. Se deja enfriar la solución hasta alcanzar temperatura ambiente, y son enjuagados con abundante agua desionizada. Luego se cortaron fragmentos de 2 y 5 cm de longitud. En ambos casos, uno de los extremos del alambre fue expuesto a la llama de un mechero Mecker hasta que se formó una bolita con áreas entre 2,6-7,9 mm^2 (determinadas por métodos electroquímicos). La bolita fue calentada bajo la llama hasta alcanzar un color rojo-anaranjado y luego enfriada súbitamente en agua desionizada a temperatura ambiente, proceso que se repite varias veces hasta obtener una bolita con una superficie lisa. En los fragmentos con 5 cm de oro expuesto, del lado contrario a la esfera de oro fue introducido un capilar de vidrio, que se selló a la llama. En este proceso se encapsulan alrededor de 2-3 cm del tramo desde la bolita de oro, dejando 2 cm de alambre libre en el extremo opuesto para luego unir con alambre de cobre, luego se sella con parafilm, Figura-1-A. Con los fragmentos de alambre de 2 cm, de ambos diámetros, no se realizó el encapsulamiento (sin control de su área), lo que permitió una manipulación más sencilla necesaria para el control de la distancia con electrodo de referencia, Figura-1-B.

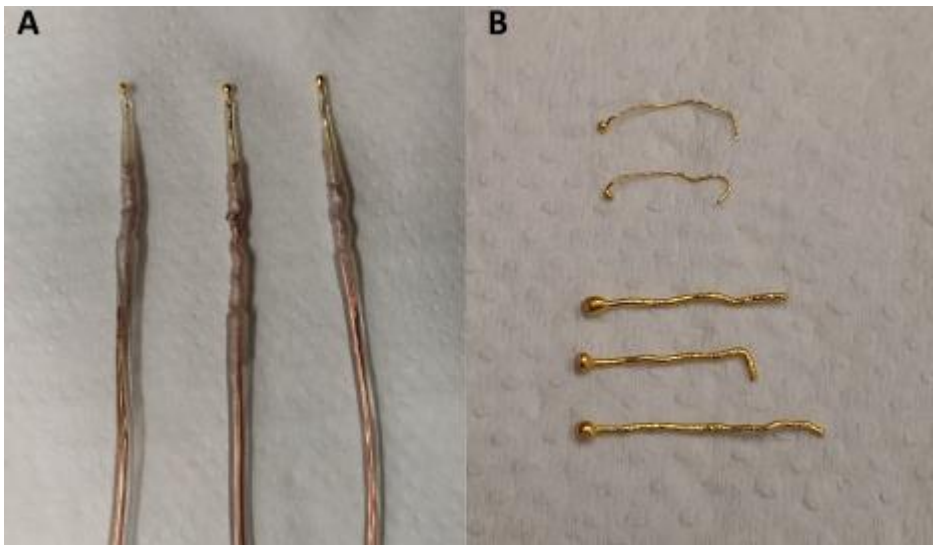


Figura 1: ***A.*** *Electrodos de oro encapsulados con vidrio (de área fija).* ***B.*** *Electrodos de oro de área variable de dos calibres distintos.*

Para garantizar la integridad de las muestras proteicas y, al mismo tiempo, controlar la distancia entre estas y la superficie metálica, la superficie de los electrodos fue biocompatibilizada con monocapas autoensambladas de ω-alcanotioles. Previo a la funcionalización se procedió a la limpieza de su superficie en dos etapas. La primera etapa consistió en limpieza química empleando una solución piraña a 150-200°C por algunos minutos, típicamente se retiran de la fuente de calor al consumirse la totalidad del peróxido en solución. Este paso se omitió para los electrodos encapsulados ya que su empleo sistemático comprometía el encapsulamiento del alambre de oro. Luego son enjuagados con agua desionizada. La segunda etapa (primera para los encapsulados) consiste en una limpieza electroquímica en dos pasos. En primer lugar, se sumergen los electrodos en una solución de hidróxido de potasio 10 %, se aplica un potencial reductor (-4V) por un período de un minuto, y se enjuagan con abundante agua desionizada. En segundo lugar, son sumergidos en una solución de ácido perclórico o de ácido sulfúrico al 10%, y son sometidos a 50 ciclos de barrido voltamétrico cíclico en un rango de potencial de -0,2 V a 1,6 V (vs Ag/AgCl 3,5 M) a una velocidad de 1 $V.s^{-1}$. En este paso deberían observarse únicamente las señales típicas de la reducción y oxidación de oro, en caso contrario, se repite desde el primer paso, químico o electroquímico según corresponda. Finalizado este proceso son removidos y enjuagados abundantemente con agua desionizada.[2]

En el caso de electrodos encapsulados, cuando no pudieran eliminarse las señales de impurezas se procede a realizar el siguiente protocolo alternativo. Se sumergen los electrodos en una solución de ácido perclórico al 10%, y se aplica un potencial oxidante (+4V) por unos 5 minutos aproximadamente, típicamente, hasta formar una película de óxido sobre toda la superficie del electrodo, lo que se evidencia por su intenso color rojizo. Una vez que la totalidad del electrodo se encuentra en estas condiciones, son sumergidos en una solución de ácido clorhídrico 10% y sonicados por 15 minutos, luego la solución de ácido clorhídrico es reemplazada por solución fresca y se lleva a una nueva ronda de sonicado por 15 minutos más. En este punto, los electrodos son lavados abundantemente con agua desionizada y se retoma desde el primer paso del protocolo de limpieza electroquímica comentado previamente.

Para el armado de las monocapas (puras o mixtas) los electrodos limpios son lavados con etanol absoluto y sumergidos en soluciones etanólicas de concentración 5 mM total de los ω-alcanotioles empleados. Para el armado de las monocapas cortas, con un número de metilenos entre 3 y 7, los electrodos se dejan un día en esas soluciones, mientras que para las monocapas más largas, con un número de metilenos entre 10 y 15, se dejan dos días. Una vez pasado ese tiempo los electrodos son lavados primero con etanol absoluto y luego con agua desionizada, y sumergidos en solución buffer de medida para evaluar el comportamiento de la corriente no faradaica y verificar así el correcto armado de la monocapa. Para ello se someten a 50 ciclos de voltametría cíclica en un rango acotado de potenciales, típicamente aquel donde se realizará posteriormente el experimento electroquímico (-0,2 a 0,5 V vs Ag/AgCl 3,5 M).

Una vez finalizadas las medidas electroquímicas, los electrodos no encapsulados son sometidos a un paso de limpieza química (piraña) y almacenados en agua desionizada. Los electrodos encapsulados son sometidos únicamente al primer paso de limpieza electroquímica

(potencial reductor en medio básico) y almacenados secos en un recipiente limpio de vidrio sellado con parafilm.

2.2.2- Voltametría cíclica para especies en solución

Las voltametrías en solución se llevaron a cabo empleando una celda de vidrio construida a partir de una pipeta Pasteur de vidrio, introduciendo por el orificio de menor diámetro un alambre de platino (previamente flameado y lavado con agua desionizada) y sellándolo al mechero, Figura-2-A. Previo su empleo en las medidas electroquímicas se limpió su interior con una solución de ácido clorhídrico seguido de intensos lavados con agua desionizada y, finalmente, con solución amortiguadora de medida. El electrodo de trabajo (electrodos encapsulados) y el electrodo de referencia, se introducen por el extremo libre superior, hasta que entran en contacto con la muestra proteica, que consiste en un volumen de entre 20-50 µl de solución proteica en una solución amortiguadora apropiada (típicamente empleando como electrolito soporte KNO_3 500mM, a menos que se indique lo contrario). Para los experimentos en función de temperatura se diseñó y manufacturó en nuestro laboratorio una camisa térmica de politetrafluoroetileno (teflón), Figura 2-C y D, que permitió el control termostático de la muestra. Para ello se empleó un termostato Fisherbrand FBC-620, o uno Lauda Alpha RA8, indistintamente. La temperatura se controló mediante un termómetro digital de Termo Fluke 51 II y una termocupla de tipo K para medios líquidos, la que se insertó en la camisa térmica en un orificio diseñado para tal fin. Se emplearon electrodos de referencia de tipo WPI Dri-Ref de Ag/AgCl 3,5 M en KCl, de pequeño volumen, Figura 2-B. El arreglo experimental es tal que la celda electroquímica es isotérmica con el baño termostático, de modo que es necesario corregir la variación del potencial de referencia con la temperatura. Para ello se realizó una calibración en función de la temperatura, empleando dos electrodos idénticos, donde uno de ellos se mantuvo a temperatura constante (temperatura ambiente) gracias a la ayuda de un capilar de Luggin, y el otro se sometió a cambios de temperatura en el rango típico empleado en los experimentos de temperatura variable, de 4-40 °C. El efecto de la temperatura sobre el potencial del electrodo de referencia se corrigió empleando la siguiente relación: $E_{Ref} = 0{,}102\ mV.C°\ t + 207{,}78\ mV$, en mV vs electrodo estándar de hidrógeno (EEH), y t en grados Celsius, de acuerdo con valores reportados previamente[3].

Los experimentos electroquímicos como la limpieza de electrodos fueron realizadas empleando, indistintamente, un potenciostato Gamry Ref-600 o uno EG&G PAR-263, Figura 3. La celda electroquímica junto con la camisa termostática, fueron colocados dentro de una caja de Faraday Gamry´s Vista Shield, Figura 3-C. Los datos fueron adquiridos con el *software* Gamry Instruments Framework (versión 5.61), o PowerSuit, respectivamente, y luego exportados y analizados con el programa OriginPro 8.6. Se extrajeron las líneas de base y obtuvieron los potenciales de pico (E_p), corrientes de pico anódicas y catódicas (I_a y I_c) y el ancho de señal a la altura de medio pico (FWHM). El potencial de reducción (E^o) se estimó a partir del potencial medio ($E_{1/2}$) , el que se obtiene a partir del promedio de los potenciales de pico, tal como se comentó en el Capítulo 1.

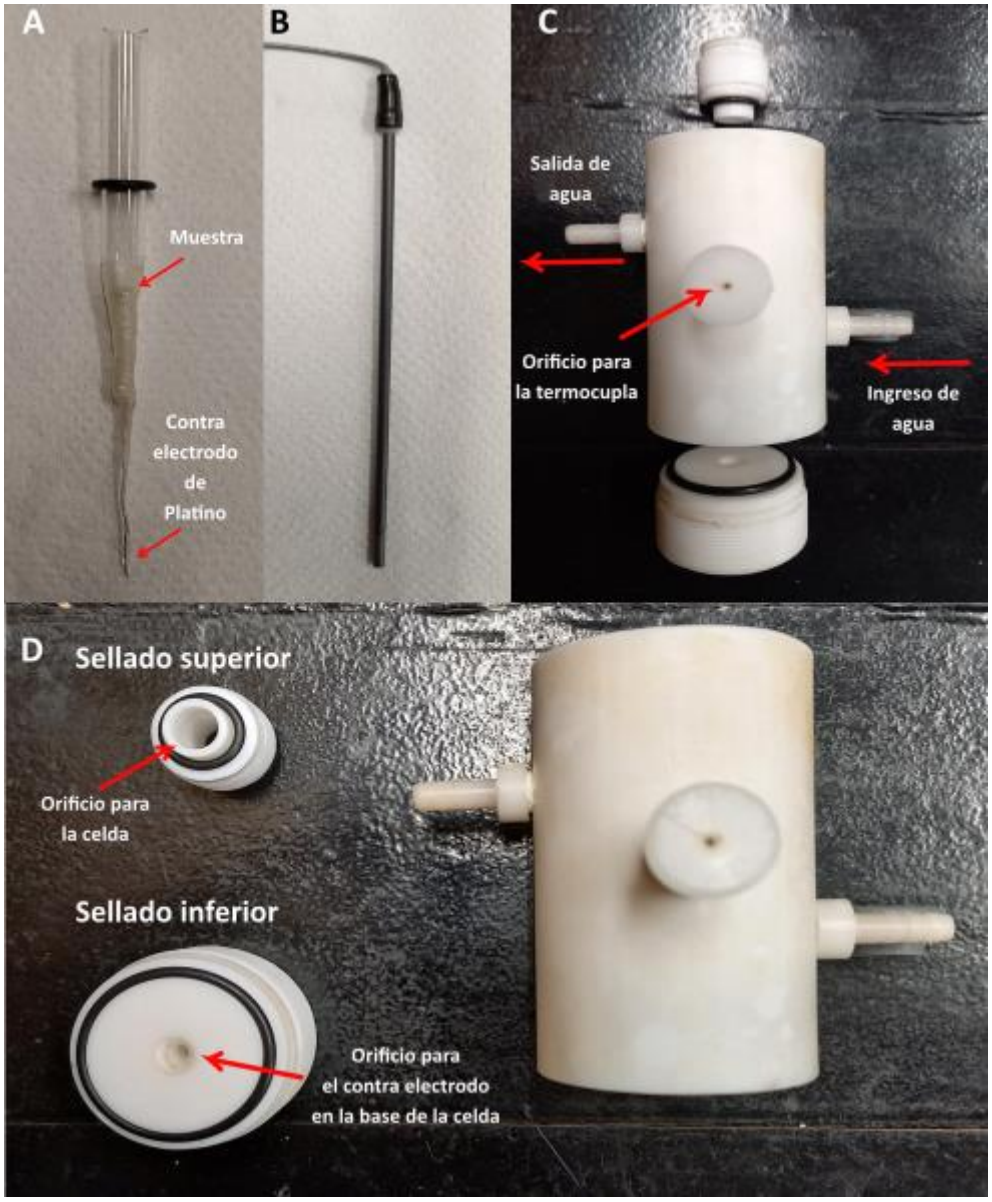


Figura 2: ***A.*** *Celda para medidas de soluciones proteicas.* ***B.*** *Electrodo de referencia de tipo Dri-Ref de volumen reducido.* ***C.*** *Camisa térmica desarmada, con ambos componentes de sellado superior e inferior, y el sentido del flujo de baño termostático.* ***D.*** *Detalle de los orificios de las tapas de sellado que sujetan la celda.*



Figura 3: ***A.*** *Potenciostato Gamry Reference 600* ***B.*** *Potenciostato EG&G Princeton Applied research (PAR) 263.* ***C.*** *Caja de Faraday Gamry´s Vista Shield.*

Las componentes entrópicas y entálpicas del potencial de reducción se obtuvieron a partir de experimentos en función de la temperatura. El potencial de reducción puede reescribirse como la energía libre del proceso a través del número de electrones involucrados en el mismo y la constante de Faraday (F) según:

$$\Delta G^o = -n\,F\,E^o \qquad \textbf{Ecuación-1}$$

Por otra parte, gracias a la definición de la energía libre de Gibbs se puede escribir el segundo principio de la termodinámica únicamente en término del sistema, obteniéndose un criterio de espontaneidad para un proceso que ocurre a T y P constantes. De este modo, la energía libre de Gibbs de cualquier proceso se puede escribir como una componente energética, la entalpía (ΔH^o), y otra entrópica ($-T\Delta S^o$) según:

$$\Delta G^o = \Delta H^o - T\Delta S^o \qquad \textbf{Ecuación-2}$$

Combinando ambas expresiones se tiene una expresión que muestra las componentes entálpicas y entrópicas de E^o, y su dependencia a través de esta última con la temperatura:

$$E^o = -\frac{\Delta H^o}{nF} + \frac{T\Delta S^o}{nF} \qquad \textbf{Ecuación-3}$$

De modo que, es posible obtener la componente entrópica analizando la variación de E^o con T, a P constante, según:

$$\left(\frac{\partial E^o}{\partial T}\right)_P = \frac{\Delta S^o}{nF} \qquad \textbf{Ecuación-4}$$

Si, por otra parte, se dividen ambos miembros de la igualdad en la ecuación-3, por la temperatura, se tiene que:

$$\frac{E^o}{T} = -\frac{\Delta H^o}{nF}\frac{1}{T} + \frac{\Delta S^o}{nF} \qquad \textbf{Ecuación-3}$$

Donde es claro que es posible obtener la componente entálpica a partir de la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial \left(E^o/_T\right)}{\partial\left(1/_T\right)}\right)_P = -\frac{\Delta H^o}{nF} \qquad \textbf{Ecuación-4}$$

Esta última expresión es conocida como la ecuación de Gibbs-Helmholtz[4]. Se asume que tanto ΔH^o como ΔS^o son constantes en el rango de temperaturas evaluado, de 4-40°C. Esto se verifica experimentalmente, ya que en todos los casos se obtuvieron perfiles lineales tanto en el análisis en función de T como en función de $1/_T$. Esta forma de analizar los datos permite obtener ambos parámetros termodinámicos a partir de la pendiente de una recta.

2.2.3- Voltametría cíclica para especies adsorbidas

Una vez funcionalizados los electrodos siguiendo el protocolo detallado anteriormente, se incuban en soluciones proteicas de concentración del orden submilimolar por un par de horas en el caso de monocapas cortas (con 3 y 5 metilenos) y por un día en monocapas más largas (con 7, 10 y 15 metilenos). Se emplea una celda electroquímica refrigerante de tipo "Dr. Bob", Figura 4, que permite el empleo de un arreglo de tres electrodos (electrodo de trabajo, referencia y contraelectrodo). Durante el armado de la celda se tiene especial cuidado en el posicionamiento del electrodo de trabajo respecto al de referencia, intentando ubicarlos lo más cerca posible, esto permite minimizar al máximo la resistencia no compensada que podría existir. En este sentido el empleo de electrodos de tamaño reducido (referencia y trabajo) así como una concentración de electrolito soporte elevada garantizan una resistencia no compensada muy baja. En la Figura-5 se presentan resultados previos de nuestro laboratorio

sobre la dependencia de la k_{TE}^{o} con la concentración del electrolito soporte, y se observa que a concentraciones superiores a 200 mM el valor de k_{TE}^{o} es independiente de la fuerza iónica de la solución. La elección de una concentración de 250 mM garantiza trabajar en esa zona al mismo tiempo que evita la desorción de la proteína.



Figura 4: *Celda electroquímica de tipo "Dr. Bob" de Gamry empleada para medidas de películas proteicas bajo control termostático.*

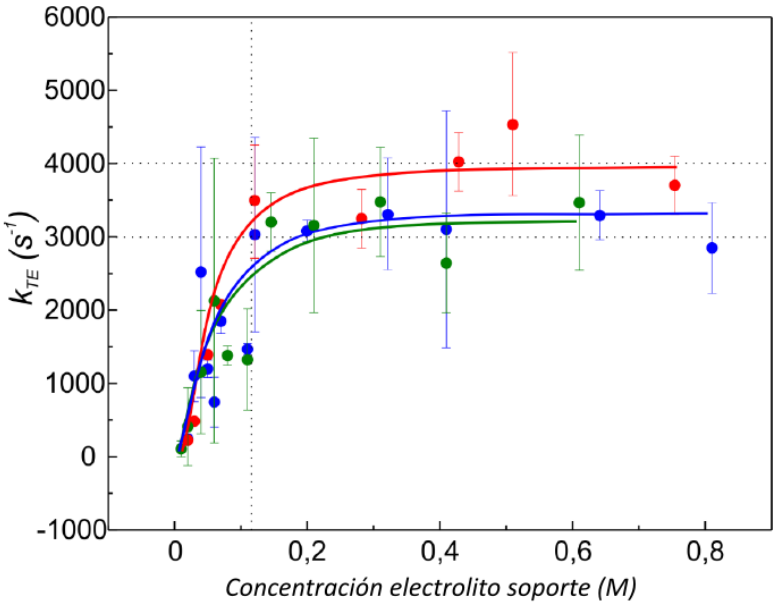


Figura 5: *Valor de k_{TE}^{o} en función de la fuerza iónica de la solución de medida a pH 7 de muestras proteicas adsorbidas sobre electrodos recubiertos con monocapas de ω-alcanotioles terminados en grupos hidroxilo y metilo en proporción 3:2. En este caso se emplearon muestras de Tt-Cu_A (azul), y mutantes puntuales de la metionina axial M160Q (verde) y M160H (rojo). En ese caso en particular la distancia entre los electrodos de referencia y de trabajo fue algo mayor que las empleadas en esta tesis por eso los valores de k_{TE}^{o} son más bajos. Las líneas punteadas indican el punto a partir del que el valor de la k_{TE}^{o} se vuelve independiente de la fuerza iónica.*

2.2.3.1- Método de Laviron

El método desarrollado por Laviron no es otra cosa que la resolución de las ecuaciones para un barrido lineal de potencial (en una dirección y luego en la dirección contrario, cíclico) para todos los regímenes de reversibilidad en el caso de analitos adsorbidos en sus formas oxidada y reducida[5]. Considerando una reacción de reducción de tipo: $O + ne^- \rightleftharpoons R$, en un experimento de voltametría el potencial varía según:

$$E = E_i + \upsilon t \qquad \textbf{Ecuación-5}$$

Donde υ es la velocidad de barrido (V.s^{-1}), E_i es el valor de potencial a tiempo inicial y t es el tiempo. Siendo Γ_o y Γ_R la concentración superficial de analito (mol.cm^{-2}) en su forma oxidada y reducida, respectivamente, la suma de sus concentraciones, $\Gamma_T = \Gamma_o + \Gamma_R$, se asume constante durante el experimento. Para una reacción de reducción se puede definir la corriente, i, según:

$$i = -nFA\ {}^{d\Gamma_o}/_{dt} \qquad \textbf{Ecuación-6}$$

Si se asume un comportamiento tipo Butler-Volmer se puede reescribir la expresión anterior en términos del sobrepotencial aplicado, $E - E^o$, y la constante de TE, k_{TE}^o (s^{-1}):

$$i = -nFAk_{TE}^o\{\Gamma_o\ exp[-\alpha nF(E - E^o)/RT] - \Gamma_R\ exp[-(1-\alpha)nF(E - E^o)/RT]\} \qquad \textbf{Ecuación-7}$$

Donde n, F, R y T tienen su significado habitual. Resulta útil condensar la dependencia exponencial, η , según:

$$\eta = exp[-nF(E - E^o)/RT] \qquad \textbf{Ecuación-8}$$

Y definir una función de corriente adimensional, ψ, obteniendo:

$$\psi = \frac{i}{F^2(RT)^{-1}n^2\upsilon A\Gamma_T} = -m\left\{\left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)\eta^{-\alpha} - \left({}^{\Gamma_R}/_{\Gamma_T}\right)\eta^{1-\alpha}\right\} \qquad \textbf{Ecuación-9}$$

Donde queda definido el parámetro adimensional m que relaciona la k_{TE}^o con la velocidad de barrido υ según la siguiente expresión:

$$m = \left(\frac{RT}{nF}\right)\left(\frac{k_{TE}^o}{\upsilon}\right) \qquad \textbf{Ecuación-10}$$

Es importante notar que con esta nueva definición, donde aparece explícitamente la velocidad de barrido, que no es otra cosa que el cambio en el (sobre)potencial en función del tiempo, $\upsilon = {}^{dE}/_{dt}$, ahora la corriente adimensional queda expresada en términos del diferencial de sobrepotencial, dE, en lugar del diferencial de tiempo, dt, según:

$$\psi = \frac{i}{F^2(RT)^{-1}n^2\upsilon A\Gamma_T} = \left(\frac{RT}{nF}\right)\frac{d\left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)}{dE} \qquad \textbf{Ecuación-11}$$

Para continuar con el desarrollo del problema necesitamos expresar la corriente en términos de la variable η, que a su vez es función del sobrepotencial, $\eta(E)$, según la ecuación-8. Diferenciando la función $\eta(E)$ respecto del sobrepotencial se obtiene que ${}^{d\eta}/_{dE} = \eta\left({}^{nF}/_{RT}\right)$. Si introducimos esta expresión en la ecuación-11 y la combinamos con la ecuación-9 se obtiene la siguiente ecuación diferencial ordinaria de primer grado:

$$\psi = \frac{d\left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)}{d\eta}\eta = -m\left\{\left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)\eta^{-\alpha} - \left({}^{\Gamma_R}/_{\Gamma_T}\right)\eta^{1-\alpha}\right\} \qquad \textbf{Ecuación-12}$$

Reordenando la expresión anterior se obtiene una expresión más cómoda para trabajar:

$$\frac{d\left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)}{d\eta} + \left({}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}\right)m\,(1+\eta)\eta^{-(1+\alpha)} = m\eta^{-\alpha} \qquad \textbf{Ecuación-13}$$

Análogamente se puede llegar a una expresión equivalente para el proceso de reducción, donde adopta la forma:

$$\frac{d\left({}^{\Gamma_R}/_{\Gamma_T}\right)}{d\eta} + \left({}^{\Gamma_R}/_{\Gamma_T}\right)m\,(1+\eta)\eta^{-(1+\alpha)} = m\eta^{-(1+\alpha)} \qquad \textbf{Ecuación-14}$$

Estas ecuaciones son resolubles, hallando así una expresión para ${}^{\Gamma_o}/_{\Gamma_T}$ en términos de η y m, lo que permite obtener expresiones generales para la corriente adimensional catódica y anódica, ψ_c y ψ_a:

$$\psi_c = m\eta^{-\alpha}\left\{1 - m(1+\eta)\exp[f(\eta)]\int_{\infty}^{\eta} z^{-(1+\alpha)}\exp[-f(z)]dz\right\} \qquad \textbf{Ecuación-15}$$

$$\psi_a = -m\eta^{-\alpha}\left\{\eta - m(1+\eta)\exp[f(\eta)]\int_{0}^{\eta} z^{-\alpha}\exp[-f(z)]dz\right\} \qquad \textbf{Ecuación-16}$$

Donde la función $f(\eta)$ se expresa según la ecuación 17, y $f(z)$ representa la misma función donde η es reemplazado por z como variable de integración:

$$f(\eta) = \left(\frac{m}{\alpha(1-\alpha)}\right)\eta^{-\alpha}\big(1 - \alpha(1+\eta)\big) \qquad \textbf{Ecuación-17}$$

La resolución de las ecuaciones 15 y 16 mediante integración numérica permite hallar la dependencia de la separación entre los potenciales de pico anódico y catódico, ΔE_p, que es el parámetro experimental más relevante (que dependerá del sobrepotencial, por ende, de la velocidad de barrido), y el parámetro adimensional m. En este punto pueden distinguirse dos regímenes cinéticos de relevancia: el irreversible y el cuasi-reversible.

Régimen Irreversible:

Si bien ambos regímenes se pueden resolver numéricamente, en el límite irreversible se pueden realizar ciertas aproximaciones que simplifican notablemente las expresiones. Bajo este régimen la velocidad de barrido es mucho mayor que la velocidad de TE ($\upsilon \gg k_{TE}^{o}$) y, por ende, el parámetro adimensional tiende a cero ($m \to 0$). Este hecho permite hallar expresiones límite para la corriente a partir de las ecuaciones 15 y 16:

$$\psi_c = \; m\eta^{-\alpha}\exp\left[\frac{m\eta^{-\alpha}}{\alpha}\right] \qquad \textbf{Ecuación-18}$$

$$\psi_a = = \; -m\eta^{1-\alpha}\exp\left[\frac{-m\eta^{1-\alpha}}{(1-\alpha)}\right] \qquad \textbf{Ecuación-19}$$

A partir de estas expresiones, derivando respecto del sobrepotencial e igualando a cero se obtienen las condiciones para las que la corriente alcanza un máximo. Para la corriente catódica se llega a que $\eta^{-\alpha} = -\alpha/m = \alpha/|m|$ y para la corriente anódica $\eta^{1-\alpha} = (1-\alpha)/m$. Introduciendo estas condiciones en la ecuación-8 se llega a expresiones que relacionan la posición del potencial de pico con el parámetro m:

$$E_{p,c} = \; E^{o} - \left(\frac{RT}{\alpha nF}\right)\ln\left[\frac{\alpha}{m}\right] \qquad \textbf{Ecuación-20}$$

$$E_{p,a} = \; E^{o} - \left(\frac{RT}{(1-\alpha)nF}\right)\ln\left[\frac{(1-\alpha)}{m}\right] \qquad \textbf{Ecuación-21}$$

Dado que m, relaciona la velocidad de barrido y la k_{TE}^{o}, ecuación-10, se puede obtener una expresión que involucra ambas variables experimentales, la separación de picos anódicos y catódicos, y la velocidad de barrido:

$$E_{p,c} - E^{o} = \; -\left(\frac{RT}{\alpha nF}\right)\ln\left[\frac{\alpha nF}{RTk_{TE}^{o}}\right] - \left(\frac{RT}{\alpha nF}\right)\ln\upsilon \qquad \textbf{Ecuación-22}$$

$$E_{p,a} - E^{o} = \; -\left(\frac{RT}{(1-\alpha)nF}\right)\ln\left[\frac{(1-\alpha)nF}{RTk_{TE}^{o}}\right] - \left(\frac{RT}{(1-\alpha)nF}\right)\ln\upsilon \qquad \textbf{Ecuación-23}$$

De esta manera es posible hallar el valor de k_{TE}^{o} a partir de la ordenada al origen obtenida a partir de un gráfico de $E_p - E^{o}$ en función de $\ln\upsilon$. Alternativamente, tal como lo presentó originalmente Laviron, empleando el valor de υ tal que $E_p - E^{o} = 0$, de modo que k_{TE}^{o} queda expresada:

$$k_{TE}^{o} = \left(\frac{\alpha nF}{RT}\right)\upsilon_c = \left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}\right)\upsilon_a \qquad \textbf{Ecuación-24}$$

Este tratamiento es válido únicamente para separaciones de pico mayores a los 200 mV, para separaciones menores dejan de valer las expresiones límite y se debe emplear el resultado numérico.

Régimen Cuasi-reversible:

En este régimen no es posible realizar la aproximación comentada previamente, de modo que es necesario trabajar con el resultado numérico. En la Figura-6-A se presenta la curva de trabajo teórica que proporciona los valores del parámetro m en función de valores del parámetro ΔE_p, los que se obtienen a través de la ecuación-25. De esta forma, la metodología experimental consiste en determinar el valor de m empleando al curva de trabajo a partir de los valores experimentales de ΔE_p. Luego es posible obtener el valor de k_{TE}^o empleando la ecuación-10, es decir, a partir de la pendiente $({k_{TE}^o}^{-1})$ de un gráfico de la inversa de m en función de la velocidad de barrido, $m^{-1}\ vs\ \left(\frac{nF}{RT}\right)\upsilon$, Figura-6-B.

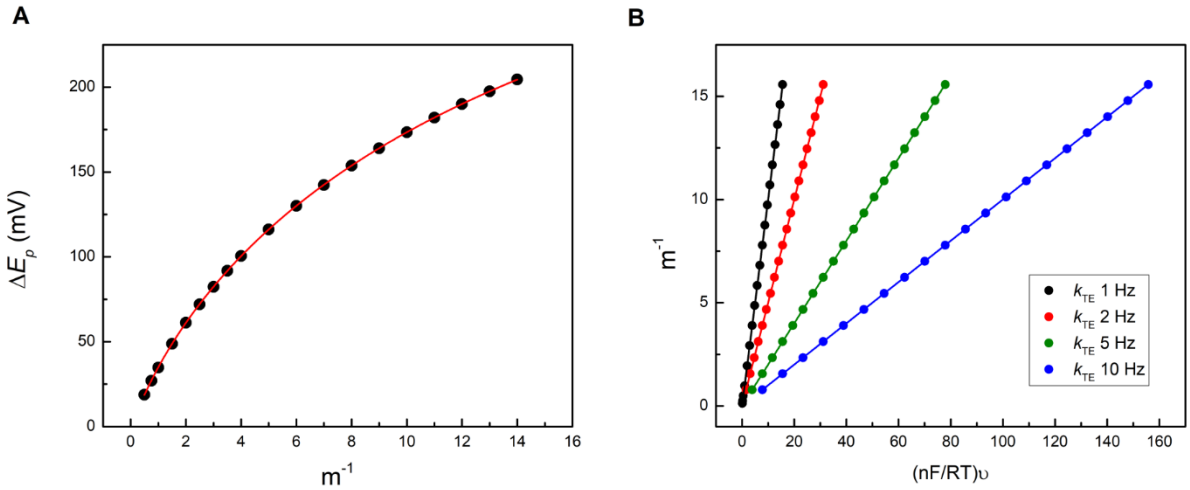


Figura 6: ***A.*** *Curva de trabajo teórica de Laviron para el régimen cuasi-reversible.* ***B.*** *Gráfico de la ecuación-10 que permite obtener k_{TE}^o a partir de los valores de m y la velocidad de barrido, υ. Se presenta el caso para valores crecientes de k_{TE}^o, que disminuyen la pendiente de la curva $({k_{TE}^o}^{-1})$.*

$$m^{-1} = 17{,}125 \left[\left(\frac{-455{,}763\ mV}{\Delta E_p - 451{,}418\ mV} - 1\right)^{1/0{,}831}\right] \qquad \textbf{Ecuación-25}$$

Es importante señalar que el resultado presentado en Figura-6-A no depende fuertemente con el valor de α, mientras este se encuentre dentro del intervalo $0{,}3 < \alpha < 0{,}7$. El error cometido por emplear esta curva de trabajo para un alfa distinto de 0,5 dentro de ese intervalo es menor al 6%. Sin embargo, todas las metaloproteínas cuya cinética de TE fue analizada empleando este método presentan valores de α de 0,5 o en torno a este, con lo cual no existen ningún impedimento en este sentido.

A mayores valores de k_{TE}^o es necesario incrementar la velocidad de barrido para poder obtener separaciones de pico que permitan este análisis. Dado que al acortar la distancia entre el sitio redox y la superficie del electrodo se incrementa el acoplamiento electrónico y con él el valor de k_{TE}^o, para monocapas cortas (con n entre 3 y 7) no se logra alcanzar separaciones de

pico mayores a los 200 mV que permitan emplear la aproximación de Laviron para el régimen irreversible. Dado que a lo largo de esta tesis se comparan valores de k_{TE}^{o} para distintas condiciones de acoplamiento electrónico se optó por analizar todas ellas con el mismo procedimiento, mediante el análisis de la región cuasi-reversible.

2.2.4- Voltametría de corriente alterna para especies adsorbidas

La configuración experimental fue idéntica a aquella descripta para experimentos de voltametría de especies adsorbidas. Más aún, en estos experimentos se registró, previo al experimento de VCA, el conjunto de voltametrías cíclicas necesarias para obtener la k_{TE}^{o} mediante el método de Laviron para poder comparar los valores obtenidos sobre el mismo sistema electrodo/SAM/proteína. Las VCA se adquirieron empleando pasos de 20 mV a lo largo de una ventana de potencial de 500 mV centrada en el potencial de reducción de la proteína en particular que se pretende medir, empleando una amplitud de la perturbación armónica de 10 mV. El rango de frecuencias (ω) empleadas fue de 1-100 kHz para monocapas con metilenos con n de 3, 5 y 7, de 0,3-30 KHz para monocapas con n de 10 y 0,03-30 Hz para monocapas con metilenos con n de 15. Los espectros fueron procesados con el programa OriginPro 8.6.

2.2.4.1- Método de Creager

En el Capítulo 1 se hizo referencia a que un sistema electroquímico puede ser representado mediante un circuito equivalente compuesto por resistencias y capacitores, donde cada uno de esos elementos representa un proceso electroquímico determinado, ya sea en la solución o en la interfaz electrodo-solución. Para el caso particular de sistemas donde el analito se encuentra adsorbido sobre la superficie del electrodo, donde no hay influencia de especies que provengan desde el seno de la solución, se utiliza el circuito equivalente de Randles[6], ver Figura-7.

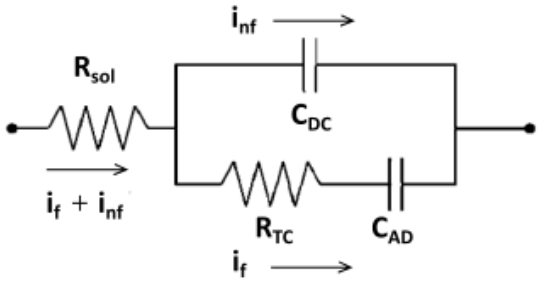


Figura 7: *Circuito equivalente de Randles. Se indica sus cuatro elementos circuitales: capacitancia de la doble capa (C_{DC}), capacitancia debida al analito adsorbido (C_{AD}), resistencia de la solución (R_{sol}) y la resistencia de la reacción de transferencia de carga (R_{TC}), y el flujo de corriente faradaica y no faradaicas (i_f y i_{nf}).*

Si en lugar de aplicar una señal continua (voltametría convencional), se aplica una señal alterna con una frecuencia ω, el circuito responderá de manera diferente para cada valor de ω, es decir, la impedancia del sistema (Z) será función de la frecuencia: $Z_{celda} = Z_{celda}(\omega)$. Para un circuito en alterna valen las siguientes ecuaciones:

$$E_{entrada} = E_o \cos(\omega t) \qquad \textbf{Ecuación-26}$$

$$Z = \frac{E}{i} \qquad \textbf{Ecuación-27}$$

$$Z_\omega = Z_{Re} + j\, Z_{Im} \qquad \textbf{Ecuación-28}$$

$$|Z|^2 = {Z_{Re}}^2 + j\, {Z_{Im}}^2 \qquad \textbf{Ecuación-29}$$

El experimento consiste en barrer una ventana de potencial centrada en el potencial de reducción de la especie (E^o), comenzando (E_i) y terminando (E_f) en valores bien distantes de este. El potencial aplicado además tendrá montada una señal oscilante en el tiempo de frecuencia ω, según ecuación-26. La impedancia es un número complejo que, dependiendo del elemento circuital que se considere, tendrá una componente real y otra imaginaria, ecuaciones-28 y 29. En el caso puntual del circuito de Randles, que solo contiene resistencias y capacitores, la impedancia asociada a estos elementos (Z_R y Z_C respectivamente) estará dada por las siguientes relaciones:

$$Z_R = R \qquad \textbf{Ecuación-30}$$

$$Z_C = -\frac{j}{\omega C} \qquad \textbf{Ecuación-31}$$

Considerando que para un circuito en serie vale que la impedancia total será la sumatoria de las impedancias de los elementos individuales ($Z = Z_A + Z_B + \cdots$) y que para elementos en paralelo será la sumatoria de las inversas ($Z^{-1} = {Z_A}^{-1} + {Z_B}^{-1} + \cdots$), se puede escribir la impedancia total del circuito de Randles empleando las ecuaciones-30 y 31 obteniendo:

$$Z = Z_{R_{sol}} + \left(Z_{C_{DC}}^{-1} + \left(Z_{R_{TC}} + Z_{C_{AD}}\right)^{-1}\right)^{-1} \qquad \textbf{Ecuación-32}$$

Introduciendo las ecuaciones 30 y 31 en la expresión anterior, y recordando que $j = -1/j$ se tiene que:

$$Z = R_{sol} + (j\omega C_{DC} + (R_{TC} - j/\omega C_{AD})^{-1})^{-1} \qquad \textbf{Ecuación-33}$$

Las condiciones de trabajo son idénticas a aquellas empleadas en experimentos de voltametría cíclica descritos previamente, y bajo esas condiciones se puede despreciar la contribución resistiva de la solución (R_{sol}). Por otro lado, recordemos que la onda sinusoidal de potencial se monta sobre un potencial de base que se barre durante la voltametría. Y es la relación de este valor respecto del potencial de reducción de la especie (E^o) lo que determinará si tendrá lugar la reacción de TE. De este modo, si el potencial aplicado se encuentra lejos del valor de E^o no

habrá TE y la corriente es cero. Si el $E < E^o$ la reacción no será espontánea, si por el contrario $E > E^o$ la totalidad del analito ya habrá reaccionado, y dado que la oscilación no logra revertir el proceso dado que es pequeña, tampoco habrá corriente. En estos casos ($E \neq E^o$) dado que la k_{TE}^o tiende a cero, la R_{TC} tiende a infinito, recordemos que vale:

$$R_{TC} = \frac{2RT}{F^2 A \Gamma k_{TE}^o} = \frac{1}{2C_{AD}k_{TE}^o} \qquad \textbf{Ecuación-34}$$

Cuando esto sucede la impedancia de la celda tiende a la impedancia de la doble capa, y el sistema actúa como un capacitor determinando la impedancia de base del experimento ($Z_{E \neq E^o} = Z_b$), ecuación 35. Cuando $E \approx E^o$ la k_{TE}^o adquiere valores apreciables, siendo máxima cuando $E = E^o$, haciendo que la R_{TC} adopte valores pequeños según la ecuación 34. Esto lleva a las siguientes expresiones de impedancia:

$$Z_{E \neq E^o} = Z_{C_{DC}} = -\frac{j}{\omega C_{DC}} = Z_b \qquad \textbf{Ecuación-35}$$

$$Z_{E \approx E^o} = (j\omega C_{DC} + (R_{TC} - j/\omega C_{AD})^{-1})^{-1} \qquad \textbf{Ecuación-36}$$

El método descripto por Creager y Wooster[7,8] propone emplear la caída de la corriente de pico (i_p), es decir cuando $E = E^o$, respecto de la corriente base (i_b) al incrementar la frecuencia de oscilación de la señal sinusoidal para obtener la k_{TE}^o. Esto se basa en la capacidad que tiene el sistema para reaccionar frente al cambio de potencial en el tiempo. Si la frecuencia empleada es baja todas las moléculas podrán reaccionar y se observa una corriente máxima, por el contrario al elevar la frecuencia una fracción menor podrá reaccionar, y si la frecuencia empleada es mucho mayor que la k_{TE}^o, entonces ya no se observará reacción, y la corriente cae a cero. Esto se analiza en un gráfico del módulo de la corriente relativa a la corriente de base, $|i_p/i_b|$, en función de la frecuencia, ω, ver Figura 8. Entonces es necesario hallar una expresión para $|i_p/i_b|$ en términos de k_{TE}^o y ω. Si empleamos la ecuación 27 y notamos que ambas corrientes, de pico y de base, se registran para el mismo valor de potencial ($E_p = E_b$) pero que la impedancia asociada puede obtenerse mediante las expresiones halladas previamente para casos extremos, ecuaciones 35 y 36**,** hallamos la siguiente expresión para el cociente :

$$\frac{i_p}{i_b} = \frac{E_p / Z_p}{E_b / Z_b} = \frac{Z_p^{-1}}{Z_b^{-1}} = \frac{Z_{E=E^o}^{-1}}{Z_{E \neq E^o}^{-1}} = \frac{j\omega C_{DC} + (R_{TC} - j/\omega C_{AD})^{-1}}{j\omega C_{DC}} \qquad \textbf{Ecuación-37}$$

Si empleamos la ecuación 34 para incorporar la k_{TE}^o en la expresión y reordenamos se obtiene:

$$\frac{i_p}{i_b} = 1 + \frac{1}{j\frac{\omega}{2k_{TE}^o}\left(\frac{C_{DC}}{C_{AD}}\right) + \frac{C_{DC}}{C_{AD}}} \qquad \textbf{Ecuación-38}$$

Ahora solo es necesario expresar este número complejo como una parte real y otra imaginaria y tomar módulo, ecuación 29, para hallar una expresión real que vincule k_{TE}^{o} y ω. Haciendo eso se llega a la siguiente expresión:

$$\left|\frac{i_p}{i_b}\right| = \left(\frac{\left[1 + \left(\frac{\omega}{2k_{TE}^{o}}\right)^2 C^* + C^*\right]^2 + \left(\frac{\omega}{2k_{TE}^{o}}\right)^2}{\left[\left(\frac{\omega}{2k_{TE}^{o}}\right)^2 C^* + C^*\right]^2} \right)^{1/2} \qquad \textbf{Ecuación-39}$$

Donde $C^* = C_{DC}/C_{AD}$, y ω es frecuencia angular ($\omega = 2\pi\nu$). En la Figura 8 se presentan gráficos típicos del tratamiento de Creager para distintos valores de k_{TE}^{o} y C_{DC}/C_{AD}.

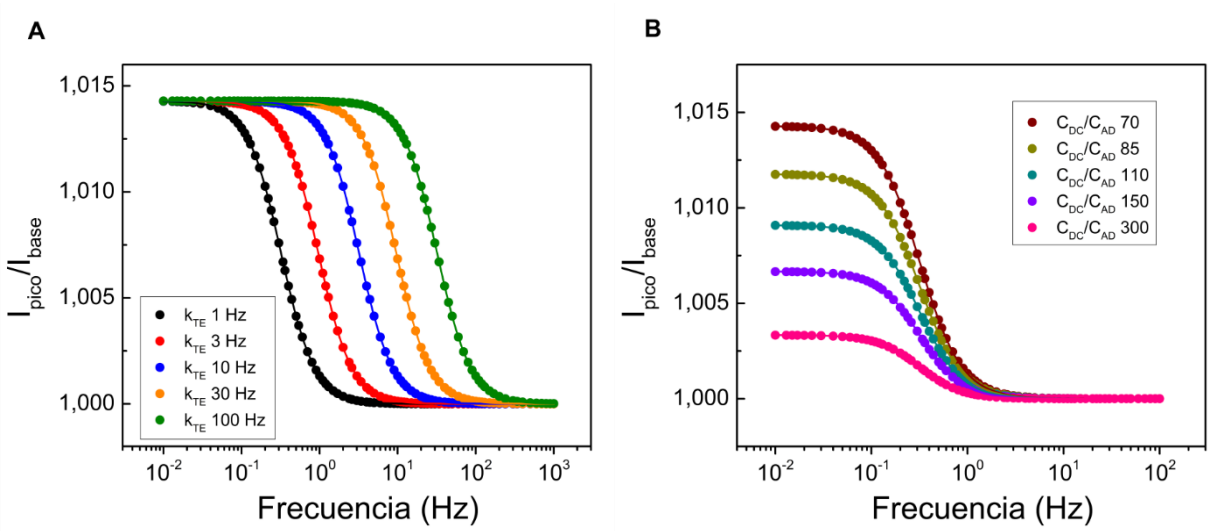


Figura 8: ***A.*** *Curvas del cociente de corrientes (i_p/i_b) en función de la frecuencia (ν) para diferentes valores de k_{TE}^{o}. Se consideró un valor fijo de 70 para el cociente de capacitancias ($C^* = C_{DC}/C_{AD}$).* ***B.*** *Se representan las mismas curvas pero a un valor fijo de k_{TE}^{o} de 1 Hz pero diferentes valores para el cociente de capacitancias. En ambos casos las curvas representan ajustes de la ecuación 39.*

Como puede observarse en la Figura 8-A, a mayores valores de k_{TE}^{o} se necesitan muestrear frecuencias cada vez mayores para lograr llevar la corriente debida a la reacción de TE a cero, es decir, llevar la i_p a valores similares a la i_b, con lo cual el cociente tiende al valor 1. Por otra parte, según como sea el cociente de capacitancias, el límite cuando la frecuencia tiende a valores muy bajos también cambiará. Específicamente, en el límite cuando $\omega \to 0$ se tiene que $|i_p/i_b| \to 1 + (C_{DC}/C_{AD})^{-1}$. Esto se observará al emplear monocapas con diferente número de metilenos, al acortar la distancia entre la superficie del electrodo y el analito, la solución en la vecindad de la superficie de la monocapa percibirá un campo eléctrico más intenso, y, por ende, habrá mayor atracción de iones desde el seno de la solución, y mayor número de cargas en doble capa iónica. En el límite en el que el valor de $C_{DC} \to \infty$ se tiene que $|i_p/i_b| \to 1$, ver Figura 8-B.

2.3- Técnicas espectroscópicas y auxiliares

2.3.1- Espectroscopia de absorción electrónica

Los espectros de absorción electrónica en la región UV-visible fueron adquiridos con un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution Array equipado con un detector de arreglo de diodos y un portacelda termostatizable. Se emplearon celdas de cuarzo de dos tipos diferentes, de paso óptico convencional (1 cm) y volumen reducido (se emplearon volúmenes de soluciones proteicas de alrededor de 400 μl), y celdas de paso óptico y volumen reducido (1 mm y 100 μl). Los espectros adquiridos fueron típicamente procesados con el programa OriginPro 8.6, y en algunos casos como la deconvolución espectral en experimentos de incorporación de ligandos exógenos se complementó el análisis con la aplicación *Solver* del Excel. El espectro de absorción en UV lejano (dicroísmo circular) presentado para la quimera *Nmar*-*Tt*-Cu_A fue adquirido por el Dr. Alcides Leguto en un espectropolarímetro Jasco-810 empleando una cubeta de cuarzo d 1 cm de paso óptico, y una concentración de 10 μM.

2.3.2- Espectroscopia Raman resonante

Los espectros Raman resonante fueron adquiridos con un espectrómetro Horiba Losha Evolution HR equipado con un microscopio confocal empleando típicamente una longitud de onda de 532 nm, aunque en algunos casos también se emplearon longitudes de onda de 633 nm y 405 nm. Se empleó un detector CCD de tipo electrodo abierto de iluminación frontal enfriado por aire, un objetivo de trabajo a distancia de 1,5 cm (50x y amplitud numérica de 0,5) y una red de difracción de 1800 ranuras por milímetro. Se utilizaron gotas de 10 μl de soluciones proteicas concentradas (en el rango 0,1 a 1 mM) congeladas y mantenidas a una temperatura de 77 K empleando un criostato Linkam THMS 600 acoplado a una fuente de nitrógeno líquido con un controlador de temperatura Linkam TMS 94. La resolución espectral expresada como incremento punto a punto fue de 0,9 y 0,5 para espectros adquiridos con 405 y 532 nm respectivamente.

2.3.3- Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR fueron adquiridos y procesados por el Dr. Alcides Leguto en colaboración con el laboratorio del Dr. Alejandro J. Vila. Se empleó un espectrómetro Bruker ER 200 equipado con un puente de microondas de banda X (frecuencia de microonda de 9,7 GHz) y un criostato Oxford de flujo continuo de helio. Los parámetros de EPR fueron los siguientes: temperatura 120 K, frecuencia de microondas 9,39 GHz, intensidad de microondas de 2 mW, modulación de la frecuencia de 100 kHz, modulación de la amplitud 4 mT. Los espectros se procesaron empelando el software Easyspin[9]. En todos los casos se empleó una solución amortiguadora 100 mM de fosfato de potasio pH 7 con una concentración de 100 mM de KCl como fuerza iónica extra.

2.3.4- Cronoamperometría

Se empleó una configuración experimental idéntica a aquella utilizada en los experimentos de voltametría cíclica de soluciones proteicas presentadas previamente en la sección 2.2.2. En esta oportunidad los electrodos de oro se recubrieron con una monocapa de cinco metilenos de largo terminadas en grupo oxhidrilos ($HS-(CH_2)_5-CH_2OH$) para prevenir la adsorción proteica sobre la superficie. Se mantuvo la temperatura constante en 298 K. Se partió de un valor de potencial de 0,6 V (vs EEH) y se aplicó un salto de potencial hacia un valor final de -0,1 V (vs EEH), y se registró la corriente a lo largo de 10 segundos. Las muestras proteicas se prepararon empleando una solución amortiguadora 10 mM de fosfato de potasio pH 7, 500 mM en KNO_3 como electrolito soporte.

2.3.5- Cálculos y simulaciones computacionales

Las simulaciones y cálculos computacionales fueron realizados por la Dra. María Ana Castro en colaboración interna. Los modelos iniciales fueron construidos *in silico* empleando como estructura de partida aquella reportada para la quimera Am-*Tt*-Cu_A (PDB 5U7N)[10]. Se reemplazó el bucle por aquel correspondiente en cada caso empleando el programa Rosetta.[11] Las estructuras resultantes fueron relajadas siguiendo un proceso de equilibrado que consistió en un paso de minimización de energía seguido de un calentamiento lento (400 ps) de 0 K a 300 K. Luego, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular (MD) de 50 ns en solvente explícito a una presión de 1 atmósfera y temperatura de 300 K, empleando un baróstato y termostato de Berendsen. Para las interacciones electrostáticas de largo alcance se emplearon condiciones de contorto periódicas y sumas de Edwald, mientras que para las interacciones directas se utilizó una distancia límite de 12 Å. Se utilizó el algoritmo SHAKE para mantener las distancias que involucran átomos de hidrógeno en sus distancias de equilibrio. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con la implementación de GPU del módulo PMEMD del paquete AMBER16.[12] Se utilizó el campo de fuerzas de Amber ff14SB para todos los residuos estándar mientras que los parámetros para el sitio de cobre se obtuvieron empleando la herramienta MCPB.py *builder* del programa AmberTools17.[13] Al contar únicamente con la estructura de la quimera Am-*Tt*-Cu_A los parámetros para el sitio de cobre se obtuvieron para el estado oxidado y reducido para esta quimera y luego fueron empleados para el resto de las proteínas. Este análisis tiene sus ventajas, al partir de las mismas constantes de fuerza en todos los casos, si hubiera diferencias en las distancias de equilibrio en los centros metálicos entre las quimeras, éstas se deberán exclusivamente a interacciones estéricas entre residuos del bucle implantado y el resto de la matriz proteica de *Tt*-Cu_A, que es una de las cosas que se pretende indagar mediante esta metodología. A partir de las DM se obtuvieron distintos parámetros estructurales promedio, así como las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) del *backbone* proteico, al área superficial accesible a solvente (ASAS) del átomo de cobre y las cadenas laterales de residuos de coordinantes, presencia de puentes de hidrógeno, empleando el módulo *cpptraj* del AmberTools17.

Se tomaron estructuras de las DM de cada sistema que fueron lentamente enfriadas a 0 K (a lo largo de 200ps) para obtener las estructuras iniciales para los cálculos híbridos QM/MM. Estos se llevaron a cabo empleando un nivel de teoría de DFT usando el código SIESTA en la implementación QM/MM del programa Hybrid. Se usó una base doble zeta más polarización para todos los átomos y valores de desplazamiento de energías de 150 Ry y 25 meV, respectivamente. Se adoptó la aproximación de espín no restringido empleando el funcional generalizado propuesto por Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE).[14] Para tratar la interfase entre las secciones QM y MM se utilizó el método llamado *scaled position link atom*. La sección QM incluye el átomo de cobre y las cadenas laterales de los residuos coordinantes, el resto de la proteína y molécula de solvente fueron tratados clásicamente usando el campo de fuerzas de Amber16. Todos los átomos incluidos en las DM fueron también incluidos en el sistema QM/MM. La optimización de geometría fue realizada a nivel QM/MM para todas las proteínas en su estado oxidado y reducido. Se simularon espectros de absorción electrónica realizando cálculos DFT dependientes del tiempo (DFT-DT) de las secciones QM del sistema, previamente optimizado en el nivel QM/MM, obteniendo las energías e intensidades de las 50 transiciones electrónicas de menor energía empleando el programa Gaussian09. [15] Se utilizó una base mixta triple-zeta/doble-zeta (TZVP) para el átomo de cobre y azufre, mientras que se usó una base 6-31G* para el resto de los átomos.

2.4- Referencias

[1] C.E. Slutter, D. Sanders, P. Wittung, B.G. Malmström, R. Aasa, J.H. Richards, H.B. Gray, J.A. Fee, Water-Soluble, Recombinant CuA-Domain of the Cytochrome ba3 Subunit II from Thermus thermophilus, Biochemistry. 35 (1996) 3387–3395. https://doi.org/10.1021/bi9525839.

[2] R.F. Carvalhal, R. Sanches Freire, L.T. Kubota, Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation, Electroanalysis. 17 (2005) 1251–1259. https://doi.org/10.1002/elan.200403224.

[3] F.J. Ansuini, J.R. Dimond, Factors affecting the accuracy of reference electrodes, (1994). https://www.osti.gov/biblio/80091 (accessed March 2, 2022).

[4] Engel Thomas, Reid Philip, Química Física, Pearson Education S.A., Ribera del Loira 28, 28042 Madrid, 2006.

[5] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. 101 (1979) 19–28. https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80075-3.

[6] A.J. Bard, L.R. Faulkner, H.S. White, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, 2022.

[7] S.E. Creager, T.T. Wooster, A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers, Anal. Chem. 70 (1998) 4257–4263. https://doi.org/10.1021/ac980482l.

[8] J.J. Sumner, K.S. Weber, L.A. Hockett, S.E. Creager, Long-Range Heterogeneous Electron Transfer Between Ferrocene and Gold Mediated By n-Alkane and N-Alkyl-Carboxamide Bridges, J. Phys. Chem. B. 104 (2000) 7449–7454. https://doi.org/10.1021/jp000992v.

[9] S. Stoll, A. Schweiger, EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, Journal of Magnetic Resonance. 178 (2006) 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013.

[10] A. Espinoza-Cara, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, S. Klinke, L.H. Otero, D.H. Murgida, A.J. Vila, Engineering a bifunctional copper site in the cupredoxin fold by loop-directed mutagenesis, Chem. Sci. 9 (2018) 6692–6702. https://doi.org/10.1039/C8SC01444B.

[11] A. Stein, T. Kortemme, Improvements to Robotics-Inspired Conformational Sampling in Rosetta, PLoS One. 8 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063090.

[12] R. Salomon-Ferrer, A.W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R.C. Walker, Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald, J. Chem. Theory Comput. 9 (2013) 3878–3888. https://doi.org/10.1021/ct400314y.

[13] P. Li, K.M. Merz, MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder, J. Chem. Inf. Model. 56 (2016) 599–604. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674.

[14] Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M., Generalized gradient approximation made simple., Physical Review Letters. 77 (1996) 3865.

[15] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

Capítulo 3

Metaloproteínas artificiales conteniendo sitios de cobre de Tipo 1 y Tipo 2.

3.1- Introducción

Como se adelantó en el Capítulo 1 son muy variados los sitios activos que se conforman a partir de átomos de cobre. Y su clasificación más común se plantea en función de las características generales de su coordinación. 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 (TE). El primer grupo incluye a los sitios de cobre T2 entre otros, y en el segundo podemos encontrar a los sitios de cobre T1 y de Cu_A. Si bien, como ya veremos existen subgrupos dentro de esta clasificación, estos serán los tres grupos más importantes en este trabajo de tesis.

3.1.1- Las proteínas azules de cobre

Los sitios de cobre T1 se encuentran en su mayoría en proteínas llamadas proteínas azules de cobre (en inglés *"blue copper proteins" o "BCP"*), que obviamente deben su nombre a su intenso color azul. Han sido encontradas en representantes de los tres dominios de la vida, *Bacteria*, *Arquea* y *Eucaria*. Notablemente a pesar de la gran variabilidad en las secuencias aminoacídicas de distintas proteínas (homología de secuencia $< 20\%$) todas ellas presentan un patrón estructural similar, conocido como plegamiento tipo cupredoxina, Figura-1. Este plegamiento, que es compartido con algunos sitios de Cu_A (proteínas púrpura de cobre) y otras relacionadas, consta de un β-sandwich (un tipo de barril-β) formado típicamente por alrededor de ocho hebras-β antiparalelas que puede estar acompañado o no por segmentos conteniendo hélices-α, Figura-2.[1] En las últimas décadas ha habido un gran interés en dilucidar la relación entre este tipo de plegamiento y la optimización/modulación de la TE. Si bien son muy abundantes y variados los ejemplos de proteínas con sitios T1, sólo se conoce la función biológica de un grupo bastante limitado[2], y en todos los casos el sitio T1 participa como un intermediario de un proceso de TE donde las interacciones con su proteína diana biológica son generalmente vía la formación de complejos transitorios.[3–7]

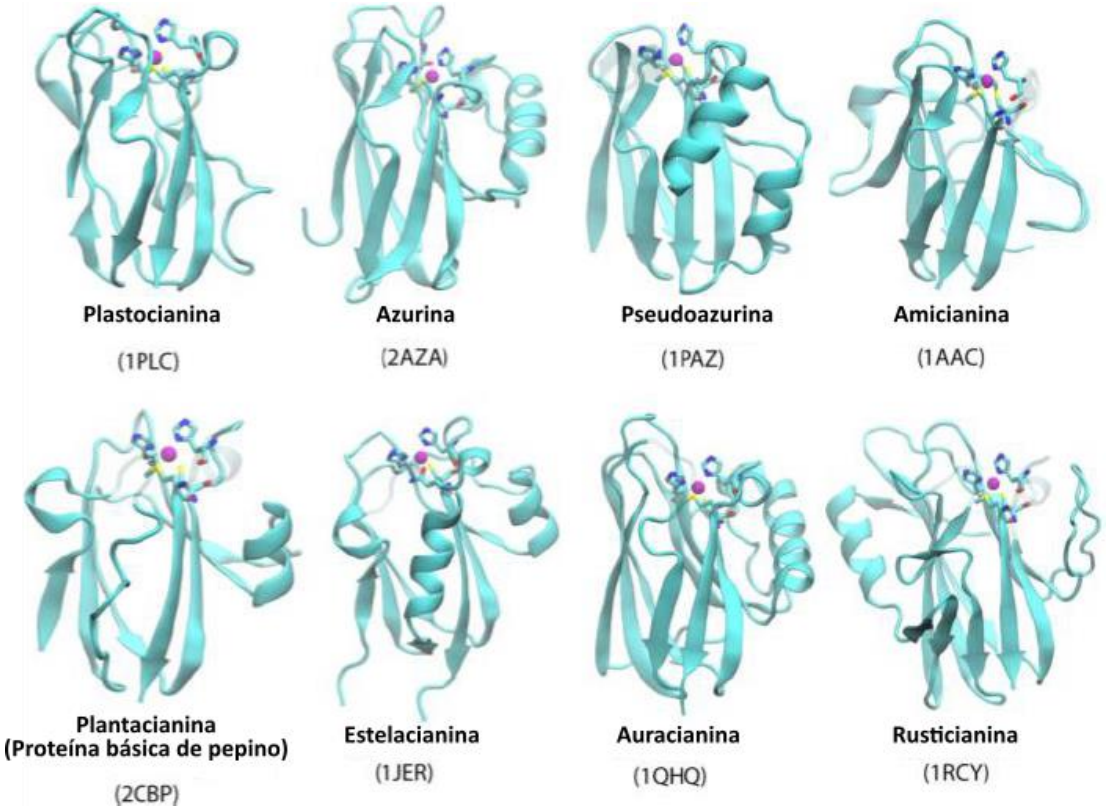


Figura 1: *(Figura adaptada de Liu et al. 2014*[8]*) Representación de la estructura cristalográfica de distintos ejemplos de proteínas azules de cobre con sus respectivos códigos pdb. La inspección visual de estas estructuras revela un patrón transversal todas ellas: el plegamiento cupredoxina.*

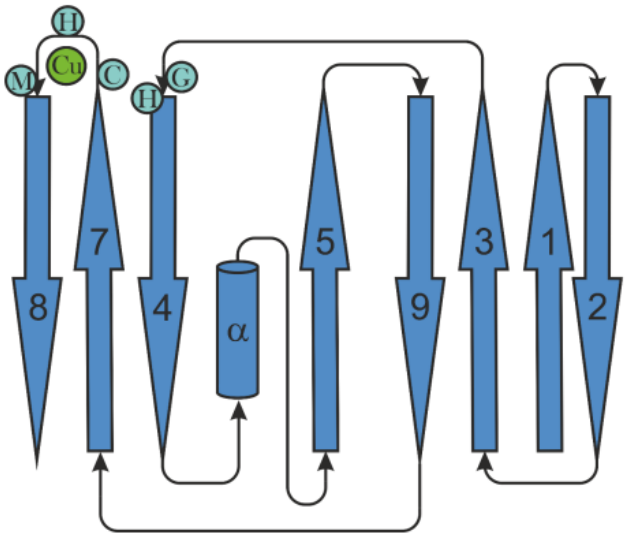


Figura 2: *Representación esquemática de la topología de la estructura secundaria de Azurina como ejemplo del plegamiento cupredoxina. Se encuentra indicado la posición del sitio de cobre y los residuos coordinantes.*

El sitio metálico normalmente se encuentra en uno de los extremos de la estructura proteica donde el átomo de cobre es coordinado por, típicamente, tres residuos que se encuentran posicionados sobre uno de los bucles y un cuarto ligando proveniente del interior de la estructura proteica. Un sitio T1 canónico estará coordinado por tres residuos muy conservados, dos histidinas, una cisteína, y normalmente se suele observar que la esfera de coordinación se completa con un cuarto ligando más débil, siendo un residuo metionina en la gran mayoría de los casos, Figura-3-B. Curiosamente una de las proteínas azules más estudiadas, la Azurina, presenta un sitio T1 poco convencional, ya que es el único sitio T1 azul pentacoordinado conocido, donde un carbonilo amídico se una al cobre axialmente en posición opuesta a la metionina, Figura-3-B. En el resto de los sitios T1 conocidos el oxígeno carbonílico se encuentra muy lejos del átomo de cobre como para ser considerado parte de la esfera de coordinación ($> 4\text{Å}$). Como veremos más adelante, existen sitios mononucleares de cobre pentacoordinados, pero estos presentan propiedades estructurales, espectroscópicas y funcionales muy diferentes de manera invariable que lleva a ser clasificados bajo otra categoría de sitios. A estos sitios se los conoce como sitios de cobre T2 y suelen presentar actividad catalítica, actuando en conjunto con sitios T1 u otros que participan como dadores de electrones. También es posible hallar residuos glutamina reemplazando a la metionina típica, tal como ocurre en los sitios T1 de umecianina (perteneciente a un subgrupo de sitios T1 específico de plantas: fitocianinas[9]) y de auracianinas[10], o residuos con cadenas laterales hidrofóbicas no coordinantes como la leucina, valina o fenilalanina, como en sitios T1 hallados en alguna plantacianinas, ceruloplasminas y en las lacasas fúngicas, Figura 3-B

A pesar de estar próximos 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.[11]

Los residuos que conforman el sitio que se encuentran en el bucle se ubican en posiciones internas o adyacentes al mismo justo en la intersección entre el bucle y el comienzo de la hebra-β. Normalmente, los residuos que delimitan el bucle son la cisteína y el residuo metionina (u otro axial) quedando un residuo histidina en medio de la secuencia del bucle. El residuo histidina restante proviene del interior del barril-β, siendo el primer residuo (en sentido N-terminal $\rightarrow$ C-terminal) de la cuarta hebra-β, Figura 2. Algunos autores suelen referirse a este bucle como el "bucle ligante" y presenta el siguiente motivo Cis-$(Xxx)_n$-His-$(Xxx)_m$-Met donde n y m pueden adoptar los número 2, 3 y 4 en la mayoría de estas proteínas. Por lo tanto, este bucle presenta variabilidad tanto en la identidad de sus residuos como en su longitud. También existen casos en los que los valores de n y m pueden ser aún mayores, como es el caso del bucle hallado en la Nitrito reductasa (NiR), donde son ocho residuos los que se encuentran entre la cisteína y la histidina.[12]

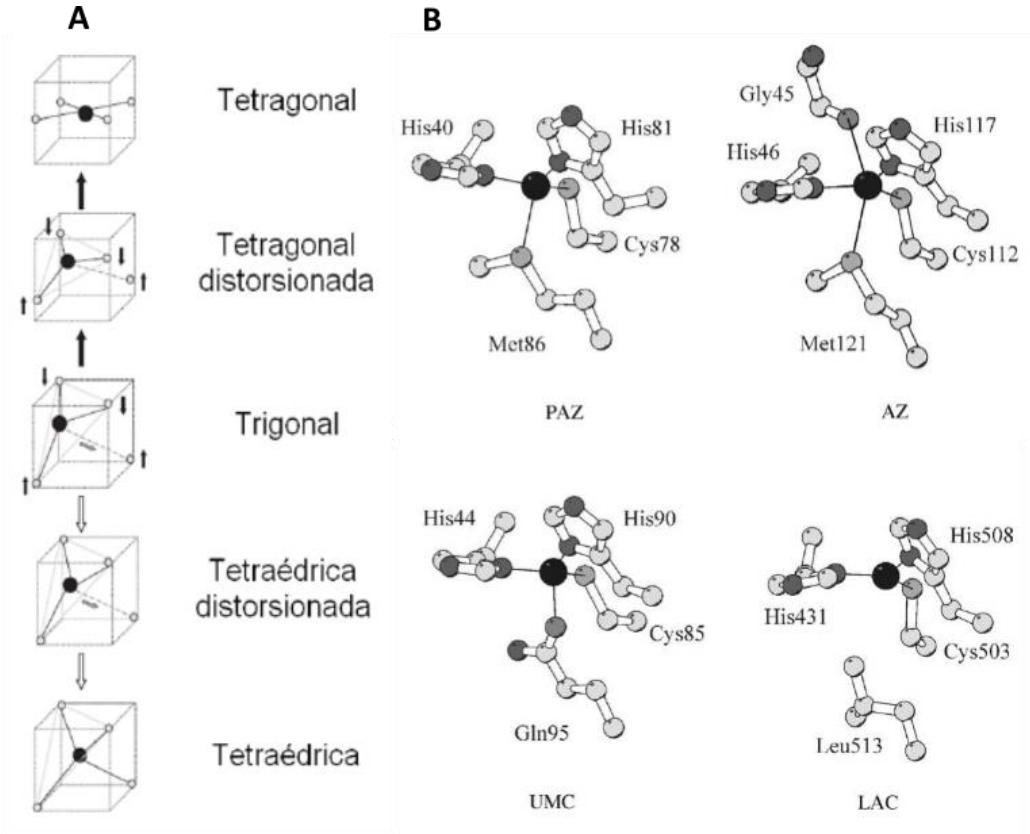


Figura 3: *(Figura adaptada de Dennison 2005[2])* ***A.*** *Diagrama de las principales geometrías halladas en los sitios T1 y T2,* ***B.*** *Estructura de la primera esfera de coordinación de sitios T1 encontrados comúnmente en la naturaleza, indicando la identidad de los residuos coordinantes. Específicamente, se presentan los sitios de Pseudoazurina (PAZ), Azurina (AZ), Umecianina (UMC) y Lacasa (LAC).*

Las geometrías que adopten los sitios T1 quedan delimitadas por dos geometrías extremas, la plano cuadrado (tetragonales) y la tetraédrica, quedando determinadas según la fuerza (y cantidad) del ligando axial, así como también de las restricciones estéricas que imparta la matriz proteica circundante, Figura 3-A. Generalmente los sitios que carecen de ligando axial adoptan una geometría plana trigonal, donde los tres ligando ecuatoriales (nitrógenos de las dos histidinas y el azufre de la cisteína) definen un plano NNS en el que se inserta el cobre. Aquellas proteínas que presenten un residuo coordinante axial (metionina, glutamina u otro) que comparta densidad electrónica con el cobre lo sacará del plano NNS deformando tetraédricamente la geometría del sitio. En el caso de Azurina, que presenta un segundo ligando axial, se adopta una geometría bipiramidal trigonal (no simétrica), donde el carbonilo contrarresta en cierto grado el efecto de la metionina.

Sin lugar a dudas, la característica estructural más destacada de los sitios T1 es la corta distancia Cu-S_{cis} en comparación con aquella observada en complejos inorgánicos. Esta distancia presenta valores entre 2,07 y 2,26 Å en las distintas proteínas estudiadas. Este hecho se encuentra estrechamente vinculado con las restricciones estéricas impuestas por la matriz proteica, y diversos estudios sugieren que la red de puentes hidrógeno a lo largo de residuos de segunda y primera esfera de coordinación cumplen un rol determinante en ese sentido.[8,13,14] Por su parte, las distancias Cu-N_{His} suelen presentar valores típicos para este

tipo de enlaces, en torno a los 2,0 Å. Es curioso el hecho de que ambas histidinas ligantes coordinen al cobre a través de sus Nδ, en contraste con lo observado en sitios T2, donde las histidinas involucran a su Nε. Por último, pero no por eso menos importante como se verá en breve, las distancias típicas halladas para el enlace Cu-S_{Met} puede variar entre 2,6 y 3,2 Å.[8] Otro aspecto estructural llamativo es que los ángulos diedros Cu-S_{Cis}-C_β-C_α y S_{Cis}-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 Cu-S_{Cis}, la cadena lateral de la cisteína y su orientación respecto del esqueleto proteico. A partir de medidas de EXAFS y estructura resueltas por DRX se pudieron determinar las variaciones geométricas asociadas con la reducción del sitio, las cuales resultan llamativamente bajas, observándose en promedio un aumento de 0,08 Å en la distancias Cu-S_{Cis} y de 0,06 Å en ambas distancias Cu-N_{His}.[15–18] Cambios geométricos tan pequeños entre ambas formas redox son consistentes con un bajo valor de energía de reorganización (λ) asociada a la reacción de TE, factor determinante para la eficiencia en el rol fisiológico que desempeñan estas proteínas.[19] Esta hipótesis, denomina de estado entático, propone que la matriz proteica cumple un rol preponderante en la determinación de la geometría del sitio y por ende de sus propiedades espectroscópicas, electrónicas y funcionales.[20–22] El hecho de que las estructuras reportadas de distintas apoproteínas T1 (sin el átomo metálico) conserven su orientación y la geometría general de los ligandos del sitio activo (aunque con mayor movilidad claro) con cambios entre 0,1-0,3 Å apoyan el modelo de estado entático.[23–25]

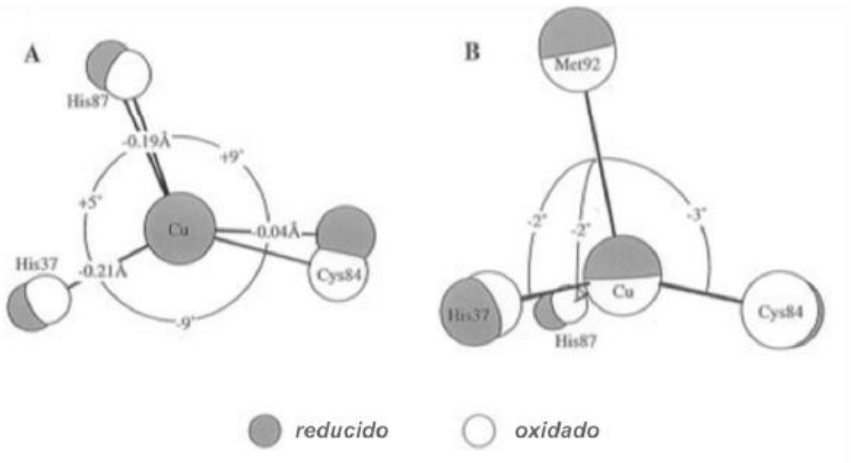


Figura 4: *(Figura adaptada de Holm et al 1996)*[15] *Diferencias geométricas de la primera esfera de coordinación del sitio T1 de la Plastocianina entre su estado reducido (círculos llenos) y su estado oxidado (círculos vacíos).* ***A.*** *Distancias de enlace y ángulos de ligandos del plano ecuatorial.* ***B.*** *Ángulos formados entre cada ligando ecuatorial con el azufre metionínico.*

3.1.2- Descripción electrónica de los sitios T1

En su descripción electrónica el átomo de cobre pone en juego cinco orbitales d en su capa de valencia, que en un campo de ligandos 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. 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 estaría coordinando moléculas de agua muy alejadas) y una contracción ecuatorial (donde se disponen los cuatro cloruros) generando una geometría plana tetragonal (o cuadrada), Figura 5-A. En el diagrama de OA del cobre en este campo de ligandos, 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 cloruros, lo cual maximiza la interacción antiligante de tipo σ^*, Figura 5-A. Por su parte, cada cloruro posee un orbital p orientado en la dirección del Cu, y solapa de manera frontal con los lóbulos del orbital $d_{x^2-y^2}$, con lo cual se denominará 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 relativo del 61% y un 39% proveniente de la contribución efectiva de los cuatro orbitales p_σ de los cloruros, Figura 5-B.[19]

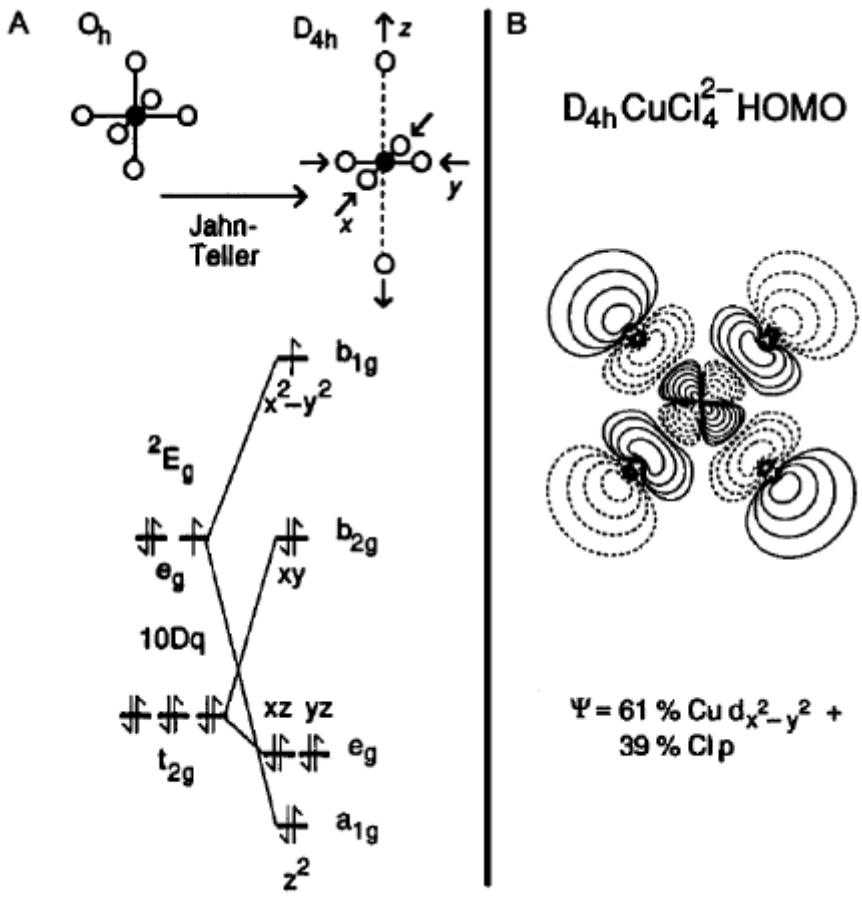


Figura 5: *(Figura adaptada de Solomon et al 2006)*[26] ***A.*** *Efecto de distorsión de Jahn-Teller sobre la geometría, simetría y energía de los OAs del cobre en un campo de ligando octaédrico.* ***B.*** *Representación esquemática de la combinación del OA Cu $d_{x^2-y^2}$ con los cuatro OA Cl p_σ en el complejo $CuCl_4^{-2}$*,y la clásica descripción electrónica del HOMO.

Los dos orbitales p restantes de cada cloruro se encuentran orientados de manera perpendicular a la dirección de unión Cu-Cl, razón por la cual experimentan una interacción de tipo π con los orbitales d del cobre, Figura 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 señales es proporcional a la superposición de los OA involucrados en cada una, por lo tanto, en el espectro de absorción electrónica la banda de $Cl\ p_\sigma \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$ resulta más intensa que la banda $Cl\ p_\pi \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$, Figura 6-B. En regiones menos energéticas se observan bandas correspondientes a transiciones de campo ligando ($d \rightarrow d$), es decir, entre orbitales ocupados del cobre al orbital semilleno $d_{x^2-y^2}$. Estas bandas se ubican en regiones menos energéticas del espectro y además son menos intensas, por ser transiciones prohibidas, Figura 6-C.

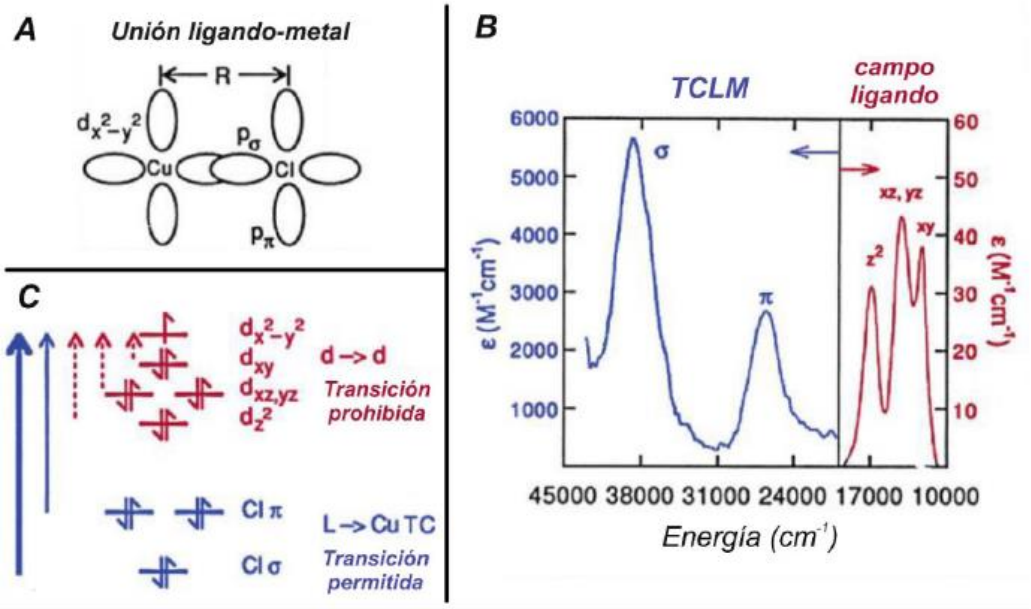


Figura 6: *(Figura adaptada de Solomon et al 2004)*[19] ***A.*** *Representación esquemática de la interacción entre el OA Cu $d_{x^2-y^2}$ con un OA Cl p_σ y con OA Cl p_π en el complejo $CuCl_4^{-2}$.* ***B.*** *Espectro de absorción electrónico del $CuCl_4^{-2}$, donde se observan las bandas correspondientes a las TCLM $Cl\ p \rightarrow Cu\ d_{x^2-y^2}$ de carácter σ y π (azul) y las transiciones $d \rightarrow d$ (rojo).* ***C.*** *Representación esquemática de esas mismas transiciones en un diagrama de OM. Las flechas más gruesas indican transiciones más probables (mayor épsilon) y las flechas más largas indican transiciones más energéticas.*

Como se comentó previamente, los sitios T1 presentan una geometría bastante alejada de una tetragonal plana como en el complejo $CuCl_4^{-2}$, en cambio presentan una geometría tetraédrica distorsionada o axial, dependiendo de la interacción del cobre con todos sus ligandos. En esas geometrías la distancia Cu-S_{Cis} es particularmente corta, lo que implica una fuerte interacción de carácter covalente, lo que se traduce para su forma oxidada en una densidad de espín desapareado deslocalizada ahora en ambos átomos, Cu y S. A partir de

estudios de absorción de rayos X (XAS) y de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en combinación con cálculos computacionales QM se determinó la contribución del cobre y sus ligandos ecuatoriales al HOMO para el sitio T1 de Plastocianina. Estos estudios indican contribuciones de 42%, 38%, 4% y 4% para los átomos de Cu, S_{cis} y ambos N_{His}, respectivamente, con un 12% restante correspondiente a contribuciones minoritarias de otros átomos próximos, Figura 7.

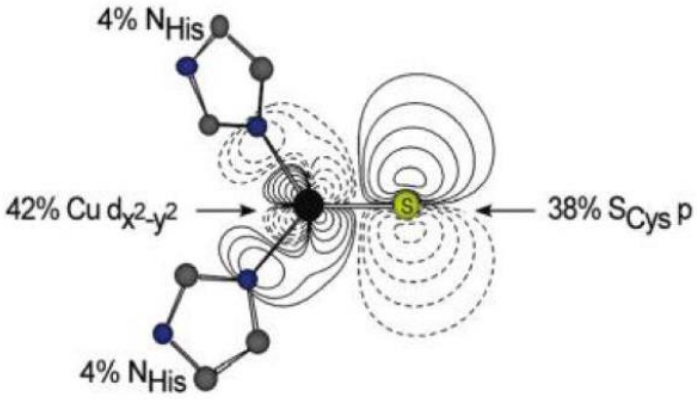


Figura 7: *(Figura adaptada de Solomon et al 2006)*[26] *Superficie de isodensidad de la función de onda del HOMO en el sitio T1 de la Plastocianina y la contribución porcentual de cada átomo, obtenido a partir de cálculos DFT refinados con datos experimentales de XAS y EPR.*

En conjunto, la disposición particular de los ligandos y la corta distancia Cu-S_{Cis} resultan determinantes en la orientación relativa de los orbitales del átomo de cobre y azufre cisteínico (su ligando más fuerte). Tal como puede verse en la Figura 7 la orientación lleva a que los *OA Cu* $d_{x^2-y^2}$ y *Cl p* solapen casi enteramente de forma lateral, llevando a un interacción con fuerte carácter π. De este modo, en estos centros metálicos la TCLM S_{cis} $p_\sigma \rightarrow$ Cu $d_{x^2-y^2}$ ($S_{cis}\sigma \rightarrow$Cu) será mucho menos intensa que aquella S_{cis} $p_\pi \rightarrow$ Cu $d_{x^2-y^2}$ ($S_{cis}\pi \rightarrow$Cu), al contrario de lo observado en $CuCl_4^{-2}$. Dado que la banda $S_{cis}\pi \rightarrow$Cu se presenta hacia los 600 nm ($\approx$16700 cm^{-1}) y domina el espectro UV-visible, las proteínas que contienen estos sitios poseen un intenso color azul. En la Figura 8 se presenta un espectro de un sitio T1 típico, el de Plastocianina.[19]

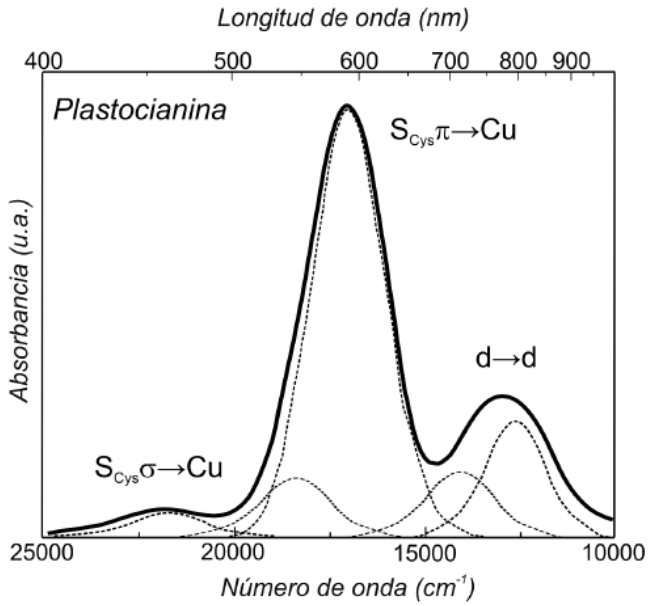


Figura 8: *Espectro de absorción electrónica de la Plastocianina (línea entera) y su deconvolución (líneas punteadas). La banda dominante hacia los 17000 cm^{-1} corresponde a la TCLM $S_{cis}\pi \rightarrow Cu$, y la banda menos intensa corresponde a la TCLM $S_{cis}\sigma \rightarrow Cu$.*

3.1.3- El modelo de distorsión acoplada

El color azul característico que presentan tantas proteínas con sitios T1, o lo que es lo mismo, un espectro de absorción UV-visible dominado por una banda en torno a los 600 nm, es 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 vimos hace un momento. Sin embargo, existen diversos ejemplos de proteínas con sitios T1 con el mismo conjunto de ligandos que exhiben un color verde, como los casos de Pseudoazurina (PAz), proteína básica del pepino (CBP), Nitrito reductasa (NiR), entre otras. El color diferente de estas proteínas es consecuencia de la presencia de una banda hacia los 450 nm en el espectro UV-visible, de intensidad similar o superior a la banda de TCLM $S_{cis}\pi \rightarrow Cu$ (600 nm) de proteínas con tonalidades azules, Figura 9. A partir de un esquema comparativo con el espectro de Plastocianina y una batería de técnicas espectroscópicas y computacionales se asignó la banda en 450 nm como TCLM $S_{cis}\sigma \rightarrow Cu$.[27] La orientación relativa de los OA involucrados en la interacción $S_{cis} \rightarrow Cu$ está directamente vinculada con la intensidad de esas dos bandas TCLM, indicando que en los sitios verdosos el OA Cu $d_{x^2-y^2}$ se encuentra rotado respecto de su orientación en los sitios azules.

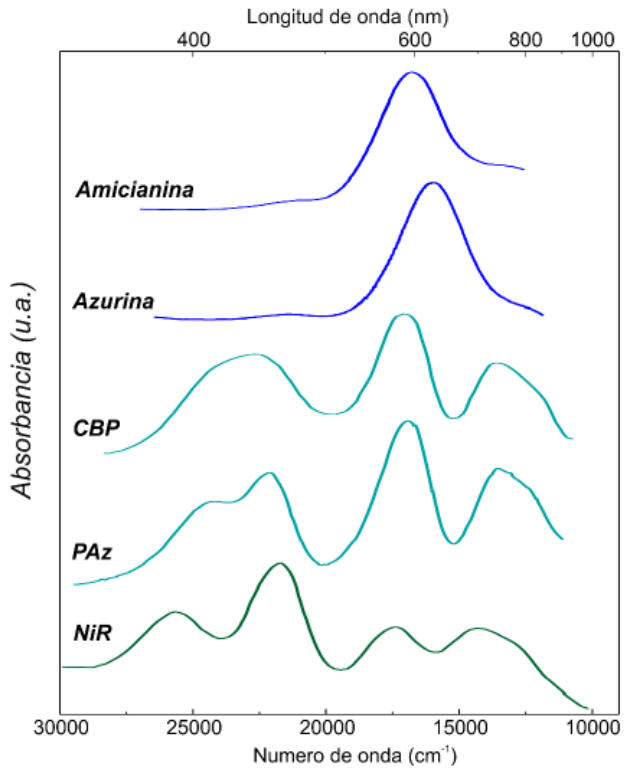


Figura 9: *Espectros de absorción electrónica de distintas proteínas T1 que van desde centros azules a verdes. De arriba hacia abajo se muestran los espectros de Amicianina, Azurina, CBP, PAz y NiR.*

Los diversos resultados espectroscópicos (Raman resonante, EPR, XAS, etc) sumado a el análisis de estructuras cristalográficas permitieron lograr una descripción electrónica de los distintos sitios T1. Los sitios T1 que tienden a una geometría tetragonal, denominados sitios T1 rómbicos (o verdes) en contraposición a los sitios axiales (o azules), presentan enlaces Cu-S_{Cis} más débiles, con distancias ligeramente más largas y de mayor carácter σ que los sitios axiales. Esta tendencia llevó a una interpretación generalizada de los factores estructurales que determinan las propiedades espectroscópicas: el modelo distorsión acoplada propuesto por el Dr. Solomon. Este modelo destaca el cambio simultáneo de tres factores o parámetros estructurales conforme se va de un sitio T1 azul a uno verde:

1. Un incremento de la distancia del enlace Cu-S_{Cis} (> a 0,1 Å si se comparan Azurina y NiR)
2. Una disminución de la distancia del enlace Cu-S_{Met} (> a 0,3 Å para el mismo par)
3. Una rotación del plano S_{Cis}-Cu-S_{Met} hacia el plano N_{His}-Cu- N_{His}.

La interacción intensificada entre el azufre de la metionina y el cobre debilita a su vez la interacción entre el azufre de la cisteína y el cobre, aumentando su distancia y llevando al sitio hacia una geometría tetragonal. Al calcular cómo lucen los OA Cu $d_{x^2-y^2}$ y OA S_{cis} p se verifica una rotación entre ellos que lleva a un solapamiento con mayor carácter σ y menor carácter π, Figura 10.

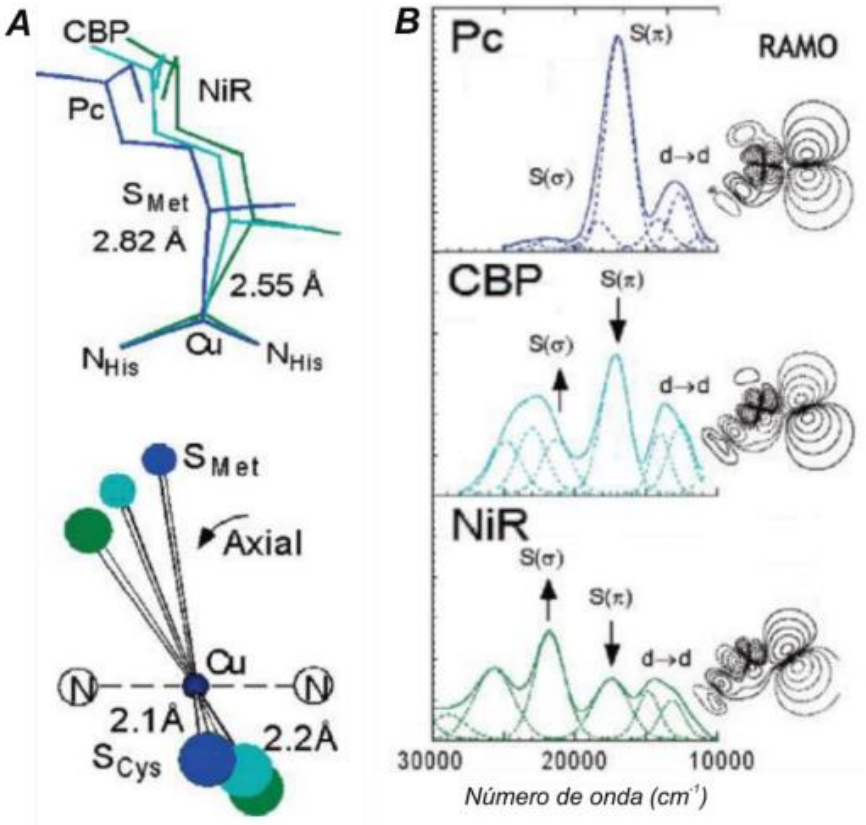


Figura 10: *(Figura adaptada de Solomon y Hadt et al 2011*[28]*) Características del modelo de distorsión acoplada a partir de la comparación de datos experimentales de Plastocianina, CBP y NiR.* ***A.*** *Geometría de los tres sitios T1, se ve un aumento de la distancia Cu-S_{Cis} y un acortamiento de la distancia Cu-S_{Met} de forma simultánea con una rotación de los planos S_{Cis}-Cu-S_{Met} y N_{His}-Cu- N_{His} hacia una geometría tetragonal.* ***B****. Los cambios geométricos en A lleva a una rotación de los OA Cu $d_{x^2-y^2}$ y OA S_{cis} p lo que se encuentra acoplado a un cambio de intensidades de las bandas características de los espectros de estos sitios metálicos.*

Esta distorsión no termina con los sitios T1 verdes, sino que es posible encontrar sitios aún más distorsionados, donde su enlace Cu-S_{Cis} *es* de carácter σ casi en su totalidad, y son los sitios de cobre de tipo 2. Como se comentó en el Capítulo 1 esta clase presenta una coordinación mucho más variable que los sitios T1, pero cuando existe una cisteína presente en su coordinación dan espectros con tonalidades que van del rojo al amarillo, debido a una fuerte banda en torno a los 390 nm. Dado que usualmente se presentan pentacoordinados y esto implica un incremento de la fuerza del campo de ligandos, todas las bandas de su espectro UV-visible presentan corrimientos al azul, Figura 11. Estos sitios constituyen el caso más extremo de distorsión tetragonal bajo el modelo de distorsión acoplada.

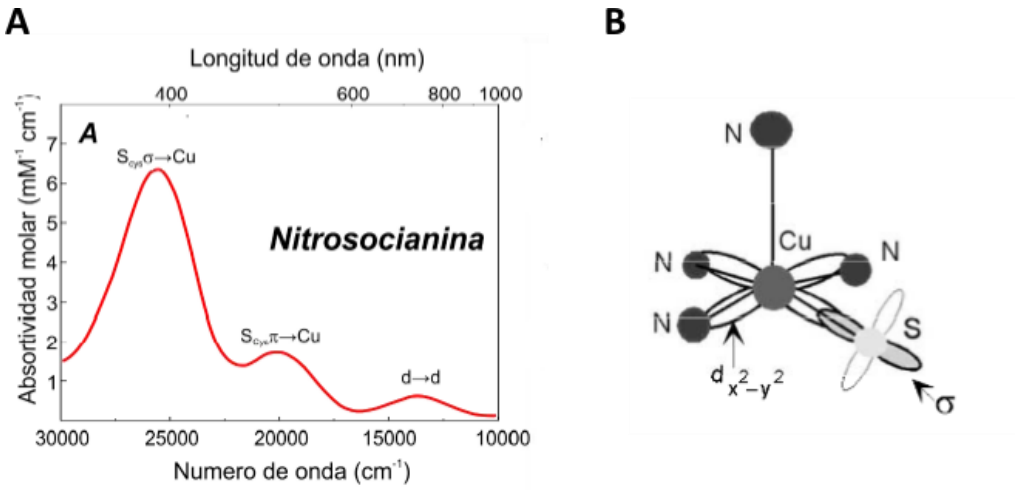


Figura 11: *(Figura adaptada de Basumalik et al 2002 y 2005)*[29,30] ***A.*** *Espectro de absorción electrónica del sitio de cobre T2 presente en la Nitrosocianina donde se observa una situación en la que la intensidad de la banda de TCLM $S_{cis}\sigma \rightarrow Cu$ es fuertemente predominante.* ***B.*** *Esquema que ejemplifica el tipo de solapamiento orbital entre OA Cu $d_{x^2-y^2}$ y OA S_{cis} p.*

3.2- Generación de proteínas quimeras empleando la matriz del dominio de Cu_A de *Thermus thermophilus*

El desarrollo y estudio de sistemas quiméricos ya sea de sitios T1 o de sitios de Cu_A conducidos por el Dr. Dennison[2,31,32] y el Dr. Lu[33], entre otros tantos, motivaron el diseño de proteínas quimeras donde a diferencia de aquellos trabajos pioneros ahora se reconstruirán sitios mononucleares de cobre en una matriz que naturalmente alberga un sitio de Cu_A. Se anticipa que emplear una matriz proteica que naturalmente fue optimizada para albergar y modular las propiedades de un sitio binuclear de cobre lleve a la generación de sitios metálicos con propiedades diferentes de las encontradas en los sistemas silvestres o nativos.
Puntualmente, la mutación consiste en el reemplazo de la secuencia que contiene los residuos que conforman el sitio de Cu_A, que en las cupredoxinas se posiciona formando un bucle que conecta dos hebras-β contiguas, por secuencias foráneas. Mediante la estrategia de ingeniería de bucles se introdujeron distintos tipos de bucles provenientes de distintas proteínas en distintos organismos, tanto procariotas como eucariotas. La secuencia aminoacídica de los bucles implantados difiere en su composición y cantidad de residuos, Tabla-1. Así se logró generar una colección de metaloproteínas de cobre que como trataremos a lo largo de esta tesis presentan propiedades novedosas emergentes de la interacción entre el bucle implantado y la matriz proteica, que fueron trasladados al sitio metálico.

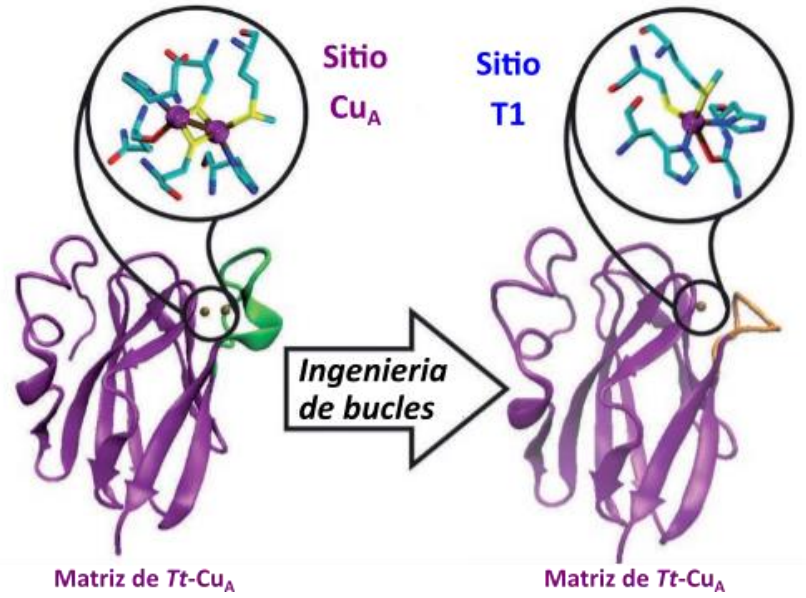


Figura 12: *Representación esquemática de la generación de proteínas quimeras con sitios T1 en la matriz proteica del dominio soluble de la citocromo c oxidasa (CcO) que alberga el sitio de Cu_A (Tt-Cu_A) mediante ingeniería de bucles.*

Tabla-1: *Detalle de los bucles reemplazados en la matriz de Cu_A de Thermus thermophilus.*

Variante	Origen del bucle		Secuencia	Longitud
	Organismo	Proteína		
Tt-Cu_A	*Thermus thermophilus*	Fragmento soluble de CcO	CNQYCGLG--HQ-N-M	12
Am-*Tt*-Cu_A	*Paracoccus denitrificans*	Amicianina	CT-P------HP-F-M	7
Nmar-*Tt*-Cu_A	*Nitrosopumilus maritimus*	*Nmar*1307	CSF-------HP-W-R	7
2R2R- *Tt*-Cu_A	---	---	CR-R------HR-R-M	7
Pc-*Tt*-Cu_A	*Spinacea oleracea*	Plastocianina	CS-P------HQGAGM	9
PAz-*Tt*-Cu_A	*Alcaligenes faecalis*	Pseudoazurina	CT-P------HYAMGM	9
Az-*Tt*-Cu_A	*Pseudomonas aeruginosa*	Azurina	CTFP-G----HS-ALM	10
4A3A-*Tt*-Cu_A	---	---	CAAA-A----HA-AAM	10
Rc-*Tt*-Cu_A	*Thiobacillus ferrooxidans*	Rusticianina	CQIP-G----HAATGM	11
CBP-*Tt*-Cu_A	*Cucumis sativus*	Proteína básica del pepino (CBP)	CNFP-G----HCQSGM	11
NiR-*Tt*-Cu_A	*Achromobacter xylosoxidans*	Nitrito reductasa	C-APEGMVPWHVTSGM	15

3.3-Caracterización espectroscópica

3.3.1-Espectroscopia de absorción electrónica

Con el fin de interrogar en detalle el sistema se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas que reportan distintos aspectos tanto de la estructura electrónica como de la geometría global del centro metálico, las cuales están íntimamente relacionadas. En este sentido la espectroscopia de absorción electrónica de radiación UV-visible, ha sido muy utilizada como reportera de estas distorsiones geométricas. Como se comentó antes, los sitios de cobre de T1 canónicos o axiales, se caracterizan por una fuerte absorción alrededor de los 16600 cm^{-1} (600 nm), con coeficientes de absorción molar del orden de 3000-6000 M^{-1} cm^{-1} responsable de su intenso color azul. Los sitios T1 distorsionados, llamados sitios rómbicos, presentan una señal intensa extra en torno a los 22200 cm^{-1} (450 nm) con coeficientes de absorción molar del orden de 1500-3500 M^{-1} cm^{-1}, lo que va de la mano de una menor intensidad de la banda de 600 nm, lo que da cuenta su color verdoso. Distintas combinaciones en la intensidad de estas dos bandas llevan a que estas proteínas presenten distintas tonalidades entre el azul y el verde intenso. Ambas bandas fueron asignadas a la transferencia de carga ligando-metal (TCLM) del sulfuro de la cisteína al átomo de cobre, $S_{cis} \rightarrow Cu^{+2}$ [27,34,35] y las diferencias en sus intensidades relativas fueron racionalizadas en términos de un solapamiento diferencial entre los orbitales 3p del átomo de azufre y los orbitales d del cobre. Dado que esta diferencia en el solapamiento orbital ocurre en simultáneo con cambios geométricos específicos del centro metálico como ser 1) un acortamiento de la distancia S_{Met}-Cu^{+2}, 2) un alargamiento de la distancia S_{Cis}-Cu^{+2} y 3) una distorsión tetragonal, es decir una gradual conversión desde una geometría axial o tetraédrica hacia una plano-cuadrada, esta racionalización se denominó modelo de distorsión acoplada.[19,28,36]

Todas las quimeras estudiadas en esta Tesis presentan distintas tonalidades de verde, yendo desde un verde intenso hasta un verde más pardo, lo que sugiere fuertes distorsiones a nivel del sitio de cobre, que involucran cambios en el solapamiento S_{Cis}-Cu^{+2}. En la Figura-13 se presentan los espectros para las quimeras junto a los espectros de las proteínas silvestres que comparten el mismo bucle ligando. Los espectros de las proteínas silvestres se ordenaron de acuerdo al grado de distorsión del sitio metálico. Una de las características más notables es que los espectros de las quimeras no siguen la misma tendencia que esos espectros en cuanto a la relación de intensidades de las bandas 450 y 600 nm, lo que indica, *a priori*, que la información para tales distorsiones no se encuentra únicamente y/o principalmente codificada en el bucle, ni en su longitud ni en su secuencia. Por otro lado, los espectros de las quimeras presentan mayor similitud entre sí que los espectros de las variedades silvestres, sugiriendo un efecto importante de la matriz de *Tt*-Cu_A. Todos ellos presentan un solapamiento de dos bandas en la región de 400-450nm, las que fueron asignadas a bandas TCLM $S_{Met} \rightarrow Cu^{+2}$ y σ-$S_{cis} \rightarrow Cu^{+2}$, respectivamente[37].

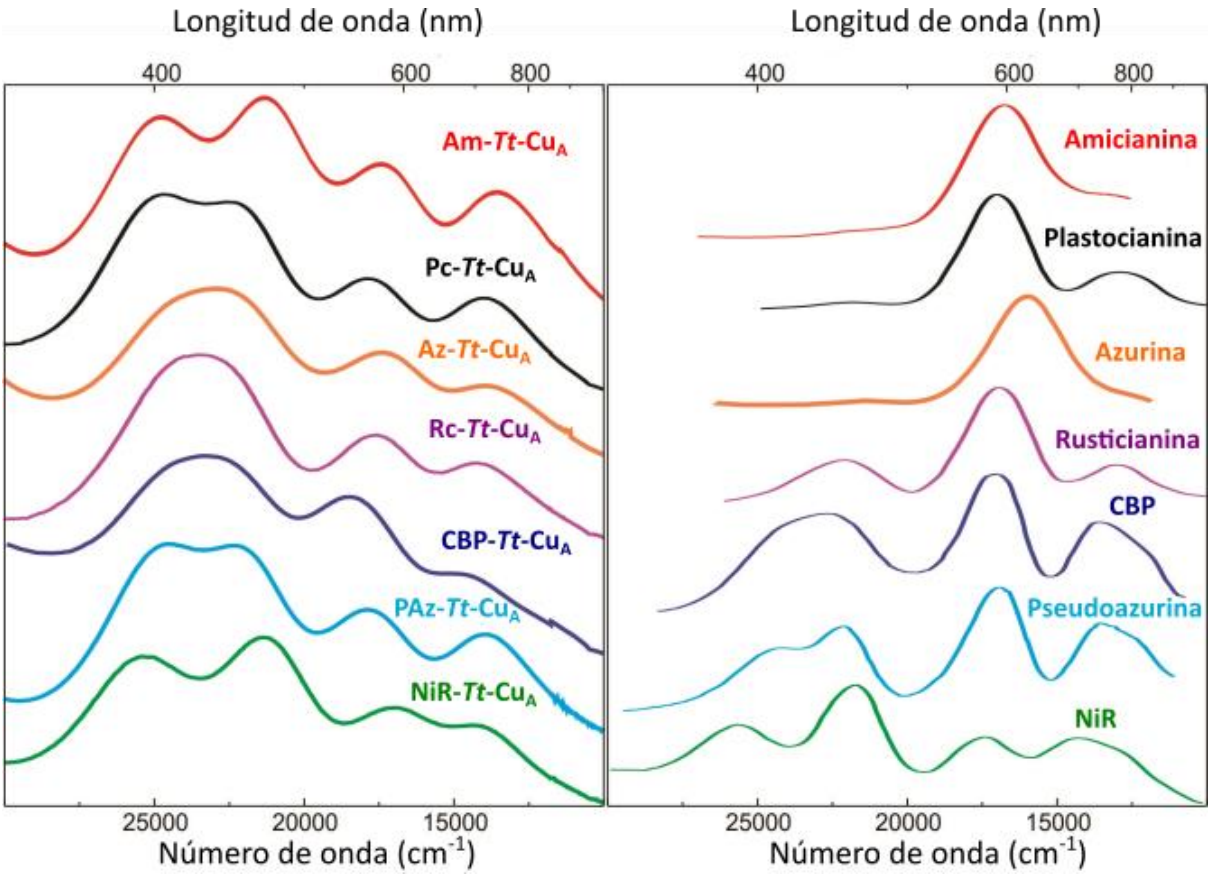


Figura 13: *Espectros de absorción electrónica para las quimeras en matriz proteica de Tt-Cu$_A$, panel izquierdo, y para las variedades silvestres que comparten los bucles, panel derecho. Los espectros del panel derecho se encuentran ordenados según el grado de distorsión geométrica en su sitio metálico, desde sitios axiales (azules) en la parte superior hacia sitios rómbicos (verdes) en la parte inferior.*[27,34,35,38–40]

De acuerdo al modelo de distorsión acoplada, el pasaje gradual de azul a verde va acompañado de un acortamiento de la distancia S_{Met}-Cu^{+2}, corroborado por las estructuras cristalinas de distintas proteínas. Este hecho trae aparejado la aparición de una banda en torno a 25000 cm^{-1}, asignada a la TCLM S_{Met}→Cu^{+2} que incrementa su intensidad en las variedades silvestres distorsionadas, Figura-13 panel derecho. La observación de que en las quimeras esta banda se encuentra muy intensificada, incluso más de lo que se observa para el sitio T1 de la Nitrito Reductasa (NiR), sugiere que la interacción Cu-Met se encuentra fortalecida, consistente con una nueva restricción estructural impuesto por la matriz de *Tt*-Cu$_A$. Esta propuesta va de acuerdo con el hecho de que esta característica espectral es común a todas las quimeras estudiadas, y no de algunos casos aislados. Recientemente se publicó la estructura cristalina de la quimera Am-*Tt*-Cu$_A$ (pdb 5U7N)[37], donde se verifica una distancia S_{Met}-Cu^{+2} de 2,35 Å. Este valor es aún menor que aquellos reportados para los sitios T1 más distorsionados pseudoazurina y NiR, con distancias S_{Met}-Cu^{+2} de 2,75 Å y 2,55 Å, respectivamente, tal como se podía anticipar a juzgar por la intensidad de la banda correspondiente en los espectros. Lamentablemente esta fue la única proteína que se logró cristalizar del conjunto de quimeras testeado.

Por otra parte, se puede observar que en todos los casos las intensidades relativas de las bandas a 450 y 600 nm, asignadas a las TCLM π-S_{cis}→Cu^{+2} y σ-S_{cis}→Cu^{+2}, se asemeja a la situación observada en la NiR, la variedad silvestre más distorsionada reportada hasta el momento. Con el fin de cuantificar el grado de estas distorsiones se realizaron deconvoluciones de los espectros de absorción UV-visibles a fin de determinar el valor de los coeficientes de absorción molar de ambas señales, Figura-13. Para este análisis solo se tuvieron en cuenta las bandas principales del espectro de absorción UV-visible siguiendo resultados previos publicados para las variantes Am-*Tt*-Cu_A y Az-*Tt*-Cu_A basados en resultados de experimentos de dicroísmo circular[37]. El cociente de intensidades de estas bandas, $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$, también llamado parámetro R_L, es un estimador clave de detalles electrónicos asociados a las características geométricas en estos sistemas. Típicamente los valores de R_L van desde el rango 0,04-0,1 para sitios T1 axiales a valores típicamente dentro del rango 0,1-0,4 para sitios T1 rómbicos llegando a valores de 1,74 para casos más extremos como NiR, y pueden ser aún mayores en el rango 2,5-4,5 para sitios T2 como aquellos presentes en Nitrosocianina o CuZn-SOD, Figura-11. En estos últimos, el solapamiento entre los orbitales *p* del azufre y *d* del cobre es principalmente de tipo frontal, lo que intensifica sobremanera la banda asociada a la transición σ-S_{cis}→Cu^{+2}. Como veremos hacia final de este capítulo es posible obtener sitios mononucleares de cobre con valores intermedios entre aquellos de los sitios T1 rómbicos y los de sitios T2, verificando una interconversión gradual tal como ocurre entre las axiales y rómbicas. Los valores de R_L para las quimeras se presentan en el rango de 1,10 a 1,64, Tabla-2**,** y se constata que presentan un solapamiento orbital S_{Cis}-Cu^{+2} comparable con aquel de NiR, con un valor de R_L de 1,74.[27] En la Tabla-2 también se presenta el parámetro R_ε, que representa el cociente de las intensidades totales en esas mismas posiciones, sin necesidad de deconvolucionar las señales, que fue el primer estimador empleado. Si bien este estimador posee mayor imprecisión dado que las intensidades totales poseen pequeñas contribuciones de bandas aledañas, la información extraída del mismo concuerda perfectamente con aquella brindada por el estimador mayormente empleado R_L.

Por lo tanto, en cuánto a la rotación de los orbitales *p* del sulfuro sobre los orbitales *d* del cobre no parece haber grandes diferencias con respecto a los sitios rómbicos típicos, y en estos términos las quimeras pueden ser agrupadas en esta categoría. Sin embargo, como mencionamos previamente la interacción S_{Met}-Cu^{+2} si es nueva y mucho más intensa. En este sentido se va a indagar mediante otras técnicas espectroscópicas que permitan elucidar distintos aspectos geométricos.

Tabla-2: *Coeficientes de absorción molar de las TCLM π-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$ y σ-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$, su cociente (parámetro R_L), y el cociente de intensidades espectrales totales (parámetro R_ε) para las quimeras.*

	Quimeras en matriz proteica de *Tt*-Cu_A								
	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
$R_L = \varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$	1,49	1,28	1,47	1,21	1,10	1,15	1,49	1,64	1,46
ε_{450} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	1720	2520	3560	1830	1560	2385	3080	2700	890
ε_{600} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	1240	1970	2430	1430	1420	2760	2070	1645	610
$R_\varepsilon = A_{450}/A_{600}$	1,41	1,45	1,57	1,47	1,16	1,22	1,65	1,66	1,43

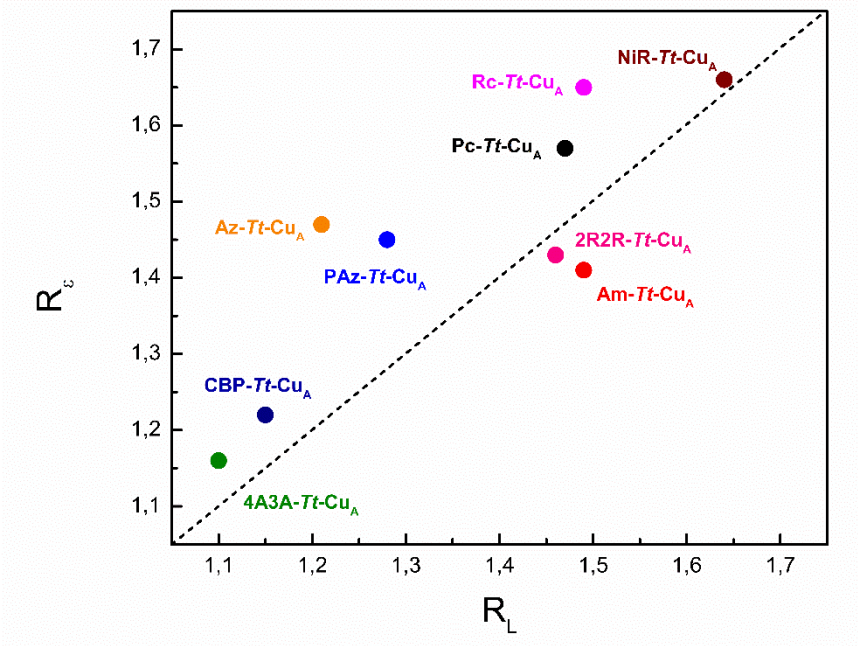


Figura 14: *Comparación de cocientes de intensidades de las bandas π-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$ y σ-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$, R_L y R_ε, para el conjunto de quimeras.*

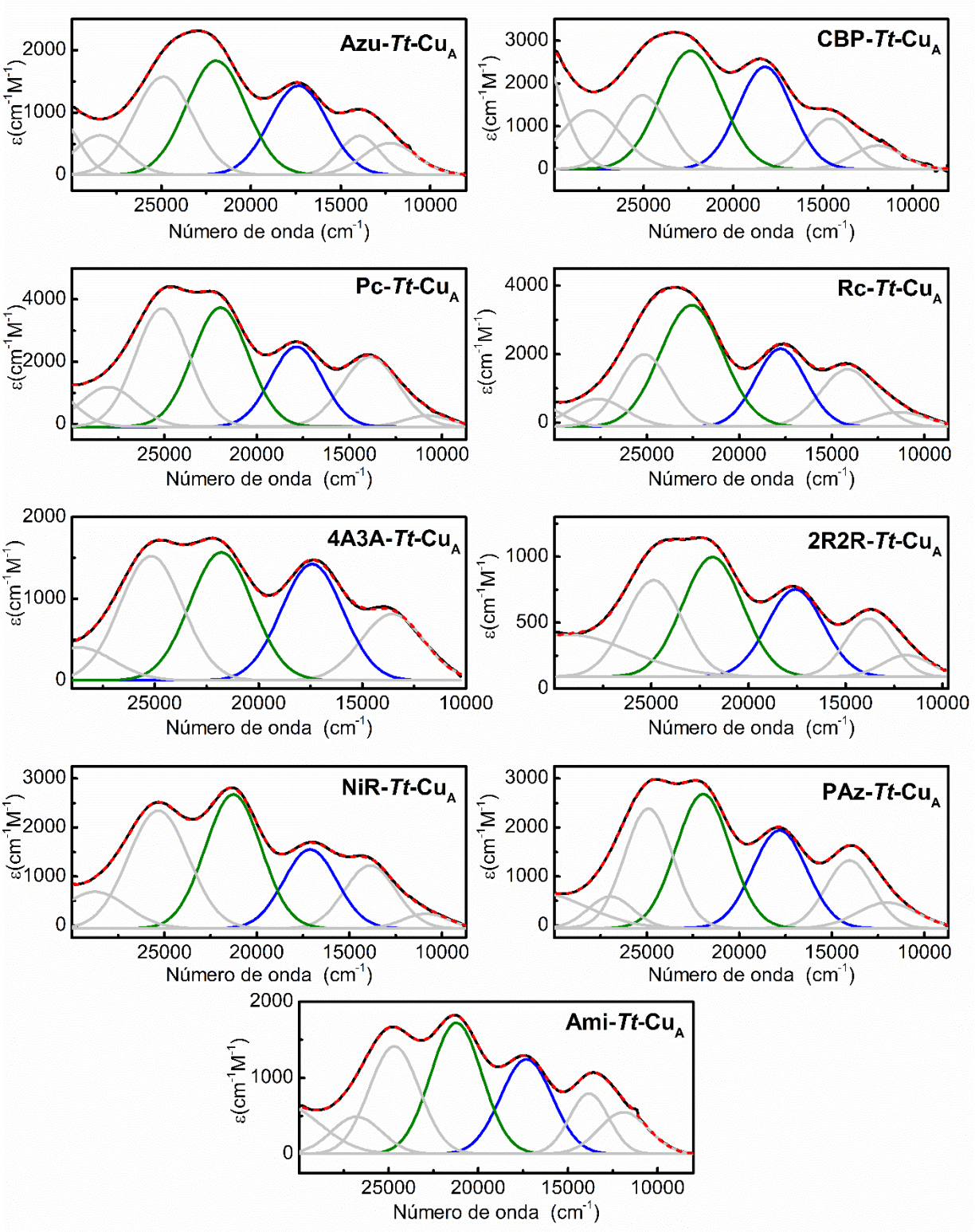


Figura 15: *Espectros de absorción electrónica presentando una deconvolución gaussiana de sus señales principales. En verde oliva se presenta la TCLM σ-S_{cis}→Cu^{+2} y en azul TCLM π-S_{cis}→Cu^{+2}. La curva negra corresponde al espectro experimental y la roja punteada al espectro reconstruido.*

3.3.2-Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

Una de las técnicas más empleadas para abordar la caracterización electrónica y geométrica de estos sitios es la espectroscopia EPR. En la Figura-16 se presentan espectros de EPR de algunas quimeras en estado oxidado obtenidos a una temperatura de 120 K y procesados por el Dr. Alcides Leguto. En la Tabla-3 se presentan los parámetros de ajuste de los espectros. Observando el valor de los parámetros notamos que el conjunto de quimeras verdes poseen valores de acoplamientos hiperfinos ($A_{\parallel}$) en el rango 80-90 (x 10^{-4} cm^{-1}) lo que concuerda con sitios T1 con distorsiones rómbicas, recordemos que los sitios T1 axiales se caracterizan por presentar valores extremadamente bajos (< 60 x 10^{-4} cm^{-1}). Por otra parte, los valores de $g_{\parallel}$ (o g_z) rondan los 2,195, compatible con sitios T1 rómbicos. Una representación de estos dos parámetros, conocida como diagrama de Peisach-Blumberg[41], permite reconocer y agrupar los distintos sitios mononucleares de cobre. Como puede observarse en la Figura-17 las quimeras caen claramente en la región de sitios T1 rómbicos, alejadas de los sitios T1 axiales y sitios T2. En línea con estas observaciones los valores de g_y y g_x son distintos, y su diferencia notada como $\Delta g_{\perp}$, presenta valores alrededor de 0,029 de acuerdo con las observaciones previas en base al parámetro experimental R_L a partir de espectroscopia de absorción electrónica.

Una observación interesante es que, al cabo de cierto tiempo, típicamente mayor a 3 semanas, algunas de las quimeras cambiaban su tonalidad verdosa por una rojiza, presentando espectros de absorción muy similares, pero con su máximo de absorción corrido hacia el violeta. Esto se observó únicamente para las variantes NiR-*Tt*-Cu_A, Pc-*Tt*-Cu_A y CBP-*Tt*-Cu_A. En el caso de CBP-*Tt*-Cu_A ciertas tandas de expresión proteica se tornaban rojizas casi de inmediato al agregar sulfato de cobre II, sin explicación aparente. Para este último caso, llamada *r*-CBP-*Tt*-Cu_A por "*red*-CBP" se logró registrar un espectro de EPR y los parámetros obtenidos de su ajuste son compatibles con aquellos presentes en sitios T2, principalmente altos valores de $A_{\parallel}$ ($\geq$ 160 x 10^{-4} cm^{-1}). Probablemente, la formación de un sitio T2 se deba a la incorporación de una molécula de solvente tal como se observa en el sitio T2 de Nitrosocianina, que también presenta un color rojizo[42]. Sin embargo, no fue posible caracterizar esta transformación ya que no se lograron identificar condiciones experimentales que permitan su estudio sistemático.

Tabla-3: *Parámetros espectrales obtenidos a partir de los ajustes de EPR para todas las quimeras.*

	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	*r*-CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A
$A_{\parallel}$ $(10^{-4}cm^{-1})$	88,1	82,1	85,4	89,1	199,1	86,1	79,7
g_z ($g_{\parallel}$)	2,195	2,193	2,196	2,198	2,184	2,195	2,201
g_y	2,058	2,055	2,063	2,059	2,053	2,060	2,057
g_x	2,036	2,015	2,022	2,031	2,031	2,034	2,036
$\Delta g_{\perp}$	0,022	0,049	0,041	0,028	0,022	0,026	0,021

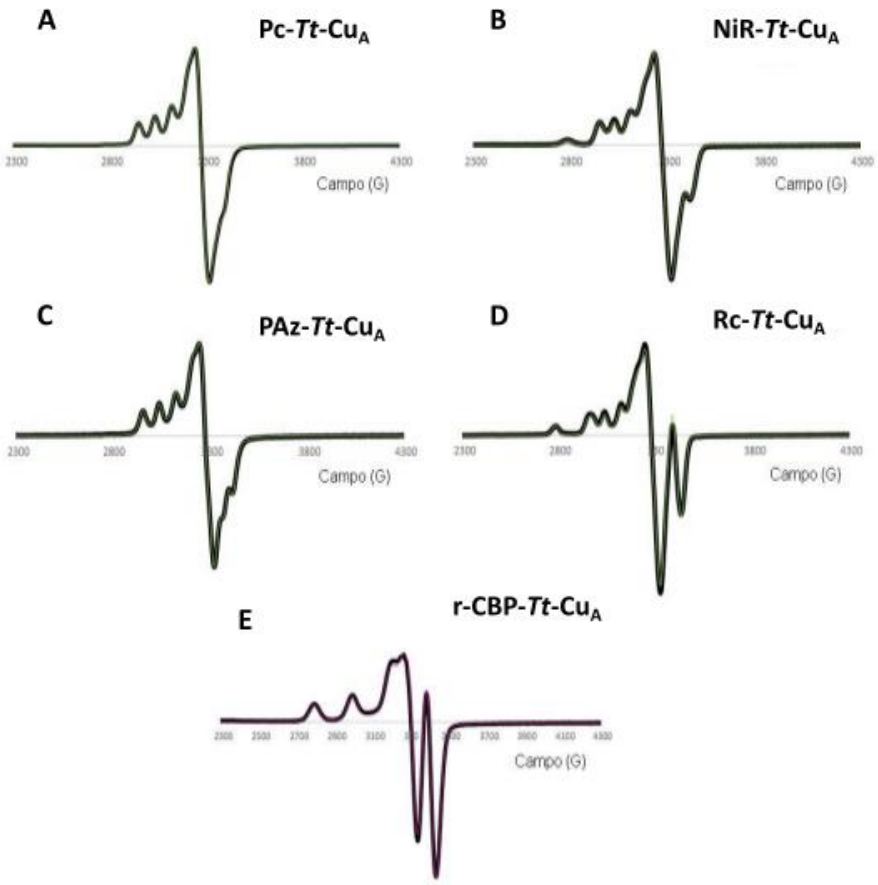


Figura 16: *(Figura adaptada de Leguto 2018*[43]*) Espectros de EPR para algunas quimeras. La línea negra representa el espectro experimental, y la línea coloreada tenue el espectro simulado.*

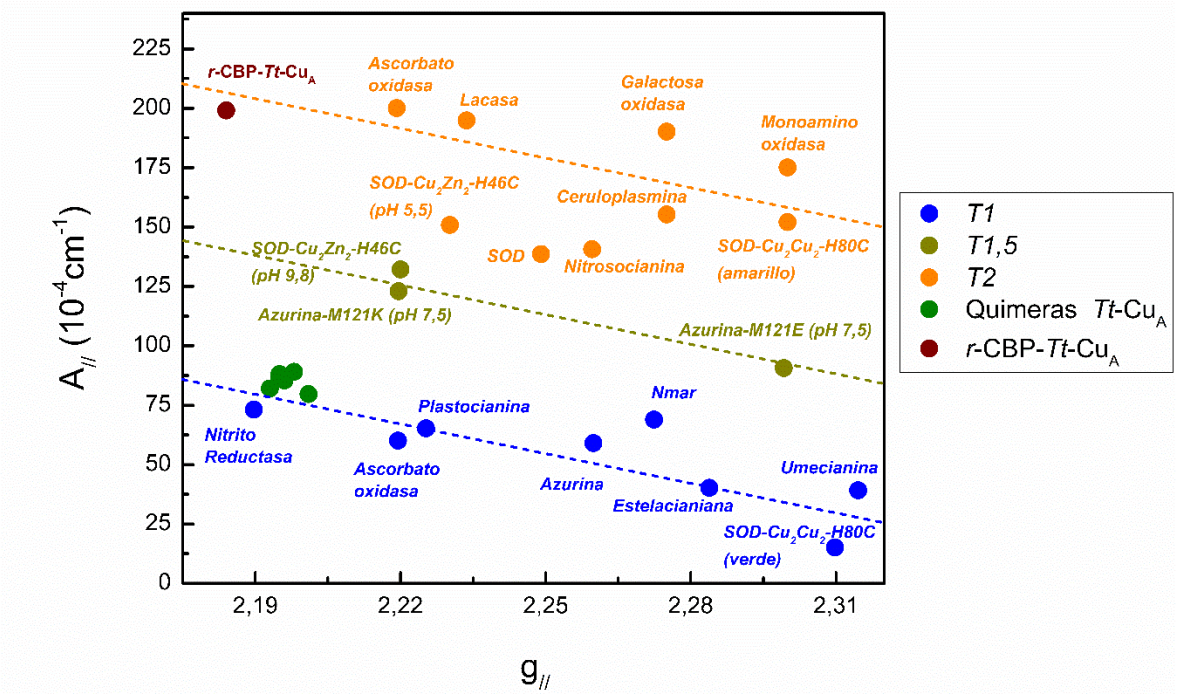


Figura 17: *Diagrama de Peisach-Blumberg presentando algunos ejemplos de los distintos sitios de cobre mononucleares (T1, T1,5 y T2) y las quimeras estudiadas en esta tesis.*[43,44]

3.3.3-Espectroscopia Raman resonante

Otra técnica que ha sido empleada para caracterizar el grado de distorsión de estos centros metálicos es la espectroscopia Raman resonante (Rr). La excitación de las bandas de transferencia de carga S_{cis}→Cu^{+2} da como resultado la intensificación de múltiples modos vibracionales que tienen como común denominador una alta contribución del estiramiento del enlace entre el cobre y el azufre de la cisteína[44–49]. Estos modos suelen situarse en el rango de frecuencias de 300-450 cm^{-1}, y pueden utilizarse como estimador de la fuerza del enlace Cu-S_{Cis}. Se obtuvieron espectros Rr para las quimeras en condiciones criogénicas, a una temperatura de 77 K, medidos utilizando una línea láser de 532 nm o de 633 nm, en la Figura-19 se presentan los espectros más satisfactorios. Se puede observar que en todos los casos hay múltiples señales en la región 300-450 cm^{-1}, con lo cual se verifica la asignación previa de una banda de TCLM S_{cis}→Cu^{+2}. A partir de estos espectros se calculó la frecuencia vibracional efectiva, $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$, la que se obtiene como un promedio de las posiciones de las señales pesados por su intensidad. Los valores de la frecuencia efectiva calculados, que se encuentran en el rango 356-385 cm^{-1}, difieren sensiblemente de aquellas de los sitios silvestres, consistentemente con los fuertes cambios en los espectros de absorción electrónicos. Dado que tanto la relación de intensidades de las bandas TCLM S_{cis}→Cu^{+2} como la $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ dan información del enlace Cu-S_{Cis} el siguiente análisis consistió en ubicar a las quimeras en un diagrama que contraste ambos parámetros espectrales. En la Figura-18 se presenta tal comparación.

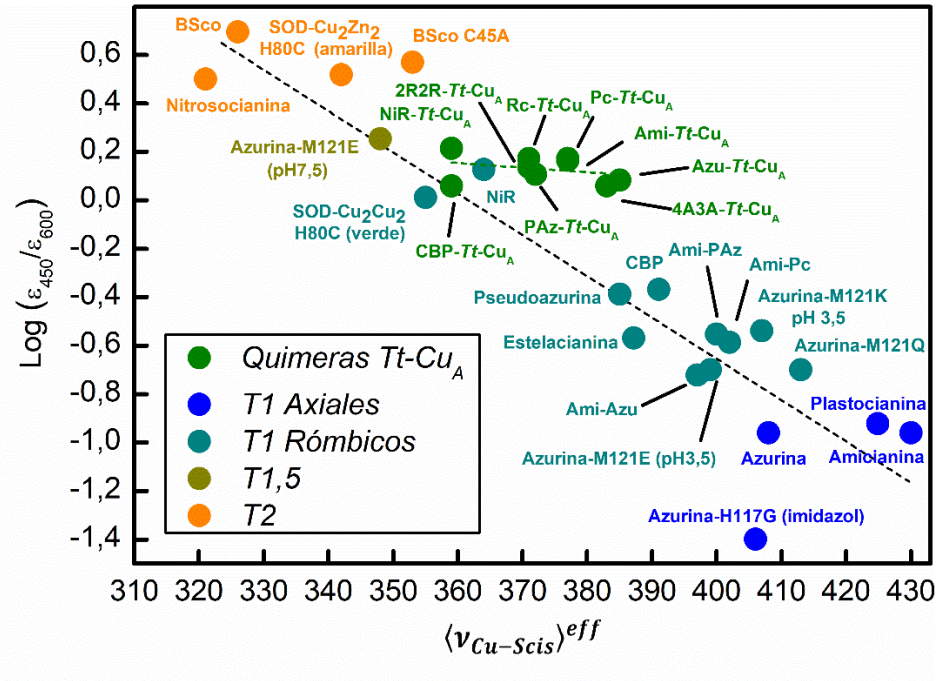


Figura 18: *Gráfico del logaritmo del cociente de intensidades ($\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$) en función de la frecuencia vibracional efectiva, $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$, para diferentes clases de sitios mononucleares.*

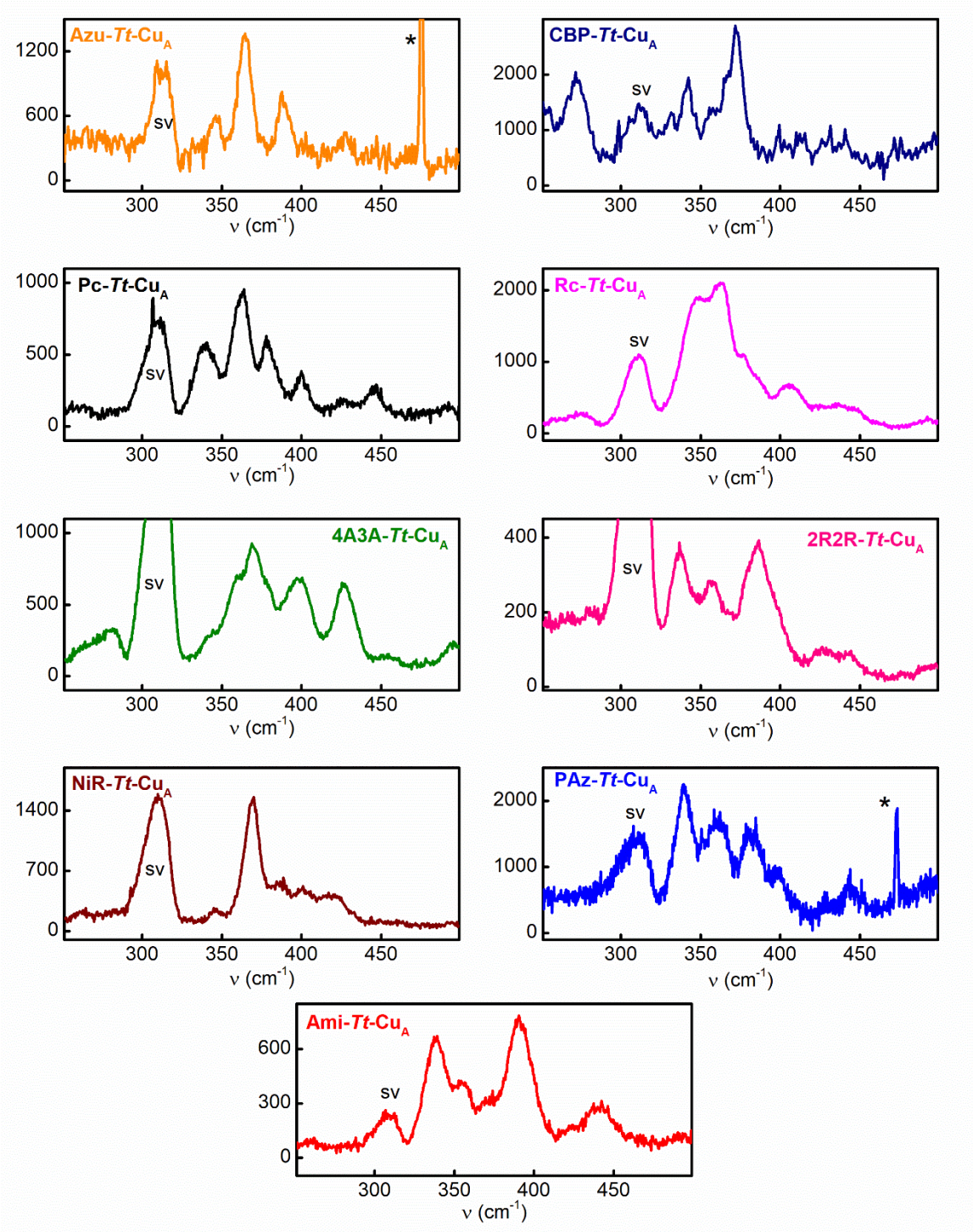


Figura 19: *Espectros Raman resonante de las quimeras obtenidos en condiciones criogénicas, temperatura de 77K, empleando una frecuencia de excitación de 532 nm, salvo para la variante CBP-Tt-Cu$_A$ que se empleó una frecuencia de 633 nm. Las señales correspondientes a solvente (sv) y debidas a radiación cósmica (*) se encuentran adecuadamente señalados.*

Tal como se concluyó previamente en base a los espectros de absorción UV-visible y a los valores de R_L obtenidos a partir de ellos, como de la posición en el diagrama de Peisach-Blumberg de los parámetros de EPR, las quimeras poseen sitios T1 con distorsiones rómbicas

compatibles con aquellas encontradas en el sitio T1 de NiR. Sin embargo, presentan una banda de TCLM S_{Met}→Cu^{+2} muy intensa, más aún que la reportada para el sitio de NiR. Esta diferencia anticipaba un cambio aún más extremo en el enlace Cu-S_{Cis}, y sus propiedades espectrales asociadas según el modelo de distorsión acoplada, de manera que pareciera ser que hay cierto grado de desacople o relajamiento en el efecto del acercamiento de la metionina y la rotación de los orbitales del sulfuro de la cisteína. Tal situación no ha sido reportada para ninguna proteína conteniendo un sitio T1. Es probable que este desacoplamiento este íntimamente ligado a imposiciones estéricas provenientes del nuevo esqueleto proteico, *Tt*-Cu_A, las cuales según el análisis hasta este momento parecen haberse relajado respecto de las variedades silvestres como incluso de otros sistemas quiméricos donde el marco proteico sigue siendo una cupredoxina naturalmente seleccionada para albergar un sitio mononuclear T1[2,32]. En este sentido, si uno observa las posiciones de los valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ en la Figura-18 puede verse que presentan una dispersión de valores comparable a la encontrada en todos los grupos de sitios de cobre presentados, que abarcan posiciones intermedias entre los valores reportados para sitios fuertemente distorsionados NiR y SOD-Cu_2Cu_2, y los valores de sitios T1 rómbicos menos extremos como los de pseudoazurina y CBP. Dada la relación entre la $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ y la fuerza del enlace Cu-S_{Cis} , esto parecería sugerir que las quimeras presentan diferencias en la fuerza, y por ende en la distancia, del enlace Cu-S_{Cis}. Por otro lado, podemos ver que la tendencia en los valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ no va de la mano del cambio en los valores de R_L con la misma intensidad con que lo hace el conjunto global de estos centros metálicos, con lo cual nuevamente se presenta un cierto grado de relajación del modelo de distorsión acoplada. La línea punteada de color verde muestra la tendencia de cambio para las quimeras, y esta presenta menor pendiente que el resto de las proteínas. Un comportamiento similar pareciera tener lugar en el conjunto de sitios T2 presentados en la esquina superior izquierda, como en los sitios T1 axiales azules, en la esquina inferior derecha. Entonces, si bien globalmente el modelo predice con gran éxito cambios sustanciales a través de estos grupos definidos, los detalles particulares dentro cada grupo parecen estar dominados por características más sutiles, específicas de cada conjunto.

Existe una regla empírica conocida como la regla de Badger que permite estimar la distancia Cu-S_{Cis} a partir otra conocida empleando los valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ de ambas, según la siguiente ecuación [44,50,51]:

$$\frac{(r_1 - d)}{(r_2 - d)} = \left(\frac{\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle_1^{eff}}{\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle_2^{eff}} \right)^{2/3} \qquad \textbf{Ecuación-1}$$

Donde r_i corresponden a la distancia de los dos enlaces que se estén comparando y d es una constante que para enlaces de azufre con metales de transición de la primera serie de transición adopta un valor de 1,5 Å. Empleando los valores del enlace Cu-S_{Cis} de Azurina, r_i (2,13 Å) y $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ (414 cm^{-1}), se estimaron las distancias Cu-S_{Cis} para las quimeras, Tabla-4. Es interesante notar que las distancias obtenidas son en promedio 0,23 Å más cortas que la distancia promedio cristalográfica de 2,41 Å. Por otra parte, estos números son consistentes con distancias esperadas para sitios T1 rómbicos (~2,15 Å), las que se encuentran ligeramente por encima de las distancias en sitios T1 axiales (~2,10-2,13 Å).

Tabla-4: *Parámetros obtenidos a partir de espectros Raman resonantes para el conjunto de quimeras verdes.*

	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
$\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ (cm^{-1})	377	372	377	385	383	359	371	359	371
distancia Cu-S_{Cis} (Å)	2,17	2,18	2,17	2,16	2,16	2,19	2,18	2,19	2,18

Con el fin de poder racionalizar el origen estructural de estas propiedades espectrales se generaron modelos estructurales *in silico* de las quimeras basados en la estructura cristalina de Am-*Tt*-Cu_A. Estos resultados se tratan a continuación.

3.4-Generación de modelos estructurales *in silico*

De todas las quimeras solo la variante Am-*Tt*-Cu_A logró dar cristales de calidad suficiente para realizar experimentos de difracción de rayos X. Con el fin de ahondar en detalles estructurales que puedan ayudar a comprender el origen de las diferencias entre las quimeras, y, por ende, brinden alguna explicación a los detalles espectrales tratados en la sección anterior, se generaron estructuras usando como modelo aquella de Am-*Tt*-Cu_A (PDB 5U7N). Estos cálculos se hicieron en colaboración interna con la Dra. María Ana Castro. La estrategia consistió en reemplazar la secuencia del bucle implantado por las secuencias correspondientes a cada quimera, empleando los softwares Rosetta[52] y Yasara[53,54]. Las estructuras fueron relajadas siguiendo un paso de minimización de energía seguido de otro de termalización de 0 K a 300 K. Antes de correr las simulaciones de Dinámicas Moleculares (DM) se obtuvieron los parámetros del sitio metálico empleando el modulo MCPB.py de las herramientas disponibles del paquete AMBER (AmberTools17)[55]. En este paso se llevó cabo un cálculo cuántico (QM) a partir del cual se estimaron los parámetros requeridos por (y compatibles con) el campo de fuerzas clásico. Para este paso se empleó el sitio metálico del cristal de Am-*Tt*-Cu_A (PDB 5U7N), y los parámetros obtenidos se utilizaron para todas las quimeras construidas *in silico*. Esto tiene la ventaja de que homogeniza las características del sitio metálico sobre las que actuarán las fuerzas estéricas debido a la interacción entre el bucle y la matriz de *Tt*-Cu_A. Entonces se podrán correlacionar las diferencias estructurales halladas con el efecto estérico debido a las diferencias entre los bucles, y su interacción con la matriz de *Tt*-Cu_A. Además, las constantes de fuerza de los enlaces Cu-X y de ángulos y torsiones, son lo suficientemente pequeños como para verse afectados por estos efectos. La estructura inicial, ángulos y distancias, también se eligieron para que coincidan con aquellas de Am-*Tt*-Cu_A. Para el estado reducido, se realizaron cálculos QM del sitio metálico, átomo de cobre más cadenas laterales de residuos de primera esfera de coordinación, a partir del cual se obtuvieron los parámetros clásicos. Luego se empleó la misma metodología para armar las estructuras de partida para las DM. Una vez que se lograron tener estas estructuras relajadas, se corrieron simulaciones de DM de 50 ns con solvente explícito. Los principales parámetros estructurales se presentan a continuación en las Tablas-5.

Las estructuras *in silico* presentan ciertas diferencias respecto a los cristales en sus enlaces con el átomo de cobre. La distancia de enlace Cu-S_{Met} promedio de 2,44 Å resulta ser más larga que aquella del cristal, 2,35 Å, mientras que la distancia de enlace Cu-S_{Cis} promedio de 2,21 Å resulta ser más corta que la de la estructura cristalina, 2,41 Å [37]. Los nuevos valores obtenidos de las DM sugieren que el sitio de cobre es menos extremo de lo que indica la estructura cristalina. La distancia Cu-S_{Cis} del cristal es la más larga reportada para este tipo de sitios metálicos, sin embargo, las obtenidas por DM se acercan más a las estimadas a partir de los espectros Rr ($\sim 2{,}18$ Å). Teniendo en cuenta que las condiciones en las que se obtuvieron los valores difieren fuertemente, en el caso del cristal las proteínas se encuentran en un entorno altamente poblado y fuertemente deshidratado como lo es el interior de un cristal, mientras que en las simulaciones no se reprodujeron tales condiciones, en su lugar una caja de agua lo suficientemente grande asegurando que ninguna molécula de proteína sienta la presencia de otra aledaña. Por otro lado, en la celda unidad del cristal se hallan ocho estructuras cuyas distancias de enlace Cu-S_{Cis} se encuentran en el rango 2,28-2,49 Å y las de Cu-S_{Met} de 2,37-2,44 Å. Se ve que hay una gran variabilidad en estos valores lo cual se suma a la baja resolución de 2 Å. Si bien estas son, en parte, posibles causas para estas discrepancias, a fin de testear la bondad de las estructuras obtenidas se tomó una estructura al azar y se realizó una minimización de energía a nivel QM-MM seguido de un cálculo DFT dependiente del tiempo para obtener su espectro de absorción electrónico. De esta manera, se determinó por comparación directa si estas estructuras modelo logran capturar los aspectos clave de las distorsiones geométricas reflejados en la forma del espectro e intensidad de bandas principales. Los resultados se presentan en la Figura-20.

Como se comentará en breve, a pesar de las diferencias en distancias Cu-S los modelos *in silico* logran reproducir de manera satisfactoria aspectos clave de los espectros de absorción UV-visible lo que da la pauta de que logran capturar detalles a nivel del enlace Cu-S_{Cis} y por ende de la geometría del sitio metálico permitiéndonos continuar con el análisis. Este análisis resultará de gran ayuda para entender el origen de las diferencias en los parámetros redox de estos sistemas. El espectro simulado de la estructura de la quimera 4A3A-*Tt*-Cu_A no logra equiparar las características del experimental, Figura-20, con lo cual queda excluido de la comparación con el resto del conjunto.

Tabla-5: *Parámetros estructurales y valores de ASAS obtenidos a partir de las DM para todas las quimeras en ambos estados redox.*

Estado oxidado	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
Distancias de enlace (Å)									
Cu-S (Cis)	2,217	2,207	2,205	2,230	2,223	2,209	2,221	2,205	2,221
Cu-S (Met)	2,478	2,420	2,434	2,404	2,470	2,415	2,463	2,421	2,472
Cu-N (His-bucle)	2,050	2,034	2,030	2,067	2,046	2,039	2,027	2,047	2,040
Cu-N (His-75)	2,023	2,019	2,019	2,003	2,046	2,024	2,029	2,027	2,036
Cu···O (Ile-74)	4,508	4,674	4,648	4,640	4,511	4,576	4,578	4,573	4,640
$Cu\text{-}S_{Cis}\cdots HN$ (Gli-76)	3,633	3,574	3,611	3,758	3,416	3,456	3,694	3,363	4,007
Ángulos de enlace (deg.)									
N(His-75)-Cu -S(Cis-bucle)	134,793	138,102	137,817	137,487	134,369	137,325	137,115	133,748	137,251
-N(His-bucle)	99,087	97,391	98,472	99,101	99,227	98,359	98,800	99,659	97,973
-S(Met-bucle)	90,357	90,710	90,757	98,073	89,463	89,580	88,821	89,023	89,770
S(Cis-bucle)Cu -N(His-bucle)	98,032	95,999	96,078	95,361	98,212	95,607	97,432	97,122	98,039
-S(Met-bucle)	111,137	110,217	110,081	135,865	111,296	110,240	111,030	110,532	110,644
N(His-bucle)Cu-S(Met-bucle)	126,899	129,186	128,108	98,357	127,874	131,046	127,745	131,302	126,968
Ángulo entre planos (deg.)									
$N_{bucle}\text{-}Cu\text{-}N_{His75}$ vs $S_{Cis}\text{-}Cu\text{-}S_{Met}$	62,574	59,560	60,471	57,774	61,899	58,462	60,516	60,053	61,378
Ángulos diedros (deg.)*									
$S_{Met}\text{-}Cu\text{-}S_{Cis}\text{-}C_\beta$	-5,429	-0,557	0,008	-23,869	-22,259	-20,992	-12,799	-23,451	13,354 (0,66) -8,920 (0,34)
$Cu\text{-}S_{Cis}\text{-}C_\beta\text{-}C_\alpha$	165,151(0,96) -176,288 (0,04)	168,431 (0,87) -175,739 (0,13)	170,163 (0,75) -174,401(0,25)	152,220 (>0,99)	161,141 (0,97) -175,803 (0,03)	164,993 (0,91) -175,397 (0,09)	167,999 (0,93) -176,594 (0,07)	170,396 (0,74) -174,983 (0,26)	167,597 (0,81) -173,734 (0,19)
$S_{Cis}\text{-}C_\beta\text{-}C_\alpha\text{-}N$	172,559 (0,39) -171,417(0,61)	171,949 (0,47) -171,663 (0,53)	171,140 (0,55) -172,534(0,45)	175,773 (0,12) -168,065 (0,88)	175,286 (0,15) -167,456 (0,85)	174,988 (0,18) -169,277 (0,82)	174,582 (0,22) -168,818 (0,78)	174,690 (0,24) -170,608 (0,76)	169,849 (0,45) -170,306 (0,55)
ASAS ($Å^2$)	442,748	448,167	448,092	474,200	457,935	458,483	458,784	455,983	448,196

*El número entre paréntesis indica la fracción del tiempo de la simulación en que permaneció en cada valor.

Estado reducido	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
Distancias de enlace (Å)									
Cu-S (Cis)	2,355	2,349	2,351	2,361	2,364	2,370	2,370	2,351	2,363
Cu-S (Met)	2,339	2,332	2,316	2,303	2,337	2,332	2,360	2,310	2,356
Cu-N (His-bucle)	2,034	2,017	2,018	2,015	2,032	2,014	2,016	2,036	2,033
Cu-N (His-75)	2,058	2,056	2,069	2,063	2,063	2,068	2,058	2,079	2,077
Cu···O (Ile-74)	4,579	4,661	4,594	4,573	5,281	4,523	4,544	4,568	4,598
Cu-S_{Cis}···HN (Gli-76)	3,299	3,329	3,276	3,311	3,263	3,337	3,363	3,318	3,400
Ángulos de enlace (deg.)									
N(His-75)-Cu -S(Cis-bucle)	111,934	112,441	111,937	112,341	111,973	113,290	113,892	111,870	112,717
-N(His-bucle)	102,394	101,567	102,242	105,186	102,555	102,219	100,944	102,407	100,601
-S(Met-bucle)	96,829	97,204	98,331	99,497	97,226	96,409	96,360	96,510	96,553
S(Cis-bucle)Cu -N(His-bucle)	116,475	116,737	116,625	115,280	116,441	116,246	116,757	115,445	117,354
-S(Met-bucle)	112,335	112,221	111,719	111,717	112,505	112,845	113,267	110,472	112,677
N(His-bucle)Cu-S(Met-bucle)	114,193	114,010	113,639	111,131	113,502	113,235	112,771	117,674	113,868
Ángulo entre planos (deg.)									
N_{bucle}-Cu-N_{His75} vs S_{Cis}-Cu-S_{Met}	83,606	83,803	84,627	85,728	83,914	83,206	83,160	82,154	83,445
Ángulos diedros (deg.)*									
S_{Met}-Cu-S_{Cis}-C_β	-37.063	-28.462	-28.406	-31.729	-39.588	-34.880	-36.258	-38.230	6,308 (0,12) -17,114 (0,88)
Cu-S_{Cis}-C_β-C_α	175,594 (0,19) -170,455 (0,81)	175,967 (0,08) -166,714 (0,92)	174,537 (0,18) -168,304 (0,82)	174,753 (0,28) -170,816 (0,72)	169,445 (0,75) -173,637 (0,25)	170,179 (0,76) -174,310 (0,24)	168,285 (0,76) -174,335 (0,24)	173,289 (0,06) -160,748 (0,94)	174,08 (0,21) -166,405 (0,79)
S_{Cis}-C_β-C_α-N	176,159 (0,02) -161,188 (0,98)	175,764 (0,06) -163,433 (0,94)	175,098(0,10) -165,478 (0,90)	176,860 (0,04) -165,319 (0,96)	176,351(0,03) -161,114 (0,97)	175,770 (0,09) -164,378 (0,91)	176,069 (0,04) -159,556 (0,96)	175,522 (0,07) -165,092 (0,93)	172,940 (0,33) -169,972 (0,67)
ASAS ($Å^2$)	443,375	447,096	447,328	462,558	459,544	466,900	465,426	458,119	446,702

*El número entre paréntesis indica la fracción del tiempo de la simulación en que permaneció en cada valor.

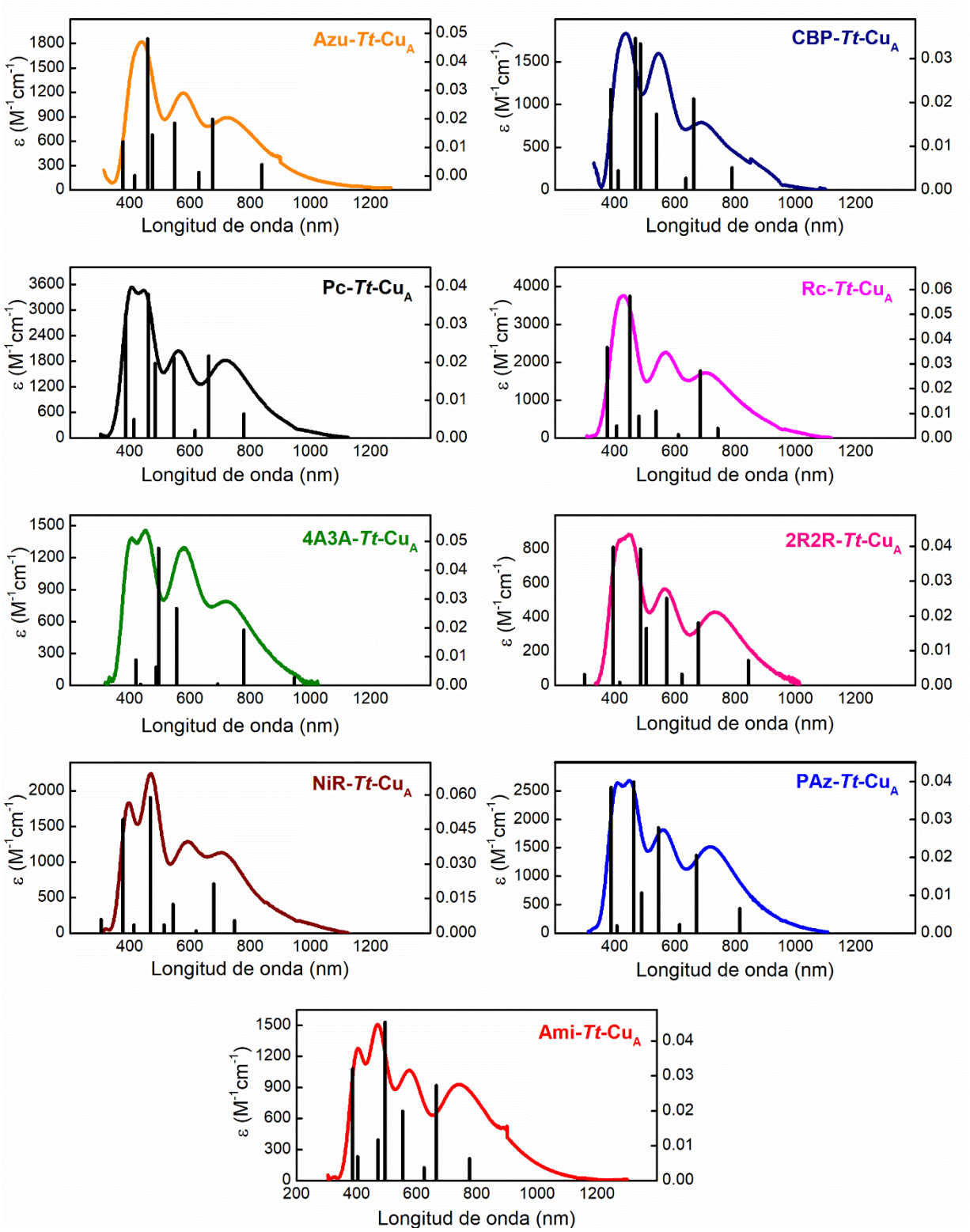


Figura 20: *En esta figura se presentan los espectros simulados, líneas verticales, expresados en intensidad relativa (eje derecho), y los espectros experimentales expresados en coeficiente de absorción molar (eje izquierdo). Se observa una buena semejanza entre ambos, garantizando la bondad de los modelos computacionales.*

En todos los casos la estructura secundaria o conformación del bucle coincide con aquella presente en las variedades silvestres, corroborando que la información para adoptar esta conformación se encuentra estrictamente en el bucle, tal como fue reportado para sistemas similares[56], y no se ve fuertemente alterada por la interacción con la matriz de *Tt*-Cu_A, Figura-21**.** Por otro lado, las cadenas laterales de los residuos del bucle pueden verse fuertemente afectadas por efectos estéricos en la interacción con la matriz. Y dado que los residuos coordinantes metionina y cisteína se encuentran en la intersección entre el bucle y la matriz, pueden trasladar estos efectos estéricos directamente a la coordinación del metal. Por otro lado, el residuo histidina proveniente de la matriz afecta directamente la coordinación debido a su nueva orientación producto del plegado particular de la matriz *Tt*-Cu_A. Se ve también que la posición relativa del átomo de cobre se ve alterada, y el residuo histidina proveniente de la matriz se encuentra en una posición diferente en la mayoría de los casos. Este hecho es no menor dado que la orientación relativa de este residuo coordinante participa de la tensión ejercida sobre el átomo de cobre definiendo, en parte, la restricción estérica impuesta por la proteína.

Dado que en la conversión gradual de sitios azules en verdes a través una distorsión tetragonal se observa un acortamiento de la distancia Cu-S_{Met} y un alargamiento de la distancia Cu-S_{Cis}, el cociente de estas dos distancias se convierte entonces en un parámetro para cuantificar el grado de distorsión del sitio. Por otro lado, un aumento de la tetragonalidad va de la mano del incremento del ángulo entre los planos definidos por los átomos N-Cu-N y S-Cu-S, de modo que este es otro candidato como estimador de la distorsión[36]. Sin embargo, un nuevo estimador ha sido reportado para cuantificar este aspecto en los sitios de cobre. Este estimador llamado τ_4 fue definido por Yang *et al.* [57] según la Ecuación-2.

$$\tau_4 = \frac{\left(360° - (\alpha + \beta)\right)}{141°} \qquad \textbf{Ecuación-2}$$

Aquí los parámetros α y β representan los dos ángulos mayores entre los átomos coordinantes y el átomo de cobre, de modo que el parámetro τ_4 va desde valores de 1 para centros perfectamente tetraédricos a un valor de 0 para centros totalmente plano cuadrados. En la Tabla-6 se presentan los valores de estos estimadores geométricos para ambos estados redox. En la Figura-22 se presenta una comparación entre estos estimadores y el estimador espectral mayormente utilizado, $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$. Los tres estimadores estructurales evaluados correlacionan con el estimador espectral presentando la misma tendencia corroborando su efectividad para reportar los cambios graduales a lo largo del conjunto de quimeras.

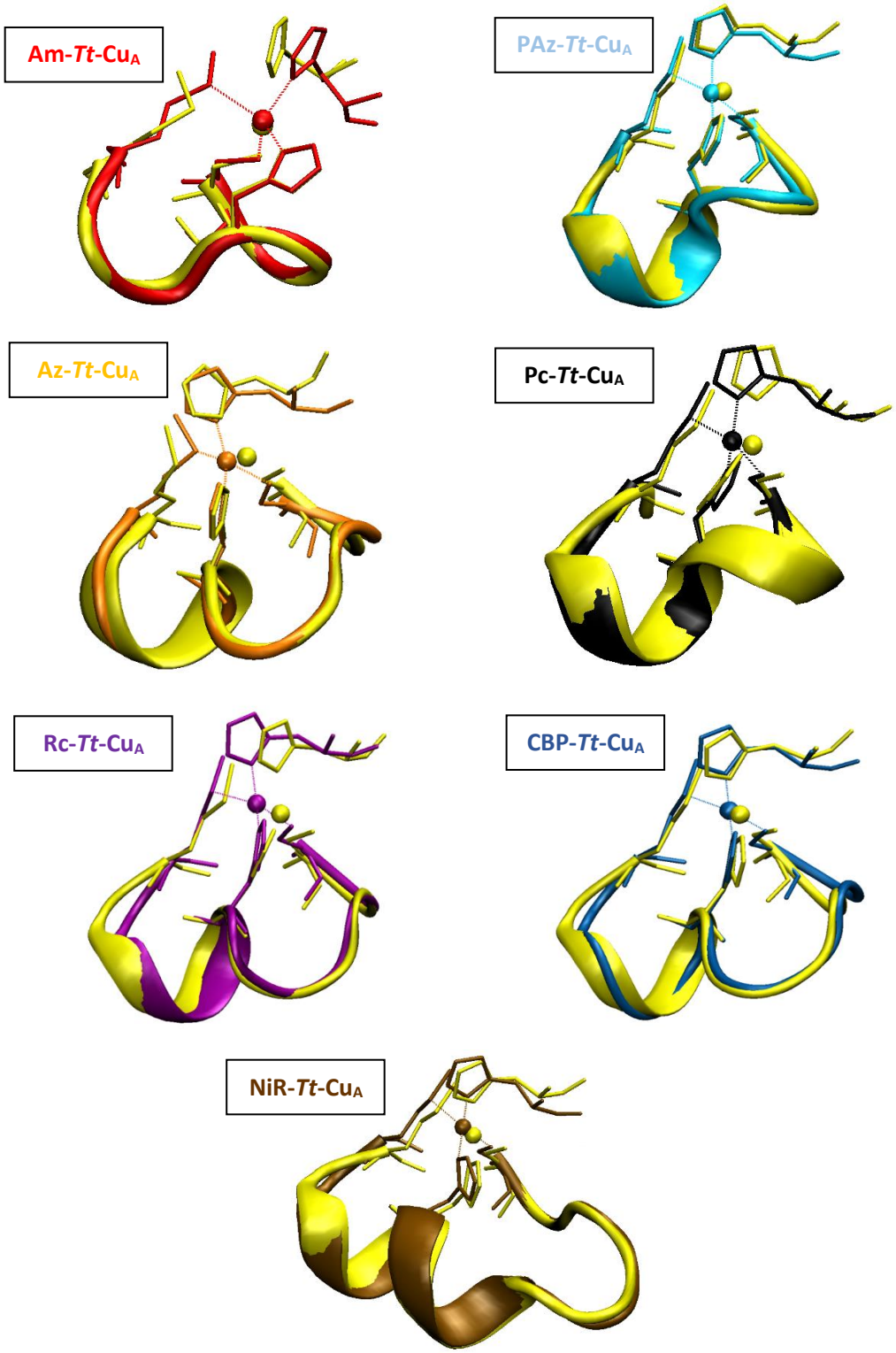


Figura 21: *En esta figura se presentan los alineamientos estructurales de los bucles y el centro metálico de las variedades silvestres (en color amarillo) y de las quimeras (siguen el código de colores)*

Tabla-6: *Estimadores estructurales de las distorsiones geométricas del centro de cobre obtenidos a partir de los modelos generados in silico.*

	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
Parámetro τ4 Estado Oxidado	0,697	0,657	0,667	0,614	0,693	0,649	0,674	0,673	0,679
Parámetro τ4 Estado Reducido	0,917	0,916	0,920	0,938	0,922	0,925	0,917	0,899	0,913
$\Delta\tau 4^{Red-Ox}$	0,220	0,259	0,253	0,324	0,229	0,276	0,243	0,226	0,234
Cu-S(Met)/Cu-S(Cis) Oxidado	1,117	1,096	1,103	1,078	1,141	1,093	1,108	1,098	1,113
Cu-S(Met)/Cu-S(Cis) Reducido	0,993	0,992	0,984	0,975	0,975	0,983	0,995	0,982	0,997
N_{BUCLE}-Cu-N_{His75} vs S_{Cis}-Cu-S_{Met} Oxidado	62,574	59,560	60,471	57,774	61,899	58,462	60,516	60,053	61,378
N_{BUCLE}-Cu-N_{His75} vs S_{Cis}-Cu-S_{Met} Reducido	83,606	83,803	84,627	85,728	83,914	83,206	83,160	82,154	83,445

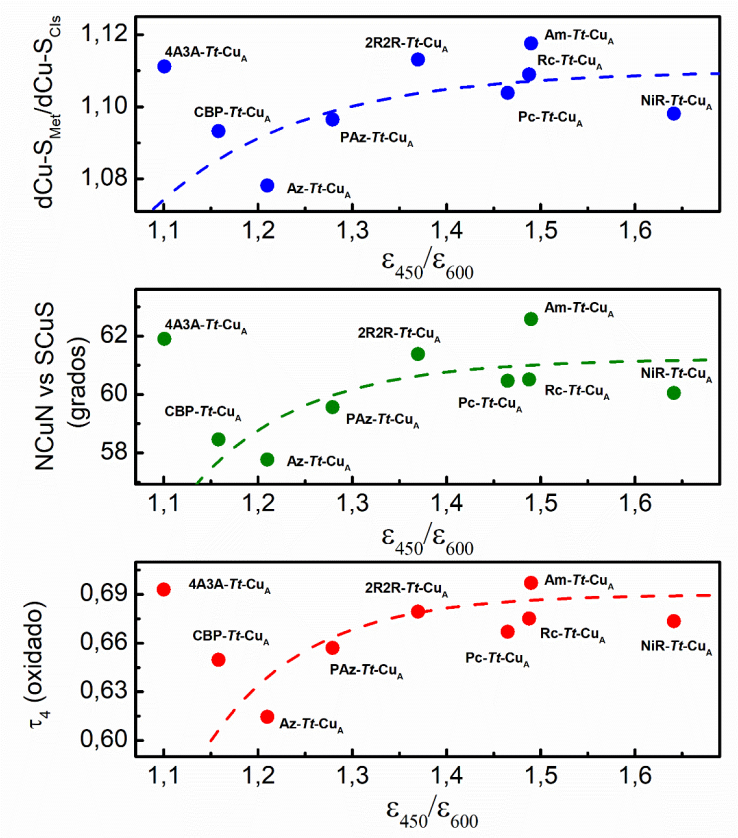


Figura 22: *En esta figura se presentan diferentes parámetros estructurales empleados como estimadores de las distorsiones geométricas del sitio metálico en función del cociente de intensidades de las bandas de TCLM $S_{cis} \rightarrow Cu^{+2}$ ($\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$). Como puede observarse todos los estimadores obtenidos a partir de los modelos in silico correlacionan de igual manera con el parámetro experimental.*

Un aspecto muy relevante de estos resultados es el hecho de que las estructuras sugieren una pérdida parcial de la restricción proteica natural, lo cual queda expuesto al comparar con otras cupredoxinas naturales. El parámetro τ_4 es en promedio 0,67 y 0,92 para las quimeras en estado oxidado y reducido, respectivamente, Tabla-6. La diferencia en el parámetro τ_4 entre ambos estados es de 0,25. A modo de comparación, el valor del $\Delta\tau_4$ estimado previamente para Plastocianina, y su centro metálico libre (fuera de su matriz proteica) es 0,12 y 0,34, respectivamente[58]. Entonces, es evidente que el reordenamiento del arreglo de los ligandos es menor cuando el sitio de cobre se encuentra inmerso en el plegamiento proteico, a causa de la ya comentada restricción proteica, mientras que si se aísla el sitio de la proteína el cambio de geometría de coordinación es mayor. En función de los valores obtenidos de τ_4, los sitios en las quimeras en estado oxidado presentan geometrías intermedias entre tetraédrica y plano-cuadrada (distorsión tetragonal muy marcada), por otra parte, el estado reducido es más tetraédrico, con valores de τ_4 muy cercanos a 1. Esto quiere decir que cada estado redox logra adoptar una estructura que tiende a la preferida, más estable, por el cobre II y I respectivamente[14]. Sin embargo, si bien la interacción entre los bucles y la matriz de *Tt*-Cu_A no es óptima, en el sentido que no fue seleccionada de manera natural como en las proteínas silvestres, la interacción estérica definirá una nueva restricción proteica, y es por ello que el valor de $\Delta\tau_4$ para las quimeras no llega a alcanzar aquel de un sitio de cobre libre de proteína, y se posiciona en una situación intermedia. La comparación de la región del bucle y el sitio metálico entre ambos estados redox revela estos cambios de geometría, Figura-23.

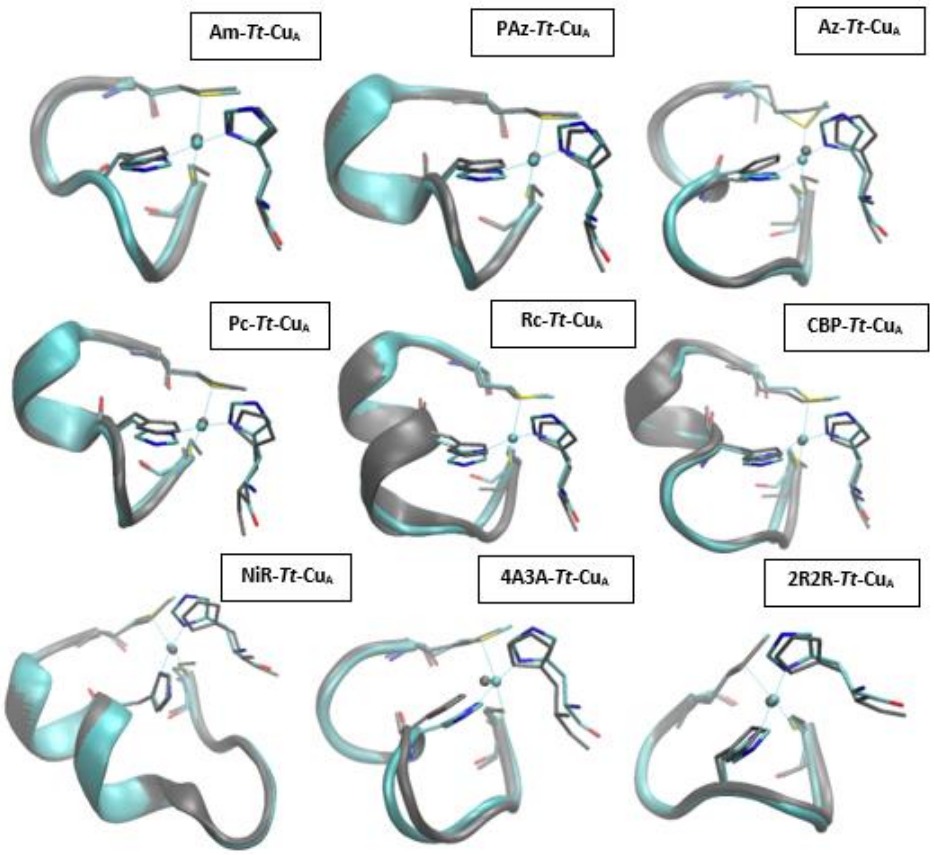


Figura 23: *En esta figura se presentan los alineamientos estructurales de los bucles y el centro metálico para las quimeras en estado oxidado (cian) y estado reducido (gris).*

Es interesante notar que en las proteínas silvestres los enlaces entre átomos S(Met)-Cu-S(Cis)-Cβ(Cis)-Cα(Cis)-N(Cis) se encuentran casi invariablemente en un mismo plano, y raramente se desvían algunos grados de sus posiciones en 0° o 180°. Los cálculos muestran que esta coplanaridad se perdió en las quimeras, Tabla-5. Esta observación es consistente con la baja intensidad de los espectros Rr en las quimeras relativo a aquellos de las proteínas silvestres, debido a la pérdida de una de las vías de intensificación de la señal Raman, el acoplamiento vibrónico-cinemático[45,46,48,49]. Por otro lado, esta pérdida de la coplanaridad también supone una redistribución de modos normales que indudablemente tendrá cierto impacto en los valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ en las quimeras, introduciendo una nueva variable a considerar al compararlas con sitios donde la coplanaridad se preserva. Quizás esta sea la causa de la gran variación en los valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ respecto a la poca variación en el parámetro $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$ señalada previamente, ver Figura-18. Por otro lado, esta falta de coplanaridad también podría representar la causa estructural de la "relajación" o la "falta de cumplimiento estricto" del modelo de distorsión acoplada a lo largo del conjunto de quimeras. Dado que observamos que las consecuencias de los cambios en la interacción Cu-S_{Met} no son trasladados tan directamente al enlace Cu-S_{Cis}, como ocurre en las variedades silvestres donde esta coplanaridad de enlaces parece ser la norma, es factible pensar que parte de ese efecto se ve parcialmente amortiguado por la suma de pequeñas distorsiones en ángulos convencionales, ángulos dihedros, y torsiones impropias del conjunto de átomos S(Met)-Cu-S(Cis)-Cβ(Cis)-Cα(Cis)-N(Cis), así como también de los átomos de nitrógeno coordinantes, que pueden quedar sujetos, en menor medida, a cambios en densidad electrónica del átomo de cobre.

Como corolario del análisis espectroscópico y computacional podemos decir que estas quimeras poseen sitios metálicos de T1 rómbicos que presentan distorsiones geométricas únicas, incluso más extremas que aquellas presentes en los sitios T1 más distorsionados conocidos, como el de NiR (interacción Cu-S_{Met}). Éstas se deben a nuevas imposiciones estéricas debido a la matriz proteica de *Tt*-Cu_A y a su interacción con la arquitectura del bucle implantado, el que, a su vez, depende tanto del largo como de la secuencia aminoacídica. Entre estas nuevas características geométricas destacamos:

1) Presentan las mismas firmas espectroscópicas que los sitios T1 rómbicos en cuanto a la interacción Cu-S_{Cis}, puestas de manifiesto en:
   a) La intensidad relativa de las bandas de TCLM σ-S_{cis}→Cu^{+2} y π-S_{cis}→Cu^{+2}. Específicamente el cociente $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$ adopta valores en el rango de 1,10-1,64, Tabla-2, indicando un grado de rombicidad, o de distorsión tetragonal, similar en todas ellas, y similar al reportado para el sitio T1 de NiR.
   b) El análisis de espectros EPR lleva a la mismas conclusiones posicionando a las quimeras en el extremo del diagrama de Peisach-Blumberg donde se ubican los sitios T1 rómbicos con valores de acoplamientos hiperfinos ($A_{\parallel}$) en el rango 80-90 (x 10^{-4} cm^{-1}).
   c) La interpretación que se obtiene de experimentos de Raman resonante es consistente con el resto de las espectroscopias, con valores de $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$ en el rango típico para

sitios T1 rómbicos (360-390 cm^{-1}). Aunque la relación propuesta para sitios silvestres parece relajarse en nuestro sistema.

2) Al mismo tiempo que presentan un marcado incremento de la interacción Cu-S_{Met}, a juzgar por su intensa banda centrada en 400-450 nm en los espectros de absorción UV-visible, y la corta distancia de ese enlace según el cristal de Am-*Tt*-Cu_A, con una media de 2,35 Å, y los modelos *in silico* de todo el conjunto de quimeras, con una media de 2,44 Å.
3) Los modelos computacionales corroboran esta observación en base a los parámetros τ_4, cociente de distancias Cu-S_{Met}/Cu-S_{Cis} y el ángulo entre planos N-Cu-N y S-Cu-S, ver Figura-22 y Tabla-6.

Es importante destacar que las quimeras se parecen mucho entre sí, y que una de las características comunes entre ellas, y que las diferencia marcadamente de sus parientes silvestres con quienes comparten la secuencia y conformación del bucle, es la intensa envolvente alrededor de 400-450nm en su espectro de absorción UV-visible. Por otro lado todas las quimeras comparten una rombicidad similar, R_L entre 1,10-1,64, prácticamente de manera independiente de las características del bucle, contrario a lo que se observa en sistemas silvestre cuyos valores de R_L que van de 0,06 para sitios T1 axiales y 6,0 para sitios T2. Esto parece ser consecuencia directa de la restricción proteica impuesta por la matriz *Tt*-Cu_A más que propiedades conferidas por el bucle. De modo que, al parecer el bucle introducido parece tener menos peso en determinar características estructurales robustas de los sitios. Esta observación coincide con resultados previos en sistemas quiméricos análogos a los estudiados en esta tesis, aunque en su momento los autores no hayan llamado la atención sobre este aspecto. Por ejemplo, reemplazar el bucle de amicianina de *Paracoccus versutus* (*Pc*), una proteína con un sitio T1 axial o azul, por secuencias análogas de los sitios de pseudoazurina y NiR, que poseen sitios de T1 rómbicos o verdes, lleva a la generación de quimeras denominadas PAz-*Pv*-Ami y NiR-*Pv*-Ami que presentan espectros de absorción UV-visible con características mucho más similares a aquellas de la amicianina, que es quien aporta la matriz proteica, que a las características de los espectros de las proteínas donantes de los bucles. Es decir, presentaron color azul y espectros con una fuerte banda en torno a los 600-650 nm, correspondiente a una TCLM π-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$.[31] Por otro lado, también se reportó la quimera inversa, es decir la obtenida mediante la introducción de un bucle de un sitio T1 axial o azul en el esqueleto de una proteína que alberga un centro T1 rómbico o verde como sitio natural. En este caso el bucle de la proteína amicianina fue introducido en la matriz proteica de la pseudoazurina de *Achromobacter cycloclstes* (*Ac*), y la quimera Am-*Ac*-PAz presentó un color verdoso, y un espectro similar al de la pseudoazurina, es decir con una banda TCLM σ-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$ en torno a los 450 nm, con una intensidad similar.[59]

Sin embargo, si bien la matriz proteica parece dominar las características principales del sitio metálico, esto no quiere decir que los bucles no aportan a la estructura, pero lo hacen de un modo más sutil. Este aporte es aún más sutil en matrices proteicas diferentes de la nativa. En ese sentido encontramos correlaciones entre el grado de rombicidad, $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$, y parámetros geométricos que varían a lo largo del conjunto de las quimeras, lo cual pone de manifiesto el peso de la interacción estérica del binomio bucle-matriz proteica y que, como veremos en la siguiente sección, permiten una modulación fina del potencial de reducción de hasta 60 mV.

3.5-Caracterización electroquímica

3.5.1-Modulación del Potencial de Reducción

El próximo paso consistió en evaluar las propiedades funcionales de estos sitios de cobre, y en particular nos concentramos en las propiedades asociadas a la reacción de TE. Para ello realizamos experimentos de voltametría cíclica de soluciones proteicas a fin de obtener el valor del potencial de reducción. Se emplearon electrodos de oro biocompatibilizados, ver Capítulo 2 sección-2.2. La estrategia de biocompatibilización consiste en recubrir la superficie metálica con monocapas autoensambladas (*SAMs*) de alcanotioles-ω-sustituidos. El grupo tiol se une a la superficie de oro exponiendo hacia la solución el grupo en posición omega. En este caso se empleó el 6-mercapto-1-hexanol (SH-$(CH_2)_n$-OH ; n = 6) ya que se demostró que los grupos funcionales hidroxilo impiden la adsorción inespecífica de las proteínas sobre las superficie metálica y su consecuente desnaturalización, a la vez que al tratarse de una SAM de cadena corta permite el establecimiento de un buen acoplamiento electrónico entre los sitios metálicos y el electrodo. Los voltagramas obtenidos a pH 7 y 298 K empleando velocidades de barrido lentas (10 $mV.s^{-1}$) se presentan en la Figura-24. Las señales obtenidas para todo el conjunto de quimeras corresponden a voltametrías reversibles con separaciones de pico en el rango 60-80 mV, con solo tres de ellas en el rango 107-114 mV indicando un comportamiento cuasirreversible a esa velocidad de barrido. Además, presentan señales simétricas con cocientes de intensidad de corriente cercanos a 1 y corrientes de pico que escalan con la raíz cuadrada de la velocidad, tal como se espera para procesos redox reversibles controlados por la difusión de las proteínas en la solución Figuras-25 y Tabla-7. La quimera NiR-*Tt*-Cu_A es la única que presenta señales asimétricas con una menor intensidad global y asimetría de los picos anódico y catódico, lo que probablemente se deba a una estabilidad menor del estado reducido.

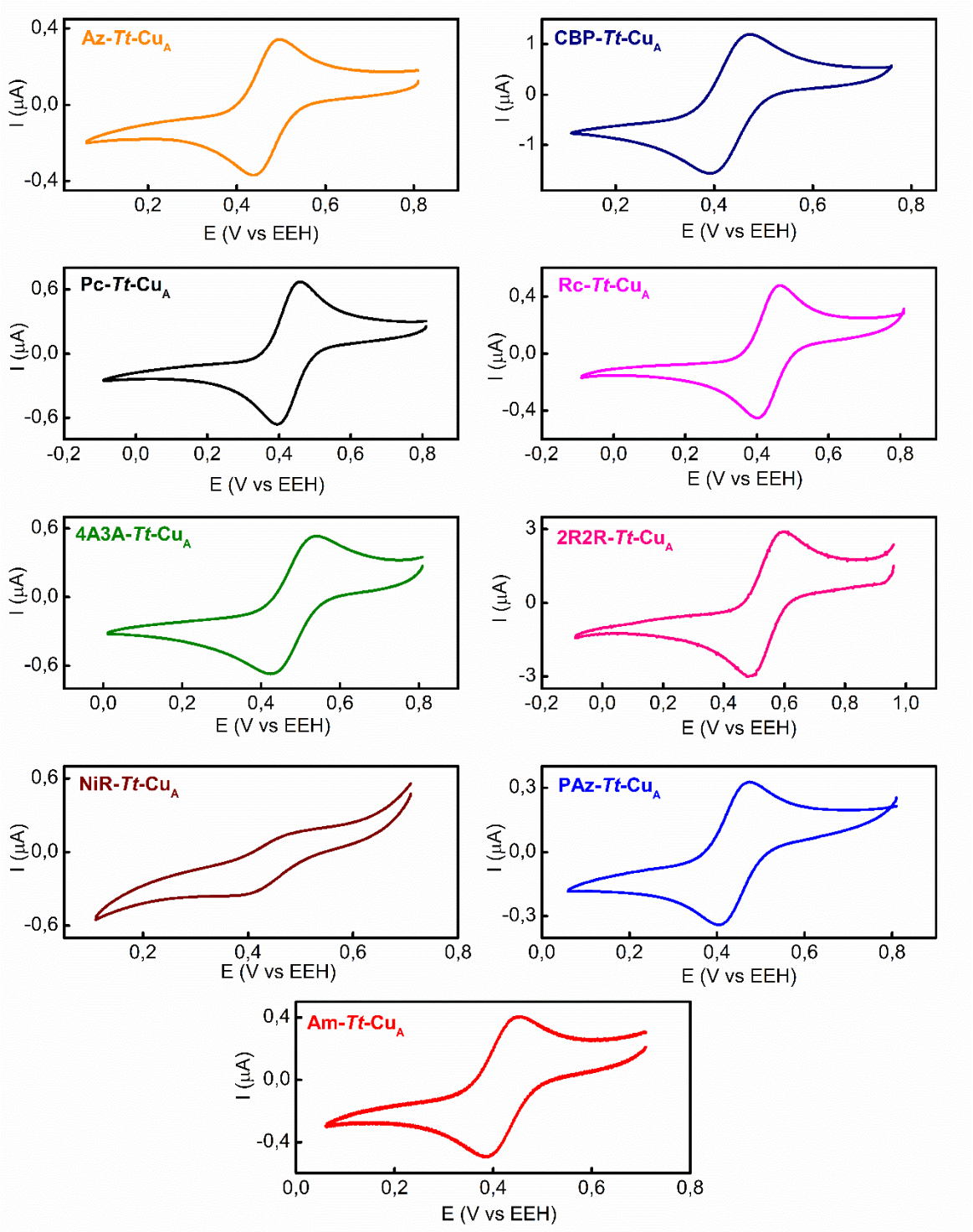


Figura 24: *Voltagramas de soluciones proteicas obtenidos con electrodos de oro recubiertos con SAMs puras de SH-$(CH_2)_{n=6}$-OH empleando velocidades de barrido de 10 mV.s^{-1}, a 298 K en buffer fosfato 10mM, pH 7, KNO_3 500 mM.*

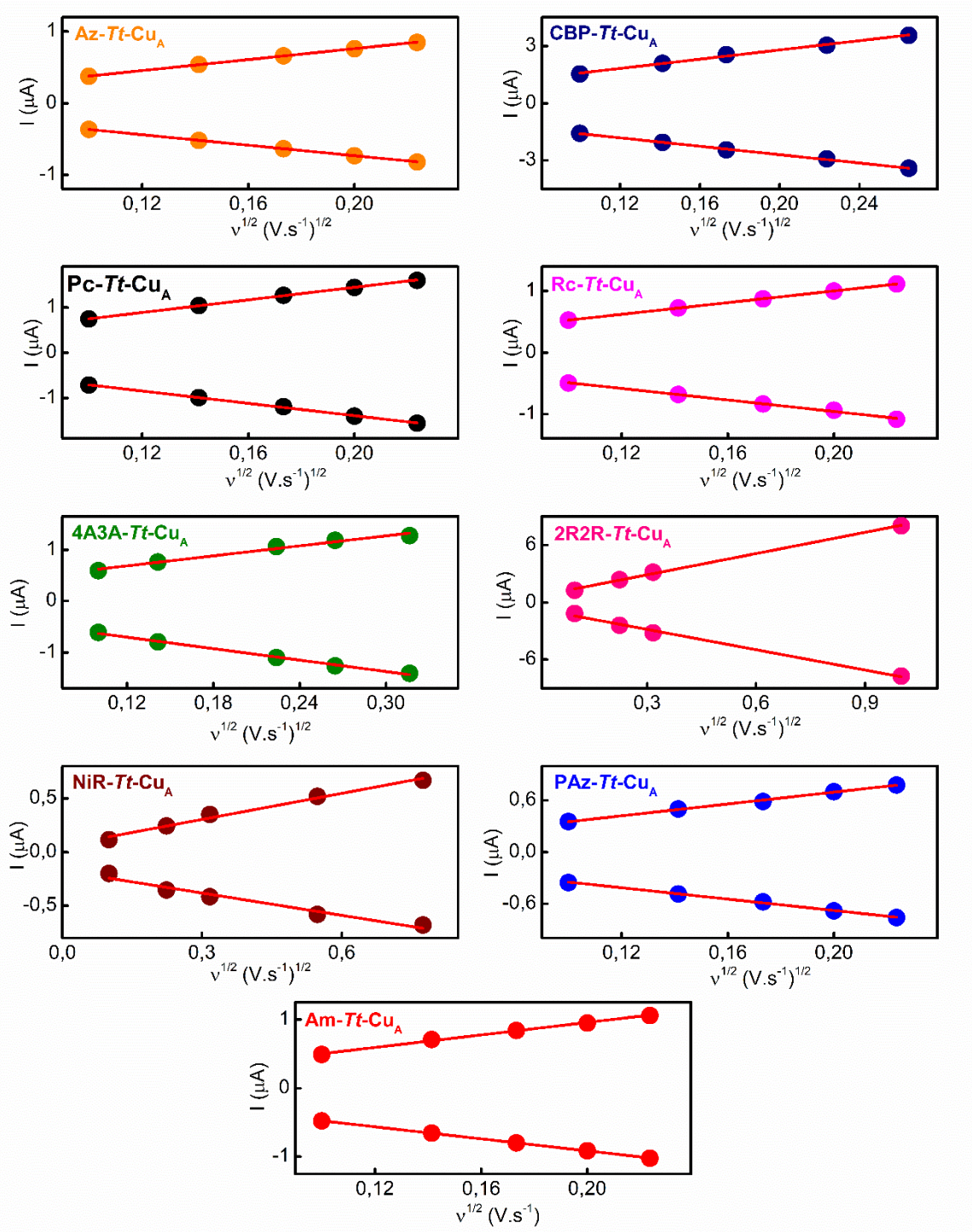


Figura 25: *Corriente de pico anódica y catódica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para todas las proteínas estudiadas. Se observa un incremento lineal tal como se espera para un proceso de control difusional sobre el electrodo de especies redox activas reversibles.*

Tabla-7: *Parámetros electroquímicos de soluciones proteicas sobre electrodos de oro funcionalizados con SAMs, a 298K.*

	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
E°´(mV vs ENH)	419 (±1)	442 (±2)	420 (±4)	470(±2)	482 (±2)	436(±1)	428(±2)	434(±1)	540 (±1)
Ic/Ia	0,95	0,97	0.99	0,99	0,97	0,98	0,94	1,47	1,03
∆Ep (mV)	65	68	64	57	114	80	63	107	111

Con excepción de Rc-*Tt*-Cu_A todas las quimeras presentaron valores de potencial de reducción muy por arriba de los valores de las variedades silvestres, Tabla-7 y Figura-26-A. Este incremento que se encuentra en el rango de 50-210 mV es un rasgo distintivo de este conjunto de quimeras basadas en la matriz de *Tt*-Cu_A y contrasta fuertemente con otros sistemas en donde se trasplantaron bucles de sitios T1 azules y verdes en otras proteínas portadoras[59,60], Figura-26-B. Estos corrimientos pueden adjudicarse, al menos parcialmente, al debilitamiento de las restricciones proteicas nativas en las quimeras. Existe evidencia experimental que va de acuerdo con esta interpretación que indica que la desnaturalización parcial de la azurina de *Pseudomonas aeruginosa* lleva a un aumento de 130 mV en el potencial de reducción[61,62]. Se cree que en estas proteínas los sitios presentan potenciales menores que aquellos que presentaría el complejo metálico libre, y la presencia de restricciones proteicas estaría regulando hacia abajo estos valores.

En las quimeras en matrices de T1 se vio que el potencial redox, si bien variaba respecto de las silvestres, esta variación presentaba cierta correlación con el bucle implantado. Esto llevó a que las tendencias en las quimeras sigan el mismo orden que en las proteínas silvestres. Por ejemplo, el orden del potencial redox para las proteínas nativas es plastocianina > azurina > pseudoazurina, y en las quimeras generadas sobre la matriz de amicianina (*Paracoccus versutus*) se obtiene Pc-*Pv*-Am > Az- *Pv*-Am > PAz- *Pv*-Am. De modo similar, la plastocianina silvestre presenta mayor potencial de reducción que su equivalente amicianina, mientras que para quimeras generadas por inserción de los bucles ligandos de estas dos proteínas en la matriz de azurina (*Pseudomonas aeruginosa*) se observa Pc-*Pa*-Az > Am- *Pa* –Az, Figura-26-B. De modo que se verifica un grado de transferencia de información estructural en la secuencia de los bucles, y por lo tanto en su arquitectura también, que son traslados a los valores de potencial. Esto indica cierta complementariedad entre las matrices y los bucles de este tipo de proteínas. En las quimeras de *Tt*-Cu_A esta transferencia de información no se observa debido a la pérdida de tal complementariedad. Recordemos que la selección natural operó sobre la matriz de *Tt*-Cu_A optimizando sus propiedades estructurales, funcionales y dinámicas para albergar un sitio binuclear de cobre, el sitio de Cu_A.

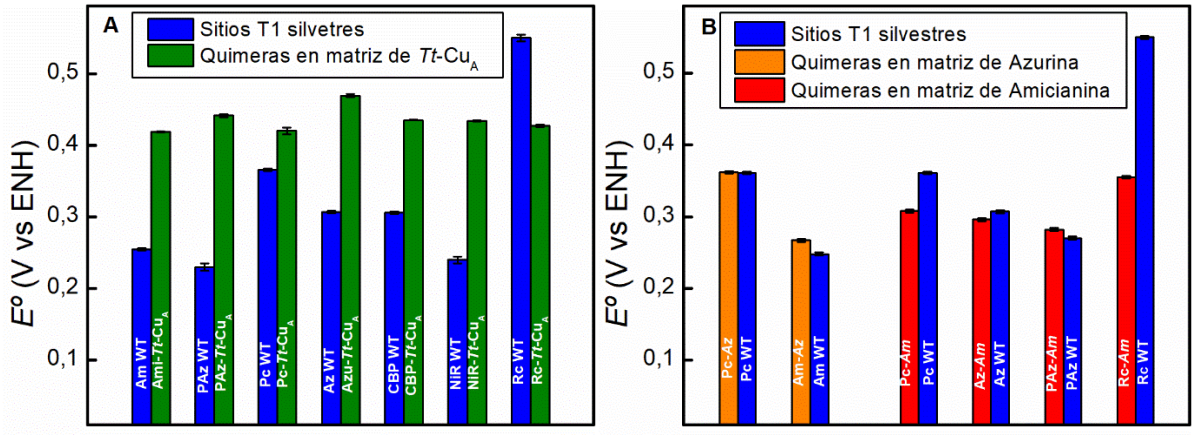


Figura 26: ***A.*** *Potenciales de reducción de las quimeras en matriz de Tt-Cu$_A$ en comparación con las proteínas silvestres.* ***B.*** *Potenciales de reducción de quimeras en matrices de proteínas que naturalmente albergan sitios T1 en comparación con los sitios nativos.*

Por otro lado, existe un grupo carbonilo perteneciente a un enlace amida de un residuo situado en posición axial al sitio metálico, la isoleucina-74 en *Tt*-Cu$_A$, Figura-27-A cuya orientación y distancia han sido relacionadas con la determinación del potencial redox en este tipo de sistemas[63]. Normalmente, es el oxígeno carboxílico el que se encuentra en dirección al átomo de cobre, Figura-28-A. Para nuestras quimeras la distancia promedio de este grupo al átomo de cobre ronda los 4,5-4,7 Å. Si esta distancia es menor que aquella encontrada en la proteína nativa el potencial presenta una disminución de su valor, como es el caso de la quimera Rc-*Tt*-Cu$_A$. Por otro lado, si esta distancia es mayor que aquella encontrada en las proteínas nativas, el potencial redox presenta un incremento en sus valores, Figura-28-B. En el caso de la Rusticianina (Rc) silvestre este grupo amida se encuentra rotado casi 180 grados exponiendo el grupo amino hacia el sitio de cobre, con el átomo de oxígeno a 5,9 Å del cobre[64,65], Figura-28-A. Si bien existe cierto grado de deslocalización electrónica a lo largo del grupo amida, el átomo de nitrógeno posee una densidad de carga positiva, mientras que el de oxígeno una densidad de carga negativa. La densidad de carga positiva desestabilizaría la forma oxidada respecto de la forma reducida contribuyendo al alto valor de potencial redox en el sitio de Rusticianina. En la quimera Rc-*Tt*-Cu$_A$ es el grupo carbonilo el que apunta en dirección al cobre de modo que genera el efecto contrario, estabilizador, debido a la densidad de carga negativa, explicando así, en parte, la disminución del potencial. En el resto de los sitios silvestres también es el carbonilo el que se encuentra orientado hacia el cobre, presentando diferentes distancias según detalles de su matriz proteica. Incluso puede encontrarse en valores cercanos a los 2 Å formando parte de la primera esfera de coordinación como en el caso de la Azurina[66–68].

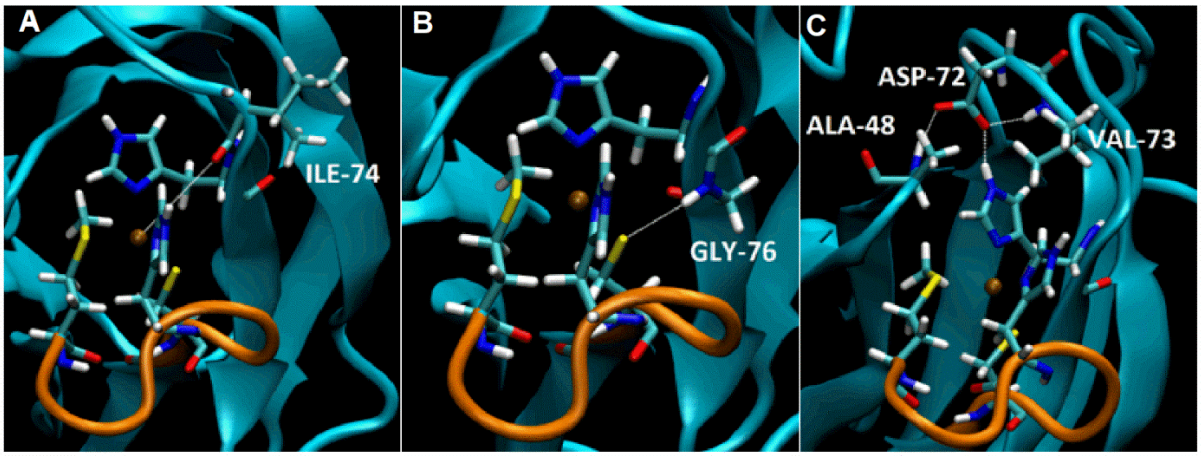


Figura 27: *Detalle del sitio metálico de Am-Tt-Cu$_A$ obtenido mediante DM indicando* ***A.*** *el carbonilo amídico del residuo isoleucina 74.* ***B.*** *el enlace puente hidrógeno entre el grupo amida de la glicina 76 y el sulfuro coordinante de la cisteína,* ***C.*** *red de puente hidrógeno que involucran a la histidina 75 proveniente de la matriz proteica.*

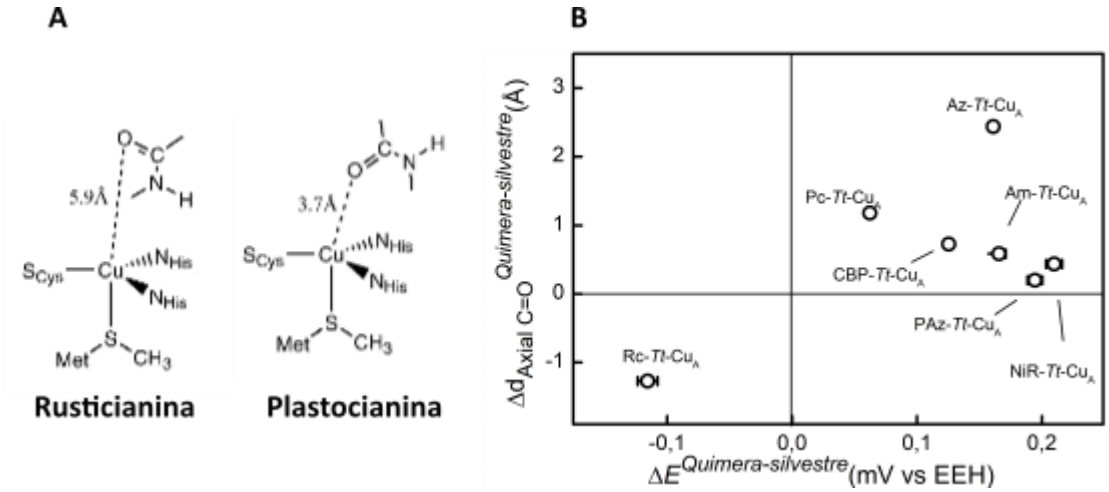


Figura 28*: **A.** (Adaptada de Li et al 2004*[63]*) Esquema del sitio T1 de Rusticianina y Plastocianina indicando la orientación del grupo amida axial y la distancia del oxígeno carbonílico al átomo de cobre.* ***B.*** *Diferencia en la distancia del grupo carbonilo amídico de la isoleucina 74 que se encuentra en posición axial al sitio de cobre en función de la diferencia entre potencial de reducción de las quimeras y las proteínas silvestres.*[12,64,66–73]

Otro factor importante en la determinación del potencial de reducción en este tipo de sitios metálicos es la densidad electrónica alrededor del átomo de cobre, la cual puede verse influenciada por la fuerza de un enlace de hidrógeno al sulfuro de la cisteína[63,74,75]. El cambio en la densidad del cobre influye en la estabilidad relativa del cobre II y cobre I, modulando de esta manera el potencial redox. Esta interacción de hidrógeno generalmente proviene de un grupo amida cercano, que en la matriz de *Tt*-Cu$_A$ corresponde al residuo glicina 76, Figura-27-B. En las quimeras esta interacción presenta una distancia relativamente constante a lo largo del conjunto, con un valor promedio de 3,6 (±0,1) Å, Tabla-5. Esta es una interacción no menor dado que se ha reportado una modulación de hasta 100mV mediante la

ingeniería de este enlace hidrógeno en proteínas silvestres, valiéndose de la restricción proteica natural que en ellas opera, que no se trata de otra cosa que una red de puentes hidrógeno e interacción estérica entre residuos cercanos a este residuo clave tanto en el bucle como en la matriz[76–78]. De ese mismo modo la matriz de *Tt*-Cu_A impone nuevas fuerzas que determinan la estabilidad de ambos estados redox. Como venimos discutiendo extensamente, el origen de tales fuerzas debe encontrarse en la interacción estérica de las diferentes estructuras proteicas, cadenas laterales, esqueleto proteico, así como también otro tipo de interacciones como la hidrofóbica, iónica y red de puentes hidrógeno. En este sentido es imperante señalar que el residuo histidina 75, proveniente de la matriz, se encuentra formando un enlace hidrógeno con el residuo aspartato 72, el cual a su vez interactúa de la misma forma con otros dos residuos linderos, la alanina 48 y la valina 73, Figura-27-C.

Hasta aquí se señalaron características comunes en todas las quimeras que son las causantes de que este conjunto presente potenciales de reducción similares en el rango de 420-480 mV. Esencialmente estas características dependen fuertemente de la matriz proteica, la cual es común en todas ellas. Sin embargo, entre las quimeras existen diferencias más sutiles que ya fueron puestas de manifiesto en secciones anteriores tanto espectroscópica como estructuralmente. Considerando que una parte esencial del potencial es la diferencia de energía entre el estado oxidado y reducido, estas diferencias en geometría podrían brindar alguna idea del origen de esta modulación fina de 60 mV. En la Figura-29 se presentan correlaciones con estos parámetros. Aquí vemos que el potencial de reducción presenta una correlación similar con el cociente $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$, verificando que efectivamente se encuentran relacionados, Figura-29-A. Tendencias similares se observan al utilizar otros estimadores de distorsiones estructurales, tal como anticipábamos, Figura-29-B y C. Obviamente ninguno de estos parámetros depende unívocamente de los otros, y la energía libre del proceso de reducción involucra muchas otras variables. Por ejemplo, el entorno electrostático también cumple un rol importante en la determinación de los niveles energéticos de los estados redox. Un entorno con densidad de carga positiva o fuertemente hidrofóbico desestabilizaría, de manera relativa, el estado redox con mayor carga, en este caso el oxidado, llevando a un incremento del potencial. De la misma forma un entorno con densidad de carga negativa tendría el efecto opuesto. En este sentido, cuantificamos cómo varía el entorno del cobre estimando la hidrofobicidad del bucle como la suma de la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los residuos que lo componen[79,80]. Dado que se observa cierta tendencia entre estos valores y el potencial, esta contribución no puede ser descartada, Figura-29-D. La hidrofobicidad brinda de manera indirecta el aporte del conjunto de dipolos de las cadenas laterales de residuos del bucle, sin embargo, el efecto de la introducción de cargas puntuales es mucho más pronunciado. La quimera 2R2R-*Tt*-Cu_A presenta el mismo largo de bucle que Am-*Tt*-Cu_A, y vemos que la hidrofobicidad y los parámetros $\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$, Cu-$S_{Met}$/ Cu-$S_{Cis}$ y $\Delta\tau_4$ no varían demasiado, sin embargo, su potencial es 120 mV superior. Podemos adjudicar esta fuerte diferencia al hecho de que cuatro de los siete residuos del bucle poseen cargas positivas a pH 7. El resto de las quimeras presentan aminoácidos neutros en sus bucles, a excepción de NiR-*Tt*-Cu_A que contiene un ácido glutámico, que aportaría una carga negativa, y que presenta uno de los valores de potencial más bajos, en línea con los argumentos electrostáticos planteados.

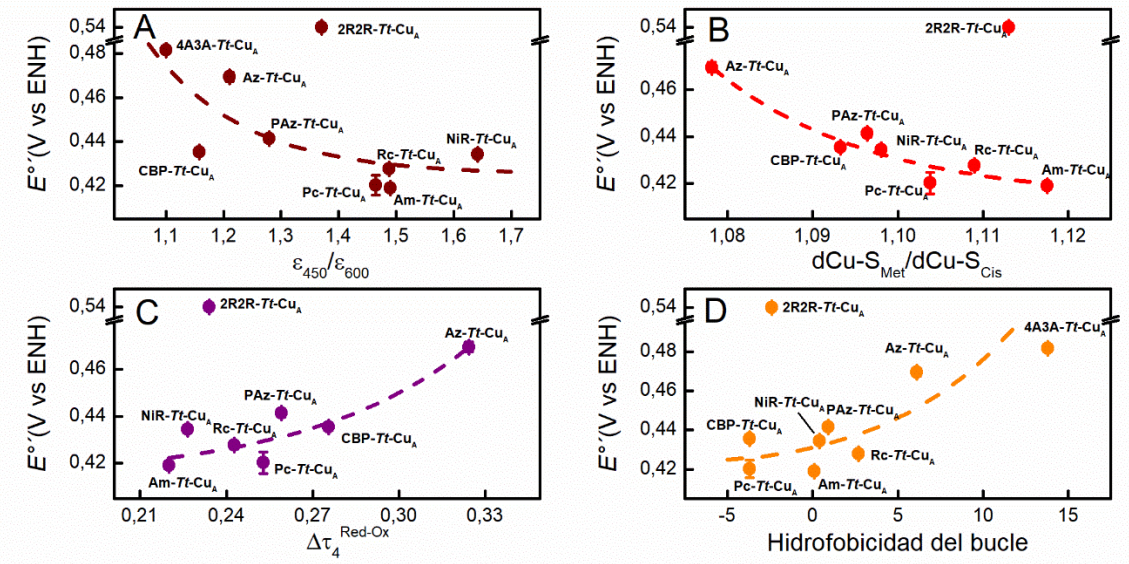


Figura 29: *Correlación entre el potencial de reducción y diferentes parámetros espectroscópicos y estructurales.* ***A.*** *Cociente de intensidades de las bandas principales de absorción en el UV-visible.* ***B.*** *Cociente de distancias Cu-S_{Met}/ Cu-S_{Cis}.* ***C.*** *Diferencia del parámetro τ_4 entre el estado oxidado y reducido.* ***D.*** *Hidrofobicidad de los residuos del bucle.*

Dado que el solvente circundante también contribuye al entorno electrostático se calcularon los valores de las áreas superficiales accesibles a solvente (ASAS) de los sitios metálicos a partir de las DM con el fin de evaluar su influencia. En este caso se consideró como sitio metálico el átomo de cobre más las cadenas laterales de los cuatro residuos de primera esfera, y se encontró que los valores rondan los 440-480 $Å^2$, Tabla-5. Los valores de potencial no presentan claras tendencias con los valores estimados de ASAS en ninguno de sus estados redox, ni tampoco con su diferencia, Figura-30 A y B, indicando que estas diferencias en la accesibilidad al sitio no influyen fuertemente en la estabilidad relativa del Cu^{2+} *vs*. Cu^{1+}. Estos resultados pueden ser racionalizados en términos del fenómeno de compensación entrópico/entálpica que se tratará en la siguiente sección. Por otro lado, es importante señalar que el valor de ASAS aumenta al aumentar el largo del bucle. Esta tendencia es de gran importancia para la modulación de parámetros cinéticos de la reacción de TE y, junto al fenómeno de compensación entrópico/entálpico, permiten el desacople y modulación independiente de los parámetros cinéticos y termodinámicos en este conjunto de quimeras.

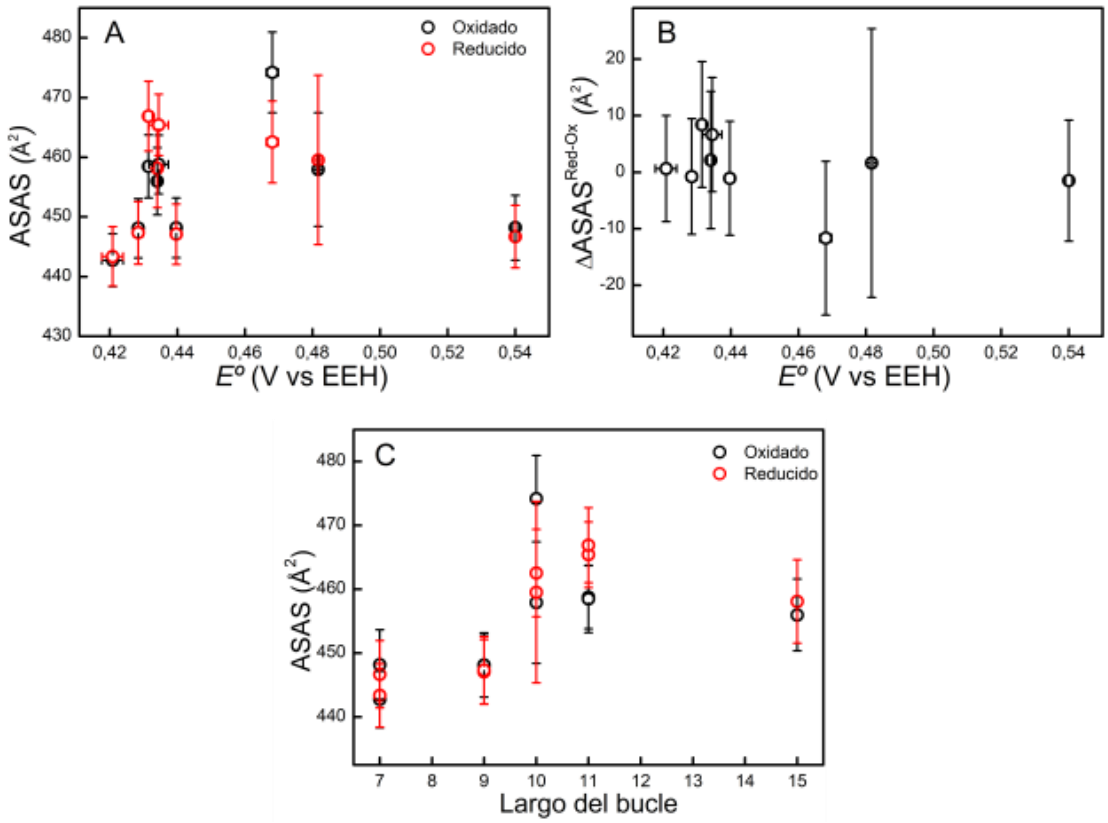


Figura 30: *Correlación entre la accesibilidad al sitio, ASAS, y su diferencia entre ambos estados redox, y los valores del potencial de reducción y largo de bucle.*

3.5.2-Obtención de las contribuciones entrópicas y entálpicas al potencial de reducción.

En las secciones anteriores se han señalado distintas correlaciones entre aspectos estructurales y electrostáticos con el potencial redox. En todos los casos una explicación en términos energéticos, basados en des/estabilización relativa del estado oxidado frente al reducido, permitió entender las variaciones en este parámetro. Sin embargo, como toda energía libre de un proceso, el potencial redox posee tanto contribuciones entálpicas como entrópicas. Estas últimas, sin embargo, pueden resultar en contribuciones sumamente importantes al potencial redox que suelen estar asociadas con aspectos estructurales y/o electrónicos no triviales[81,82]. Con el fin de discriminar las contribuciones entrópicas y entálpicas al potencial redox se realizaron experimentos de VC en función de la temperatura. Se adquirieron voltagramas de soluciones proteicas en un rango de 4-40°C empleando una celda electroquímica con una camisa termostática, ver Capítulo 2 sección 2.2.2. Se obtuvo el valor de $E°$ para cada temperatura a partir de un promedio de voltagramas adquiridos a diferentes velocidades de barrido, típicamente entre 10-100 $mV.s^{-1}$. En todos los casos se verificó la reversibilidad con la variación de T, es decir, los experimentos se realizaron subiendo y bajando la temperatura indistintamente, con el fin de descartar efectos de histéresis en las medidas. Los valores de ΔH_{Red} y ΔS_{Red} se obtuvieron a partir de regresiones lineales de los

datos experimentales empleando las siguientes relaciones termodinámicas, en las que F es la constante de Faraday y n el número de electrones intercambiados en la reacción de TE.

$$\Delta S_{Red} = nF \left(\frac{\partial E}{\partial T}\right)_p \qquad \textbf{Ecuación-3}$$

$$\Delta H_{Red} = -nF \left(\frac{\partial E.T^{-1}}{\partial T^{-1}}\right)_p \qquad \textbf{Ecuación-4}$$

Se realizaron experimentos a dos valores de pH (7 y 4,6) y empleando distintos tipos de buffers (HEPES, fosfato y acético); los valores se encuentran presentados en la Tabla-8, y ejemplos representativos de las diferentes representaciones de la variación de *E°* con la temperatura se presentan en las Figuras-31 y 32.

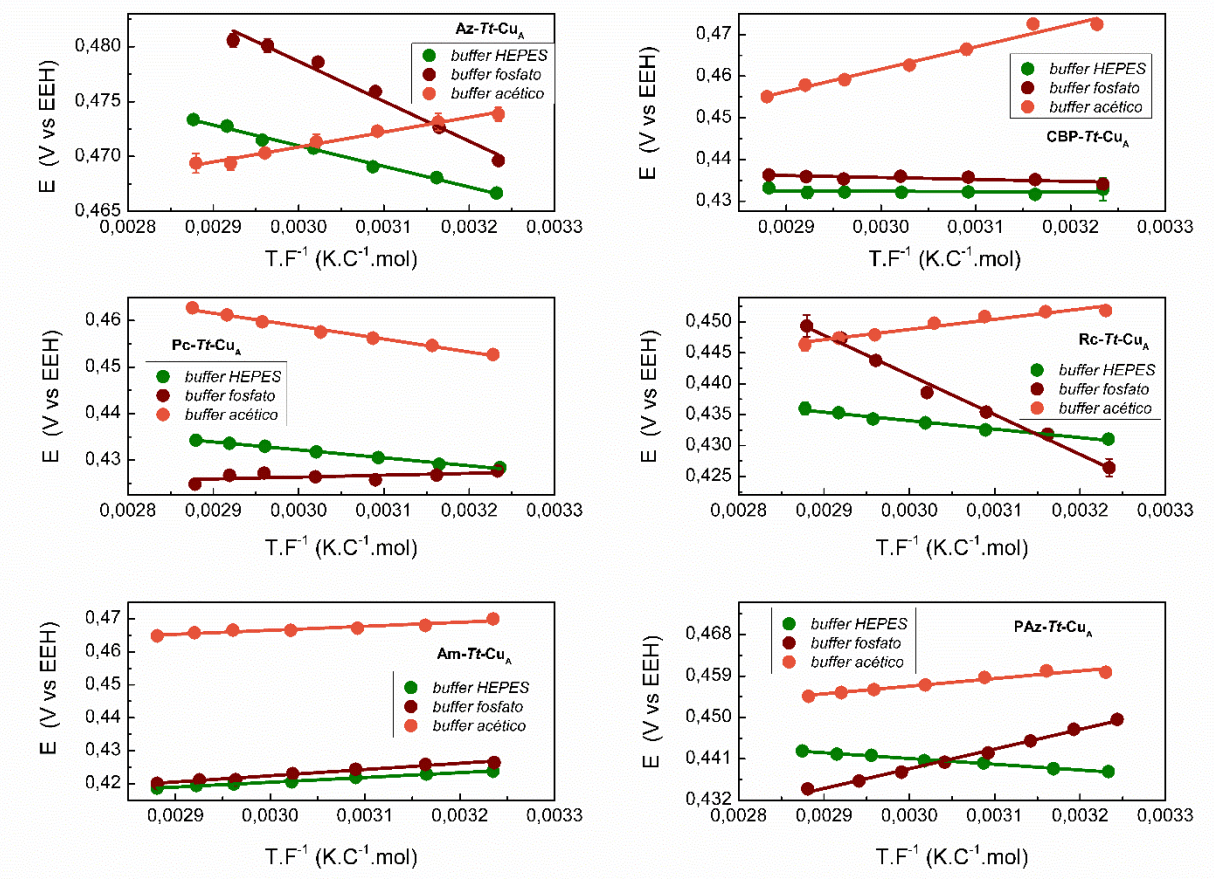


Figura 31: *Valores del potencial redox en función de la temperatura en el rango de 4-40°C para todas las quimeras, obtenidos en tres buffers diferentes, HEPES 10mM pH 7, fosfato 10 mM 10mM pH 7 y acético 10 mM pH 4,6, todos 500 mM en KNO_3. Se utilizaron electrodos de oro, recubiertos con SAMs puras de SH-$(CH_2)_{n=6}$-OH.*

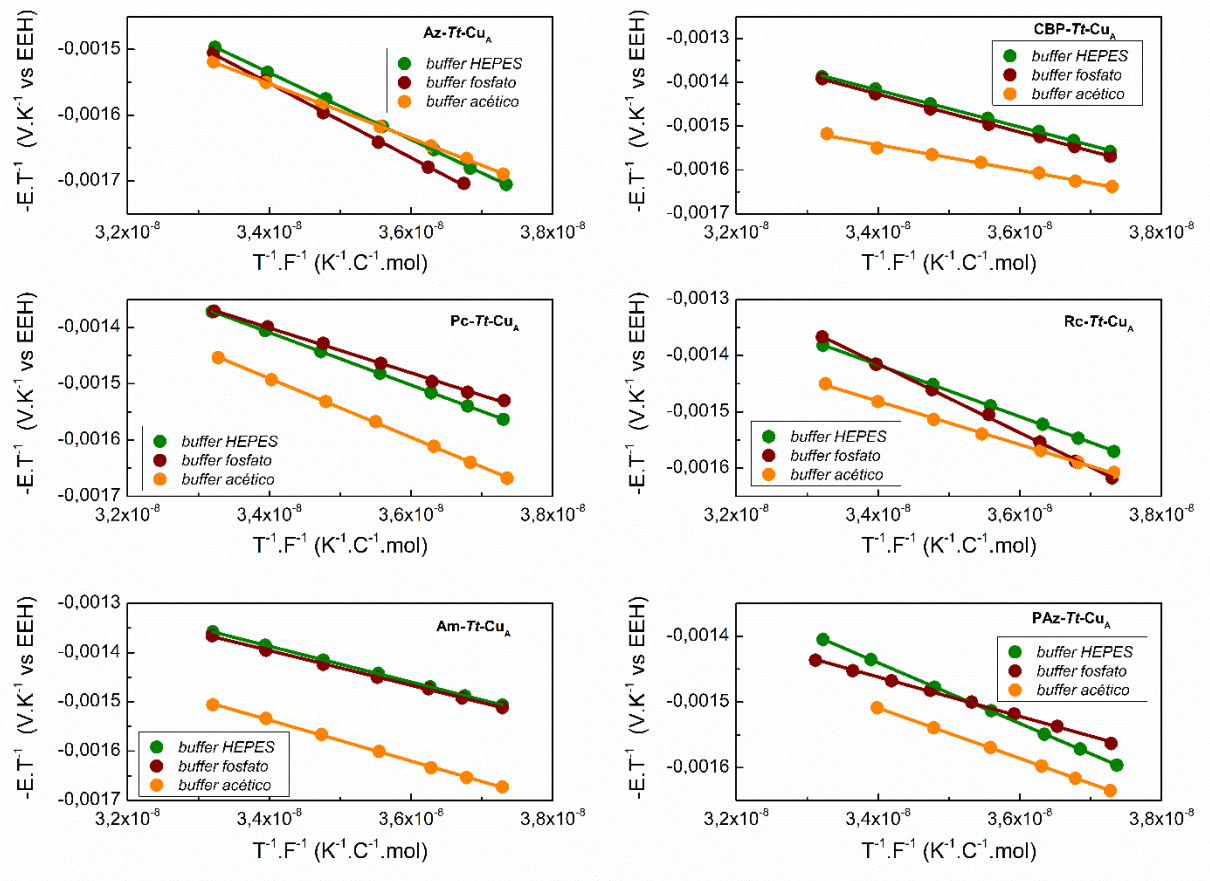


Figura 32: *Valores del cociente $E.T^{-1}$ en función de la inversa de la temperatura en el rango de 4-40°C para todas las quimeras, obtenidos en tres buffers diferentes, HEPES 10mM pH 7, fosfato 10 mM 10mM pH 7 y acético 10 mM pH 4,6, todos 500 mM en KNO_3. Se utilizaron electrodos de oro, recubiertos con SAMs puras de SH-$(CH_2)_{n=6}$-OH.*

Tabla-8: *Valores de ΔH_{Red} y ΔS_{Red} para el conjunto de quimeras en todas las condiciones evaluadas. En todos los casos se utilizó KNO_3 500 mM como electrolito soporte.*

Condición de medida	*Parámetro termodinámico*	Am-*Tt*-Cu$_A$	PAz-*Tt*-Cu$_A$	Pc-*Tt*-Cu$_A$	Az-*Tt*-Cu$_A$	CBP-*Tt*-Cu$_A$	Rc-*Tt*-Cu$_A$
Buffer HEPES, pH 7	*E°´ (mV vs EEH)*	421(±3)	440(±1)	429(±2)	469(±2)	432(±1)	434(±3)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-35,0(±1,8)	-46,9(±0,6)	-46,4(±0,6)	-50,7(±1,4)	-42,1(±1,0)	-46,8(±1,3)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	18(±6)	-15(±2)	-17(±2)	-18(±4)	-1(±3)	-16(±4)
Buffer Fosfato, pH 7	*E°´ (mV vs EEH)*	419(±1)	442(±2)	420(±4)	470(±2)	436(±1)	428(±2)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-35,0(±0,4)	-32,4(±2,7)	-40,3(±0,5)	-56,9(±0,5)	-44,1(±1,0)	-56,3(±3,5)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	20(±1)	35(±8)	4(±1)	-37(±1)	-7(±3)	-48,3(±11)
Buffer Acético, pH 4,6	*E°´ (mV vs EEH)*	462(±4)	458(±1)	459(±6)	474(±2)	466(±1)	449(±2)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-38,7(±2,1)	-39,0(±0,9)	-52,5(±1,8)	-40,7(±0,8)	-29,4(±1,8)	-38,2(±0,5)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	19(±6)	18(±3)	-28(±4)	17(±3)	53(±6)	17(±1)

En primer lugar, vemos que los valores de *E°* a pH 7, con ambos buffers, siguen la misma tendencia, más allá de muy pequeñas variaciones de apenas unos pocos milivolts. La diferencia más grande se observa para la quimera Pc-*Tt*-Cu_A y Rc-*Tt*-Cu_A con una diferencia de 9 mV y 6 mV, respectivamente. Por otro lado, los valores de *E°* a pH 4,6 son mayores para todas las quimeras, registrándose diferencias entre 15 y 41 mV, siendo la quimera Az-*Tt*-Cu_A la que presenta la menor variación con solo 4 mV. Esto es consistente con las tendencias reportadas para distintas proteínas con sitios T1, las que indefectiblemente presentan incrementos al bajar el pH[83–85]. En segundo lugar, puede observarse que las componentes entrópicas y entálpicas varían mucho más que los valores de *E°* y, más aún, existe una cancelación parcial de ambas componentes, con predominio de la componente entálpica que termina determinando el valor del *E°*. Este fenómeno ha sido ampliamente reportado en la literatura como el fenómeno de compensación entrópico/entálpica[86–89]. Dado que el potencial redox depende fuertemente de los detalles estructurales del sitio metálico, como los descritos en la sección anterior, y su valor no cambia fuertemente bajo las condiciones de medida empleadas, se descartó la posibilidad de un reordenamiento geométrico del sitio como la causa de las diferencias en valores de ΔS_{Red} y ΔH_{Red}. Por el contrario, todas las miradas se tornaron sobre la esfera de hidratación de las proteínas, y sobre su contribución al *E°*. Se postuló entonces que este fenómeno estaría reportando sobre cambios en la estructura del solvente aledaño al sitio metálico en la proteína dependientes del estado redox del sistema. Los resultados indican que no sólo están sujetos al cambio de carga debido a la reacción de TE, sino que además dependen de la composición electrolítica del medio en que se encuentra la muestra[90,91]. Estas observaciones se verifican para el conjunto de quimeras estudiadas. Las diferencias entre una especie zwiteriónica como el HEPES y una aniónica como fosfato, en alguno de sus estados de protonación $H_2PO_4^{-1}/HPO_4^{-2}$, representan un claro ejemplo. Puntualmente, en buffer HEPES las quimeras PAz-*Tt*-Cu_A, Pc-*Tt*-Cu_A, Az-*Tt*-Cu_A y Rc-*Tt*-Cu_A presentan valores de ΔS_{Red} similares entre -15 y -18 $J.K^{-1}.mol^{-1}$, sin embargo, presentan valores completamente diferentes en buffer fosfato, algunos más positivos y otros más negativos, Tabla-8. Por otra parte, la quimera Am-*Tt*-Cu_A no presenta cambios apreciables bajo ninguna de las tres condiciones evaluadas, con un valor de entre 18 y 20 $J.K^{-1}.mol^{-1}$. Asimismo, las quimeras Am-*Tt*-Cu_A, PAz-*Tt*-Cu_A, Az-*Tt*-Cu_A y Rc-*Tt*-Cu_A coinciden en sus ΔS_{Red} en buffer acético/acetato con valores prácticamente idénticos, dentro del error experimental, entre 17 y 19 $J.K^{-1}.mol^{-1}$. Todo parece indicar que la presencia del ion fosfato tiene algún efecto sobre ΔS_{Red}, probablemente debido a unión específica de este anión con la proteína, en uno o ambos estados redox[92–94]. La presencia de un anión unido sobre la superficie proteica alteraría el campo eléctrico local, produciendo un arreglo diferente de los dipolos del solvente en las vecindades de la proteína, lo cual se traduce en diferentes valores de ΔS_{Red} y ΔH_{Red}.

En este punto debe aclararse que la hipótesis que propone que la entropía y parte de la entalpía de reducción corresponden a rearreglos de solvente, asume que la $\Delta S_{Red}^{Prot} \ll \Delta S_{Red}^{Solv}$ dado que se entiende que el conjunto de moléculas de solvente influenciadas por el cambio de carga al ocurrir la reacción de TE poseen un mayor número de configuraciones microscópicas que la proteína. Al presentarse en gran número, las moléculas de solvente poseen un mayor

número grados de libertad tanto traslacionales como rotacionales, de modo que la contribución proteica resulta en comparación despreciable, y se tiene que $\Delta S_{Red} \approx \Delta S_{Red}^{Solv}$.

Por otra parte, la contribución entálpica total puede plantearse de manera simplificada como la suma de dos componentes de la siguiente manera: $\Delta H_{Red} = \Delta H_{Red}^{Solv} + \Delta H_{Red}^{Prot}$, donde ΔH_{Red}^{Prot} da cuenta del cambio energético debido a la reducción del metal, y ΔH_{Red}^{Solv} del cambio energético consecuencia del rearreglo de dipolos al ocurrir la transferencia de carga. La hipótesis asume que las componentes ΔH_{Red}^{Solv} y ΔS_{Red}^{Solv} terminan anulándose, lo que explica la relación lineal entre ambas contribuciones, ver Figura-33, y sería entonces la componente ΔH_{Red}^{Prot} la que termina definiendo el *E°*. Esto es consistente con observaciones tanto experimentales como teóricas sobre la modulación del *E°* mediante mutaciones de primera y segunda esfera de coordinación, que afectan directamente a la componente ΔH_{Red}^{Prot}. Además, tal como se observa en el gráfico de ΔS_{Red} en función de ΔH_{Red}, si la entropía aumenta entonces la entalpía disminuye, y viceversa, lo que parece indicar que ambas están correlacionadas. Bajo esta mirada del fenómeno es posible racionalizar la observación en términos electrostáticos sencillos. Una disminución de carga, como ocurre al reducir el Cu^{+2} a Cu^{+1}, lleva a que las moléculas de solvente perciban un menor campo eléctrico y ganen mayor movilidad, ya que ahora sus dipolos están menos fuertemente alineados con el campo, esto lleva a la ganancia de grados de libertad y con él un aumento de las configuraciones microscópicas y de entropía. Al mismo tiempo, desalinear los dipolos produciría una pérdida entálpica cuya magnitud es igual a la ganancia entrópica, llevando a que no existan cambios robustos sobre el valor de *E°*. Por supuesto que la contraparte entálpica del sitio, ΔH_{Red}^{Prot}, no es totalmente indiferente a su entorno dipolar, y es por eso que existe cierta dispersión de los valores experimentales en torno a la diagonal principal, sin embargo, exceptuando casos muy puntuales como por ejemplo, los sitios de Cu_A, el resto de las metaloproteínas redox exhiben casi invariablemente un comportamiento de este tipo.[87]

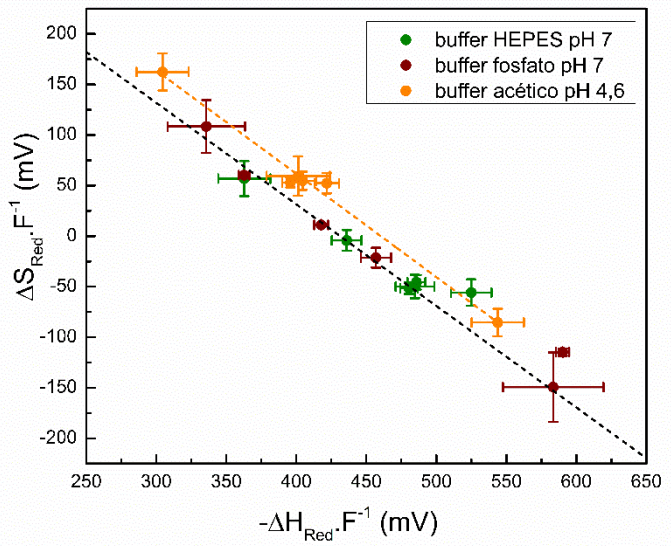


Figura 33: *Componentes entrópica y entálpica del E° (ΔS_{Red} y ΔH_{Red}) en mV para todas las quimeras empleando distintos tipos de buffers (HEPES, fosfato y acético), todos KNO_3 mM. Las líneas punteadas corresponden a rectas con pendiente unitaria.*

A los gráficos de ΔS_{Red} en función de ΔH_{Red} se los suele llamar gráficos de compensación, Figura-33. Todas aquellas proteínas que se encuentren sobre la misma diagonal con pendiente unitaria tendrán el mismo valor de *E°*, o muy similar en la práctica. Esto es debido a que cualquier cambio en ΔH_{Red} se corresponde a un cambio equivalente en ΔS_{Red}, compensándose, y manteniendo el mismo valor de *E°*. Lo que en términos de la hipótesis implica $\Delta H_{Red}^{Solv} \approx \Delta S_{Red}^{Solv}$. Notar que a pH 4,6 los potenciales redox son mayores y esto va acompañado de un corrimiento hacia la derecha en el gráfico, es decir, hacia mayores valores de ΔH_{Red}. Este comportamiento indica que el pH estaría influenciando la componente ΔH_{Red}^{Prot}, es decir, tiene un efecto directo en la estabilidad relativa del estado oxidado frente al reducido. Este efecto, no compensado por solvente, es lo que termina incrementando los valores de *E°*. De la misma manera cualquier otro desvío alrededor de las rectas graficadas implican algún otro tipo de efecto no compensado por el solvente, afectando únicamente la componente ΔH_{Red}^{Prot} del ΔH_{Red} experimental.

La existencia de este fenómeno de compensación no es menor, ya que es una de las principales características que permite en estos sistemas modular el potencial redox simplemente concentrándose en la des/estabilización relativa entre los estados oxidado y reducido, sin la necesidad de controlar lo que suceda con el solvente circundante. Permite, además, modular independientemente otros parámetros importantes asociados con la reacción de TE que si dependan más fuertemente de las contribuciones de solvente, como veremos en la siguiente sección.

Sin embargo, aprovechando estos resultados se indagó un poco más sobre el origen de los valores de ΔS_{Red} y ΔH_{Red}. Se realizaron medidas electroquímicas empleando diferentes clases de aniones. Para ello se decidió reemplazar el electrolito soporte utilizado en todos los experimentos descriptos hasta el momento (KNO_3) por otras sales. En particular se testearon distintas sales de sodio cuyos aniones se sitúan a lo largo de la serie litotrófica de Hofmeister[95–97]. Esta es una clasificación que ordena los aniones, y también existe para cationes, según su poder "destructor" (agentes caotrópicos) o "constructor" (agentes cosmotrópicos) de estructuras de agua a su alrededor. Esta serie mantiene un orden relativamente general y se construyó por observación de efectos ion-dependientes en diferentes procesos, entre ellos la precipitación/solubilización de proteínas[98,99]. Se han empleado diferentes técnicas, para investigar el efecto microscópico que lleva a el cambio en las estructuras de solvente debido a la presencia de iones[100]. En este caso, la idea es utilizarlos para perturbar la estructura del solvente, la que según la hipótesis propuesta para explicar el fenómeno de compensación entrópico/entálpica sería sensible al cambio de carga tras la reducción, originando de esa manera distintos valores de ΔS_{Red} y ΔH_{Red}. De esta forma sería posible poner en evidencia, de manera sistemática el efecto de la esfera de hidratación perturbada sobre los parámetros termodinámicos obtenidos por electroquímica. Se emplearon sales de tiocianato, sulfato, clorato, perclorato, acetato y nitrato. Intentos con sulfato ocasionaron precipitación de las muestras proteicas (agente caotrópico fuerte), e intentos con tiocianato (agente cosmotrópico fuerte) generaron decoloración de las soluciones proteicas, probablemente por demetalación del sitio metálico, impidiendo realizar las medidas

electroquímicas. Los resultados con aniones con efectos menos drásticos se presentan en la Figura-34 y Tabla-9. Curvas de la variación de E° con la temperatura representativas de las quimeras en todas las condiciones son presentadas en las Figuras 35 y 36.

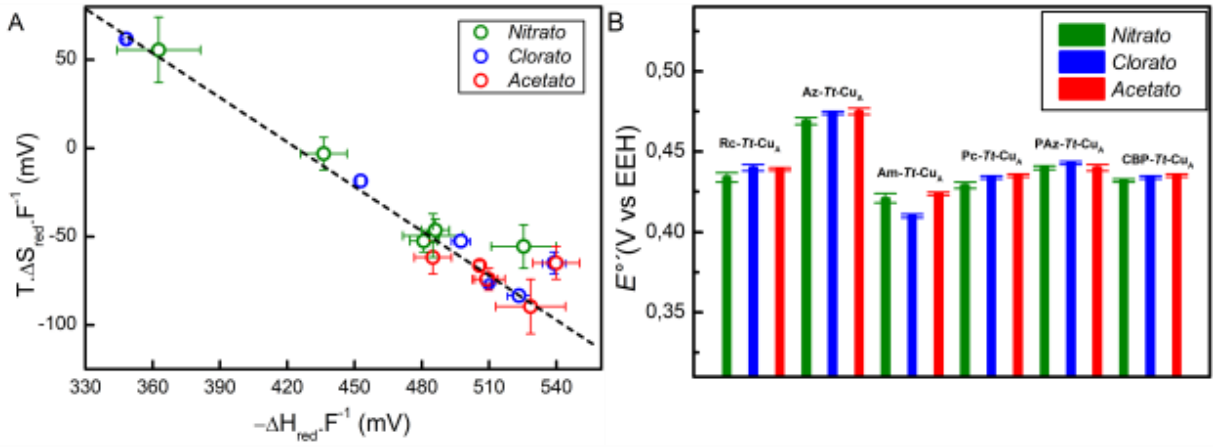


Figura 34: ***A.*** *Componentes entrópica y entálpica del E° (ΔS_{Red} y ΔH_{Red}) y,* ***B.*** *valor de E° para las quimeras obtenidos mediante voltametría cíclica dependientes de la temperatura empleando tres tipos de aniones de la serie de Hofmeister como electrolito soporte.*

Tabla-9: *Valores de ΔH_{Red} y ΔS_{Red} para el conjunto de quimeras empleando diferente tipo de aniones como electrolito soporte (500mM). En todos los casos se empleó buffer HEPES 10 mM pH 7.*

Condición de medida	*Parámetro termodinámico*	Am-*Tt*-Cu$_A$	PAz-*Tt*-Cu$_A$	Pc-*Tt*-Cu$_A$	Az-*Tt*-Cu$_A$	CBP-*Tt*-Cu$_A$	Rc-*Tt*-Cu$_A$
Nitrato	*E°´ (mV vs EEH)*	421(±3)	440(±1)	429(±2)	469(±2)	432(±1)	434(±3)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-35,0(±1,8)	-46,9(±0,6)	-46,4(±0,6)	-50,7(±1,4)	-42,1(±1,0)	-46,8(±1,3)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	18(±6)	-15(±2)	-17(±2)	-18(±4)	-1(±3)	-16(±4)
Acetato	*E°´ (mV vs EEH)*	424(±1)	440(±2)	435(±1)	475(±2)	435(±1)	439(±1)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-46,8(±0,8)	-51,0(±1,3)	-49,2(±0,7)	-52,1(±1,0)	-49,1(±0,5)	-48,8(±0,2)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	-20(±3)	-29(±5)	-24(±2)	-21(±3)	-24(±1)	-21,5(±0,8)
Clorato	*E°´ (mV vs EEH)*	410(±1)	443(±1)	434(±1)	474(±1)	434(±1)	440(±2)
	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	-33,6(±0,1)	-48,0(±0,4)	-49,2(±0,1)	-52,0(±0,5)	-43,7(±0,2)	-50,5(±0,5)
	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	20(±1)	-17(±1)	-24,6(±0,4)	-21(±2)	-6(±1)	-27(±1)

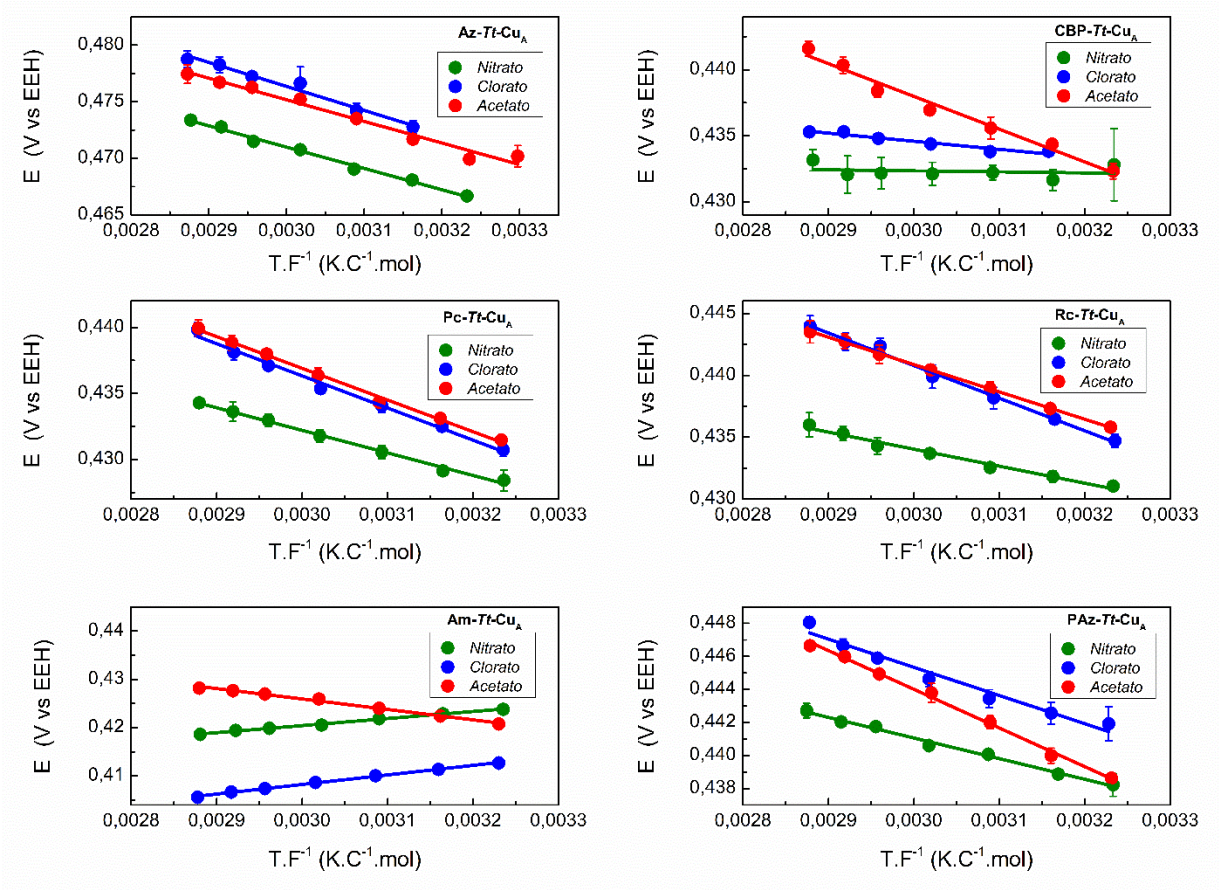


Figura 35: *Valores del potencial redox en función de la temperatura en el rango de 4-40°C para todas las quimeras, obtenidos empleando tres tipos de aniones de la serie de Hofmeister como electrolito soporte, nitrato, acetato y clorato de sodio 10 mM, todas ellas en HEPES 10mM pH 7. Se utilizaron electrodos de oro, recubiertos con SAMs puras de SH-$(CH_2)_{n=6}$-OH.*

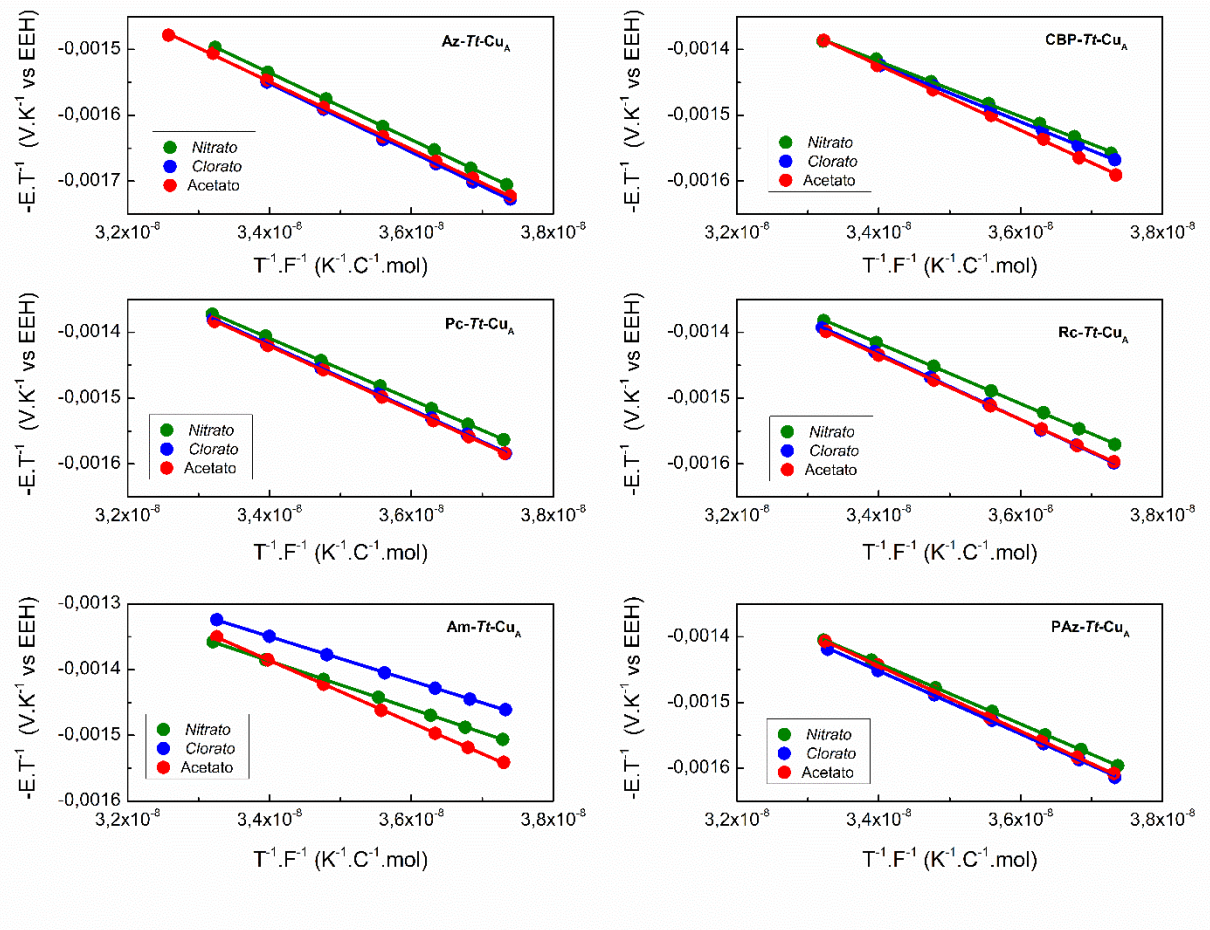


Figura 36: *Valores del cociente $E.T^{-1}$ en función de la inversa de la temperatura en el rango de 4-40°C para todas las quimeras, obtenidos empleando tres tipos de aniones como electrolito soporte, nitrato, acetato y clorato de sodio 10 mM, todas ellas en HEPES 10mM pH 7. Se utilizaron electrodos de oro, recubiertos con SAMs puras de SH-$(CH_2)_{n=6}$-OH.*

Tal como puede observarse en los datos obtenidos, y como anticipábamos, las variaciones en las componentes entrópicas y entálpicas de la reacción de reducción son mucho mayores que las variaciones del potencial redox lo que indica que hay cancelación de ambas contribuciones, fenómeno de compensación. Por otro lado, los valores de *E°* son prácticamente idénticos en todas las condiciones, para el conjunto de quimeras, con variaciones mínimas. Estos resultados muestran que los electrolitos que se encuentran en posiciones similares en la serie Hofmeister, como son nitrato y clorato, originan valores muy similares de ΔS_{Red} y ΔH_{Red} en el conjunto de quimeras. Mientras que empleando el anión acetato como electrolito soporte, que posee un mayor carácter caotrópico, se obtienen valores muy distintos. Notablemente, utilizando acetato todas las quimeras presentan valores de ΔS_{Red} muy similares entre sí, en el rango de -20 a -30 $J.K^{-1}.mol^{-1}$. Un agente caotrópico tiende a desorganizar la estructura de agua, de modo que la influencia de la arquitectura del bucle implantado que rodea el sitio metálico, propia de cada quimera, tendría menos influencia sobre la organización de moléculas de solvente circundante. En otras palabras, desorganizar la estructura de las redes

de puentes hidrógeno homogeniza la dependencia del potencial redox con la temperatura, lo que sugiere nuevamente que estas contribuciones sólo dan cuenta de reorganización del solvente. En el caso del nitrato y el clorato, al tener poco o ningún efecto sobre la estructura del agua, permiten que detalles propios de los bucles como dipolos locales, sitios dadores o aceptores de puentes hidrógeno, distinto grado de superficie hidrofóbica, entre otros, generen diferentes estructuras u ordenamientos locales de agua en cada quimera, los que a su vez presentarán diferente susceptibilidad al proceso de cambio de carga originando así una serie de valores cualitativamente distintos para las componentes ΔS_{Red} y ΔH_{Red}. Estos efectos se presupone que pueden darse tanto por los aniones libres en las cercanías de la superficie proteica como por aniones adsorbidos sobre la superficie de la misma[100–103]. Los experimentos empleando perclorato como electrolito soporte, no presentaron una variación lineal del *E°* con la temperatura, de modo que no fue posible obtener los valores de ΔS_{Red} y ΔH_{Red} según las Ecuaciones-3 y 4 y por lo tanto realizar este análisis.

3.6- Caracterización electroquímica en la interfaz electrodo-solución.

3.6.1-Obtención de parámetros cinéticos de la reacción de TE.

Con el fin de profundizar sobre las propiedades de TE en estos sistemas se realizaron experimentos voltamétricos sobre películas proteicas adsorbidas sobre electrodos de oro biocompatibilizados, ver Capítulo 2 sección-2.2.3. La estrategia de biocompatibilización consiste en recubrir la superficie metálica con monocapas autoensambladas (*SAMs* por sus siglas en inglés) de alcanotioles-ω-sustituidos. El grupo tiol se une a la superficie de oro exponiendo hacia la solución el grupo en posición omega. Resultados previos de nuestro laboratorio[104–106] mostraron que grupos terminales oxhidrilo y metilo resultan apropiados para lograr una buena adsorción en sistemas que comparte las matriz proteica de *Tt*-Cu_A, en particular se utilizaron monocapas mixtas empleando una mezcla de alcanotioles-ω-sustituidos SH-$(CH_2)_n$-OH y SH-$(CH_2)_n$-CH_3 en una relación 3:2. Para asegurar un régimen de TE no adiabático se empleó un largo de cadena de 15 metilenos para ambos alcanotioles, y para la variante 2R2R-*Tt*-Cu_A se empleó un largo de cadena de 11 metilenos a fin de mejorar la calidad de señal electroquímica. Los electrodos una vez recubiertos se incuban en soluciones proteicas concentradas, entre 0,1-0,5 mM, en buffer HEPES 10mM sin otro electrolito soporte, por algunas horas o incluso fueron dejadas incubando de un día al siguiente a fin de obtener una buena cobertura. Luego fueron trasladados a una celda electroquímica con un arreglo de 3 electrodos (de trabajo, contra electrodo y referencia), con baño termostático. En la Figura-37 se presentan voltagramas típicos obtenidos a diferentes velocidades de barrido en el rango 50-500 $mV.s^{-1}$ para todas las variantes estudiadas. A excepción de las variantes *NiR*-*Tt*-Cu_A y 4A3A-*Tt*-Cu_A, que no dieron señal alguna tras diferentes condiciones de incubación, todas las demás presentaron muy buenas señales catódicas y anódicas con separaciones de pico en el rango de 30-110mV para las velocidades de barrido más lentas empleadas (50 $mV.s^{-1}$), indicando un régimen cuasi-reversible que permite emplear el método de Laviron para obtener los valores

de k_{TE}^{o}, ver Capítulo 2 sección-2.2.3.1, en la Tabla-10 se presentan el resto de los parámetros de las señales voltamétricas. En la Figura-38 se presentan los mismos voltagramas a los que se les sustrajo la corriente capacitiva, producto de la monocapa, donde se puede apreciar mejor la bondad de la señal. En todos los casos la corriente de pico, anódica y catódica, crece linealmente con la velocidad de barrido, Figura-39, característica que es diagnóstica de especies adsorbidas. Recordar que en un régimen de control difusional la corriente de pico escala con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, sección-3.5.1. Por otro lado, a diferencia de las voltametrías de soluciones proteicas, las señales de especies adsorbidas carecen de la componente difusional característica de estas últimas que le otorga su forma tan peculiar. Por otra parte, el potencial de reducción en estas condiciones de trabajo sigue la misma tendencia que aquellos determinados en medidas en solución, asegurando de esta manera que el sitio metálico se encuentra intacto tras la adsorción y, por lo tanto, también la matriz proteica que es la que a su vez determina la estructura del sitio, Tabla-10 y Figura-40. Las pequeñas discrepancias se pueden deber a diferencias en la atmósfera iónica y de pH debidas a diferencias de potencial interfacial. Se sabe que en las inmediaciones de superficies polarizadas eléctricamente tiende a aumentar la fuerza iónica de la solución, formando una doble capa tipo Gouy-Chapman, y generan diferencias de pH de hasta 2 unidades en casos extremos[107,108]. En este caso se observa que sistemáticamente los potenciales de reducción obtenidos en estos experimentos son superiores a aquellos determinados en solución, lo cual sugiere un pH local más bajo. Se encuentra bien documentado que las cupredoxinas tienden a aumentar su valor de potencial redox al disminuir el pH.

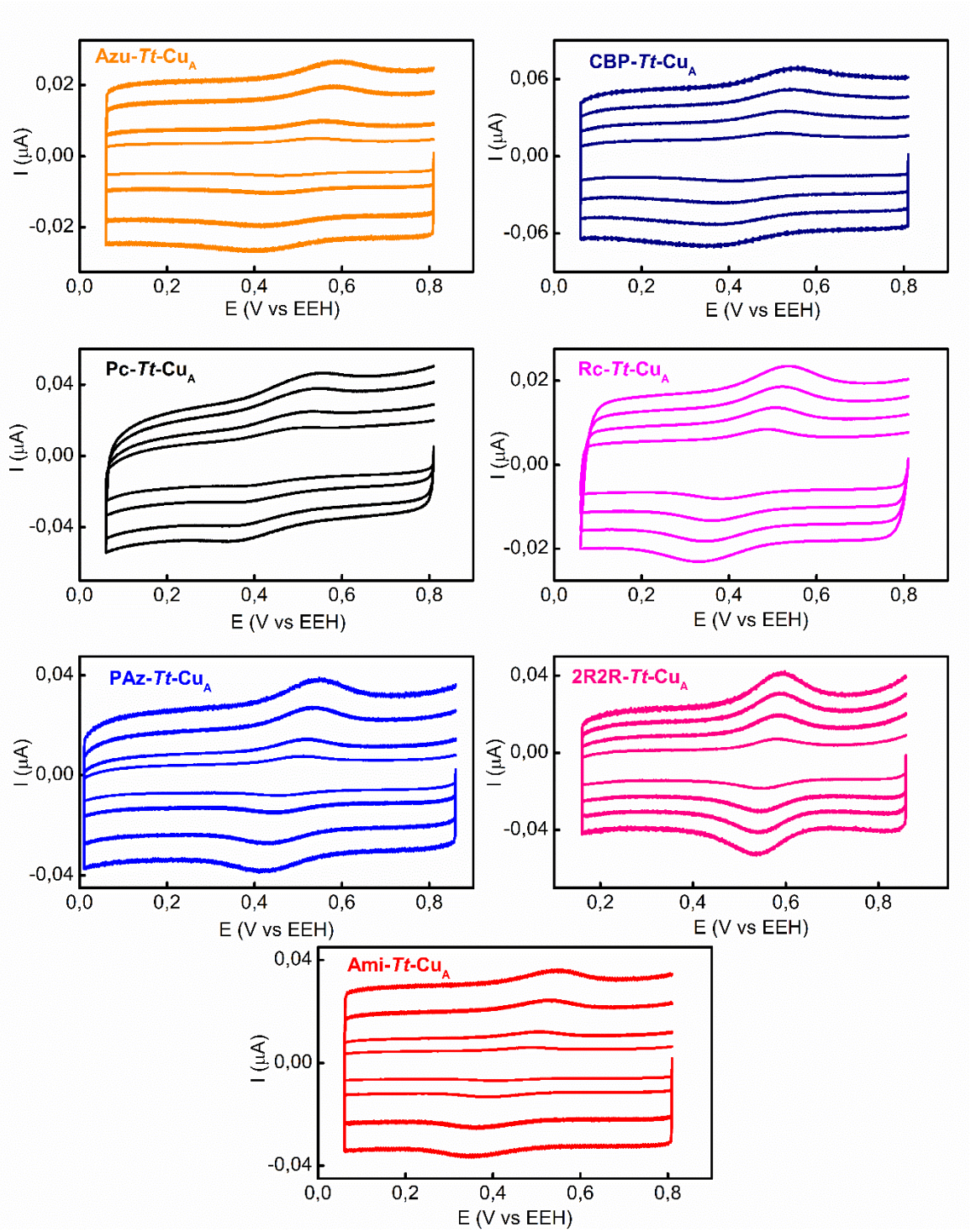


Figura 37: *Voltagramas en condiciones adsorbidas, SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=15}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=15}$-CH_3 en proporción 3:2, registrados empleando velocidades de barrido entre 50-500 mV.s^{-1}, a 298 K en buffer HEPES 10mM, pH 7, KNO_3 250 mM. Para la variante 2R2R-Tt-Cu_A se utilizaron SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=11}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=11}$-CH_3 en proporción 3:2.*

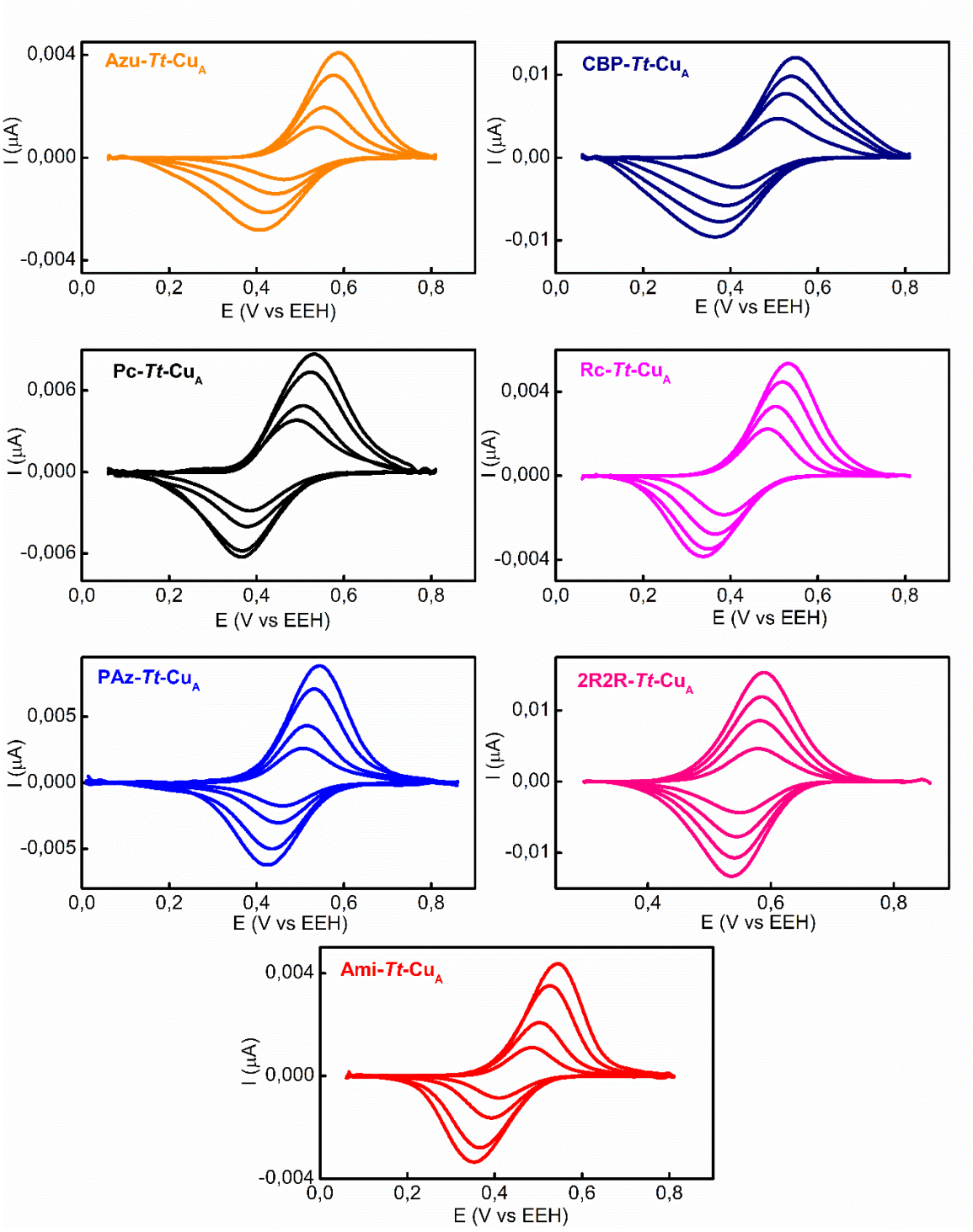


Figura 38: *Voltagramas en condiciones adsorbidas donde se sustrajo la corriente capacitiva dejando únicamente la corriente debido a la reacción de TE con la película proteica.*

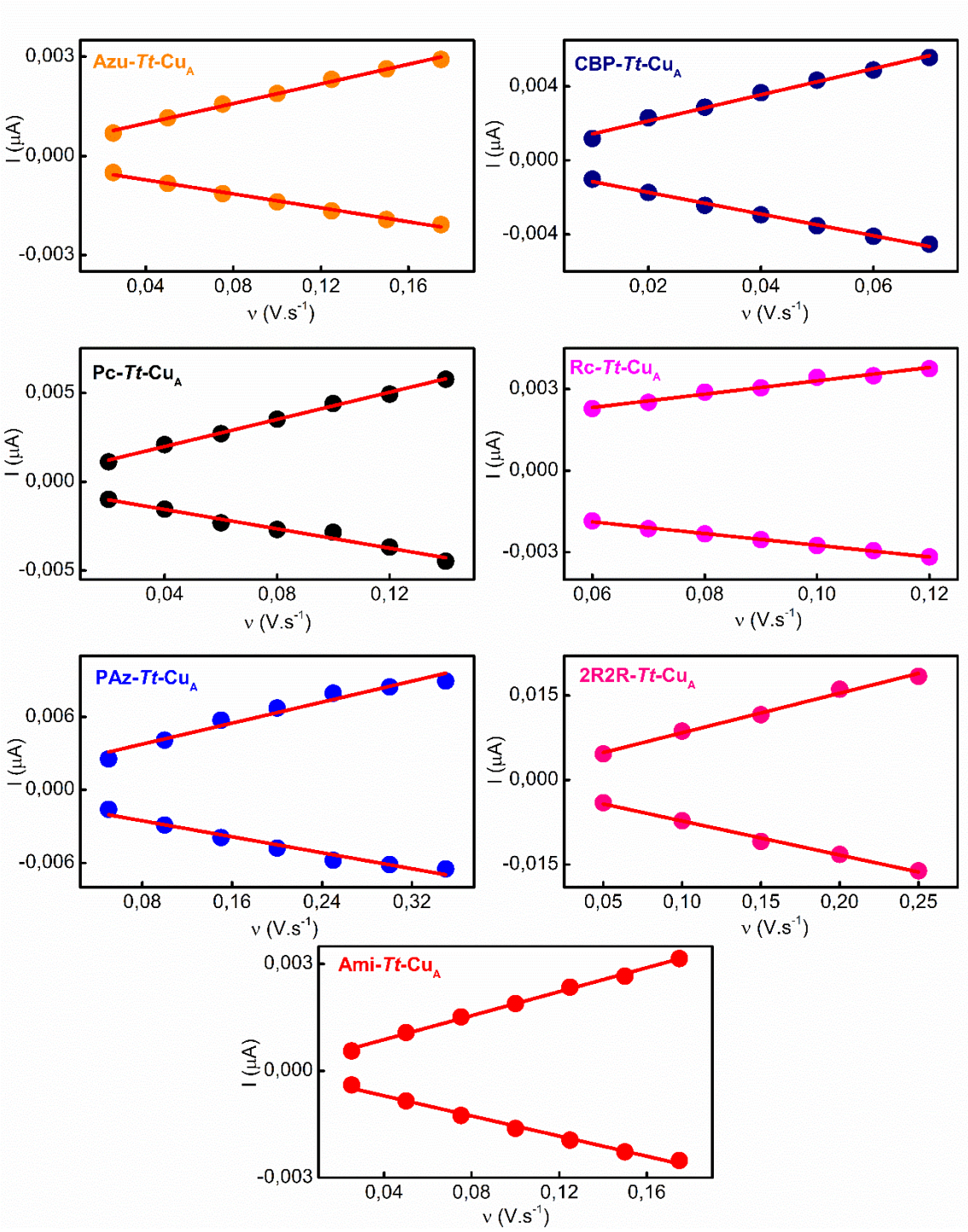


Figura 39: *Corriente de pico anódica y catódica en función de la velocidad de barrido para todas las proteínas estudiadas. Se observa un incremento lineal tal como se espera para especies redox activas confinadas a la superficie del electrodo.*

Tabla-10: *Parámetros electroquímicos de proteínas adsorbidas sobre electrodos de oro funcionalizados con SAMs, a 298K.*

	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	4A3A-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	NiR-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
E°´solución (mV vs EEH)	419(±1)	442(±2)	420(±4)	470(±2)	482 (±2)	436(±1)	428(±2)	434(±1)	540 (±1)
E°´adsorbido (mV vs EEH)	448(±5)	484(±5)	448(±5)	496(±5)	---	457(±5)	434(±5)	---	563 (±1)
Ic/Ia	0,82	0,65	0,67	0,75	---	0,82	0,82	---	0,94
ΔEp (mV)*	74	45	108	78	---	97	100	---	30
FWHM (mV)#	114-124	137-141	173-157	134-169	---	163-191	129-147	---	112-124
k_{TE}^{o} (Hz)+	1,6 (±0,5)	2,5 (±0,8)	1,0 (±0,9)	1,0 (±0,7)	---	0,7 (±0,9)	0,5 (±0,6)	---	8,5 (±0,7)

*para velocidades de barrido de 50mV.s^{-1};

+a temperatura de 298K;

anódico y catódico respectivamente.

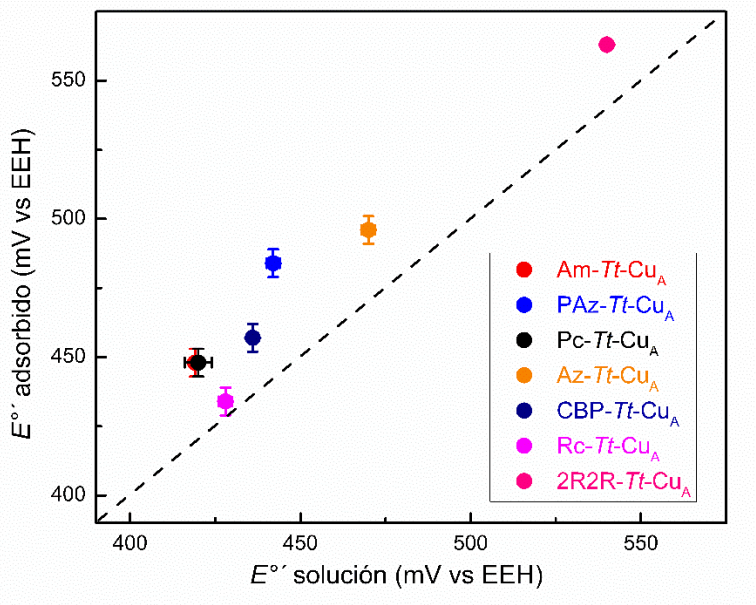


Figura 40: *Correlación entre el potencial de reducción para muestras adsorbidas y muestras en solución para todas las proteínas que presentaron señal electroquímica en tales condiciones. La línea punteada corresponde a una recta de pendiente unitaria y ordenada al origen nula.*

Se realizaron experimentos de VC con el fin de estimar la constante de TE heterogénea, k_{TE}^{o}. Un rango de velocidades de barrido de 50-500 mV.s^{-1} aseguró una separación de picos catódicos y anódicos de hasta alrededor de 200-300mV, y de ese modo un régimen cuasi-reversible, permitiendo emplear el método de Laviron para calcular k_{TE}^{o}. En la Figura-41 se presenta la separación de picos en función de la velocidad de barrido y se observa la típica forma de "trompeta". En la Figura-42 se presentan los gráficos con los ajustes de Laviron donde se observa una buena relación lineal entre el parámetro "m", que se calcula empleando las diferencias entre picos voltamétricos, y la velocidad de barrido. A partir de la inversa de esas pendientes se estimaron las k_{TE}^{o} para las quimeras, Tabla-10**.** Se obtuvieron valores de k_{TE}^{o} del orden de los pocos Hertz tal como se espera para distancias de 24 Å entre el sitio de cobre y la superficie metálica del electrodo, tal como observó en estimaciones previas para Am-*Tt*-Cu_A y

Az-*Tt*-Cu$_A$, y para otros sistemas relacionados en condiciones similares.[37,109] Para el caso de 2R2R-*Tt*-Cu$_A$ se obtuvo una k^o_{TE} significativamente mayor, 8,5 (±0,7) Hz, como consecuencia del aumento de acoplamiento electrónico ente el sitio redox y la superficie del electrodo, debido al acortamiento en la distancia entre ambos.

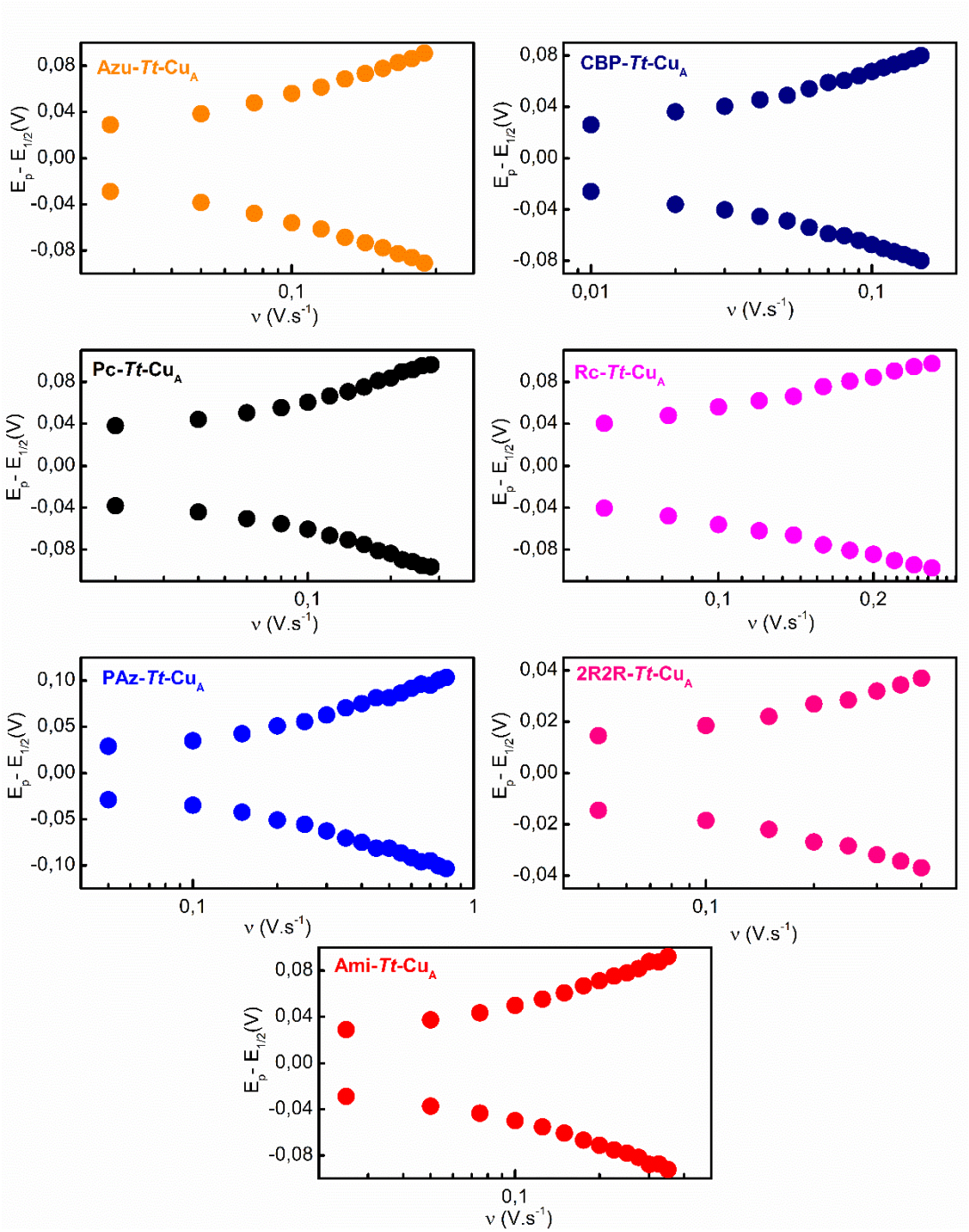


Figura 41: *Gráficos de separación de picos anódicos y catódicos en función de la velocidad de barrido. La posición de picos, E_p, se presenta relativa al potencial medio, $E_{1/2}$.*

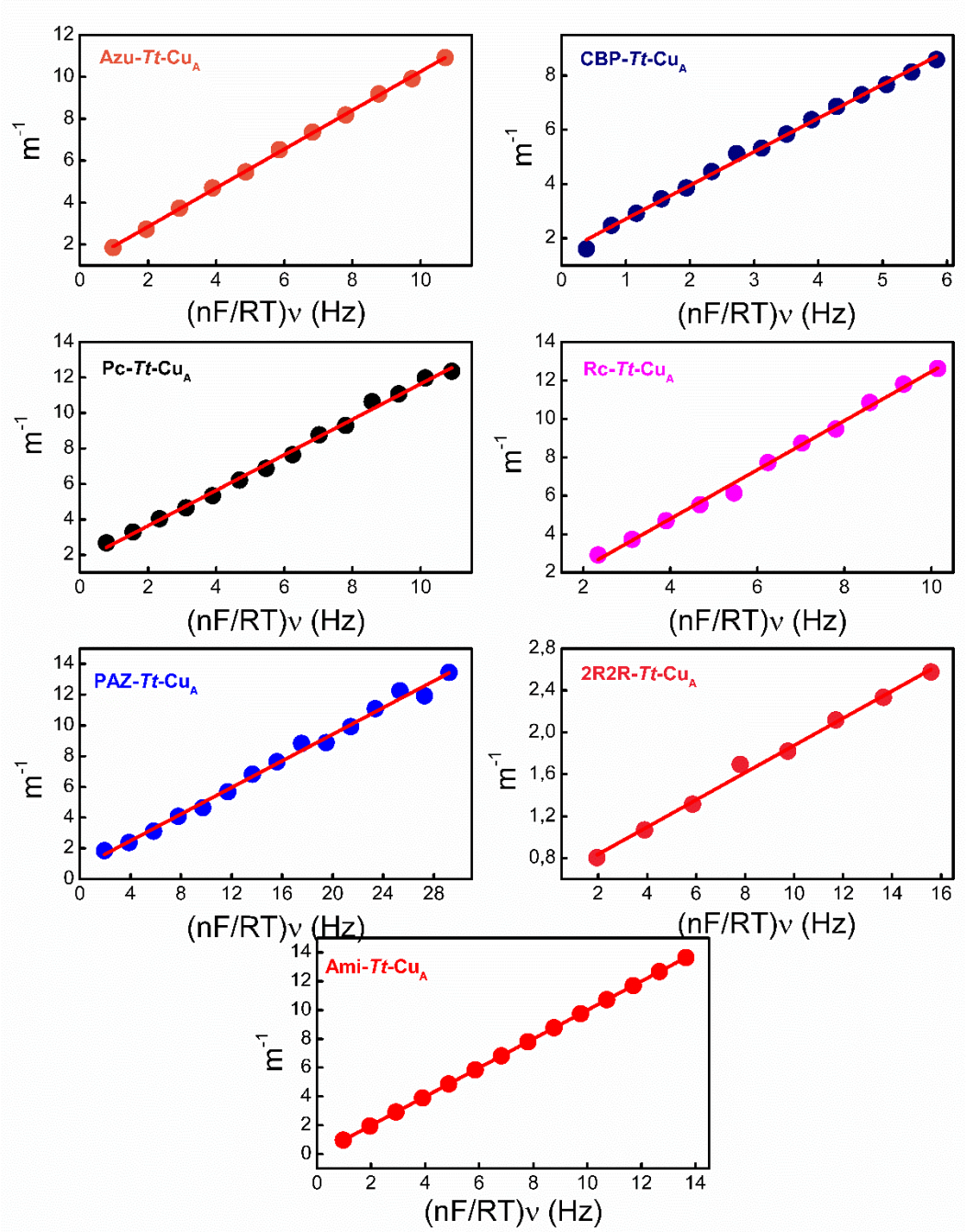


Figura 42: *Ajuste de Laviron a partir de los voltagramas presentados en las Figuras-37 (VC crudos), 38 (VC sin i capacitiva) y 39 (la del E_p-$E_{1/2}$), a una temperatura de 298K. A partir de las inversas de sus pendientes se obtienen los valores de k_{TE}^o.*

El paso siguiente fue realizar determinaciones de k_{TE}^o a diferentes temperaturas dentro del rango 4-40°C a fin de estimar la energía de activación del proceso, más específicamente la energía de reorganización (λ) según el formalismo teórico de Marcus. Para obtener la energía de activación del proceso de TE se realiza un ajuste de Arrhenius del gráfico $\ln\left({k_{TE}^o}/{_{Hz}}\right) vs\ T^{-1}$, Figura-43. Si bien, estrictamente, este tratamiento permite calcular la energía de activación,

$\Delta E_{TE}^{\#}$, dadas las condiciones experimentales y las características del modelo elegido se puede estimar el valor de λ apelando a ciertas aproximaciones sencillas. La primera es asumir que la entropía de activación, $\Delta S_{TE}^{\#}$, resulta despreciable frente a la componente entálpica, $\Delta H_{TE}^{\#}$. con lo cual vale que $\Delta H_{TE}^{\#} \approx \Delta G_{TE}^{\#}$, esta aproximación fue validada en múltiples trabajos reportados para sistemas similares[105,109,110]. Tal como se comentó previamente, en las condiciones de trabajo es válido que $\Delta G_{TE}^{\#} = \lambda/4$, y considerando que en fases condensadas la entalpía y la energía de activación resultan prácticamente equivalentes, $\Delta H_{TE}^{\#} \cong \Delta E_{TE}^{\#}$, entonces se verifica que $4\,\Delta E_{TE}^{\#} = \lambda$. Además, a modo de control, se estimó el valor de λ empleando un método alternativo, el cual emplea tanto la región cuasi-reversible como la irreversible, llegando a separaciones de pico de alrededor de 600-800 mV. Para este método se emplea un software comercial, *JellyFit*®, que mediante un análisis numérico ajusta a la ecuación-19 de la sección-1.3.1 del Capítulo 1 empleando los valores de separación de picos para estimar los valores de λ.[111,112] Si bien la estimación por este método presenta un mayor error permite verificar la tendencia observada entre las distintas quimeras, Figuras 44 y 45 , Tabla-11.

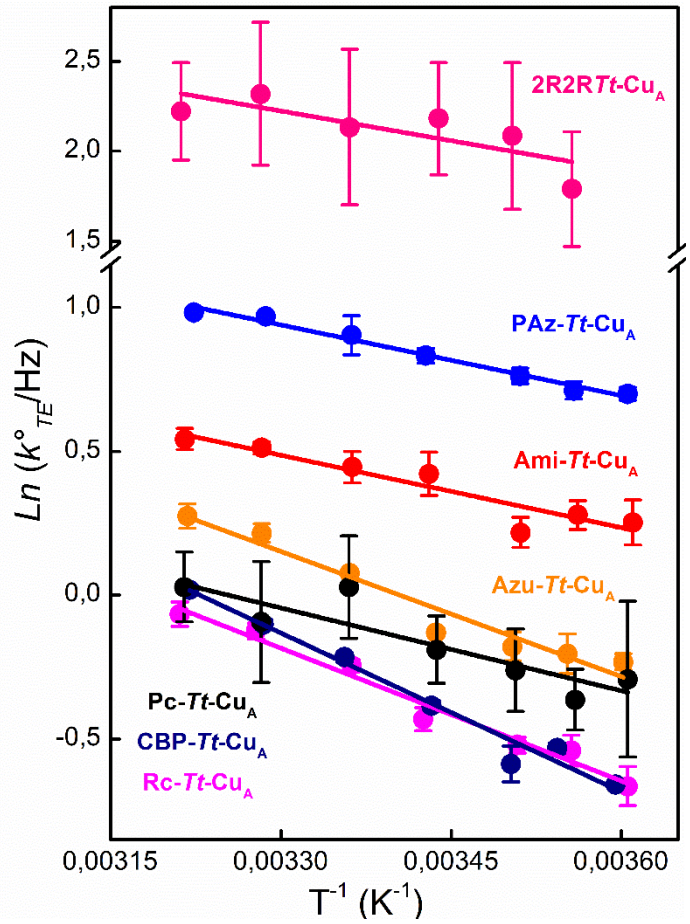


Figura 43: *Gráfico del logaritmo natural de la k_{TE}^{o} en función de la inversa de la temperatura, y sus respectivos ajustes de Arrhenius.*

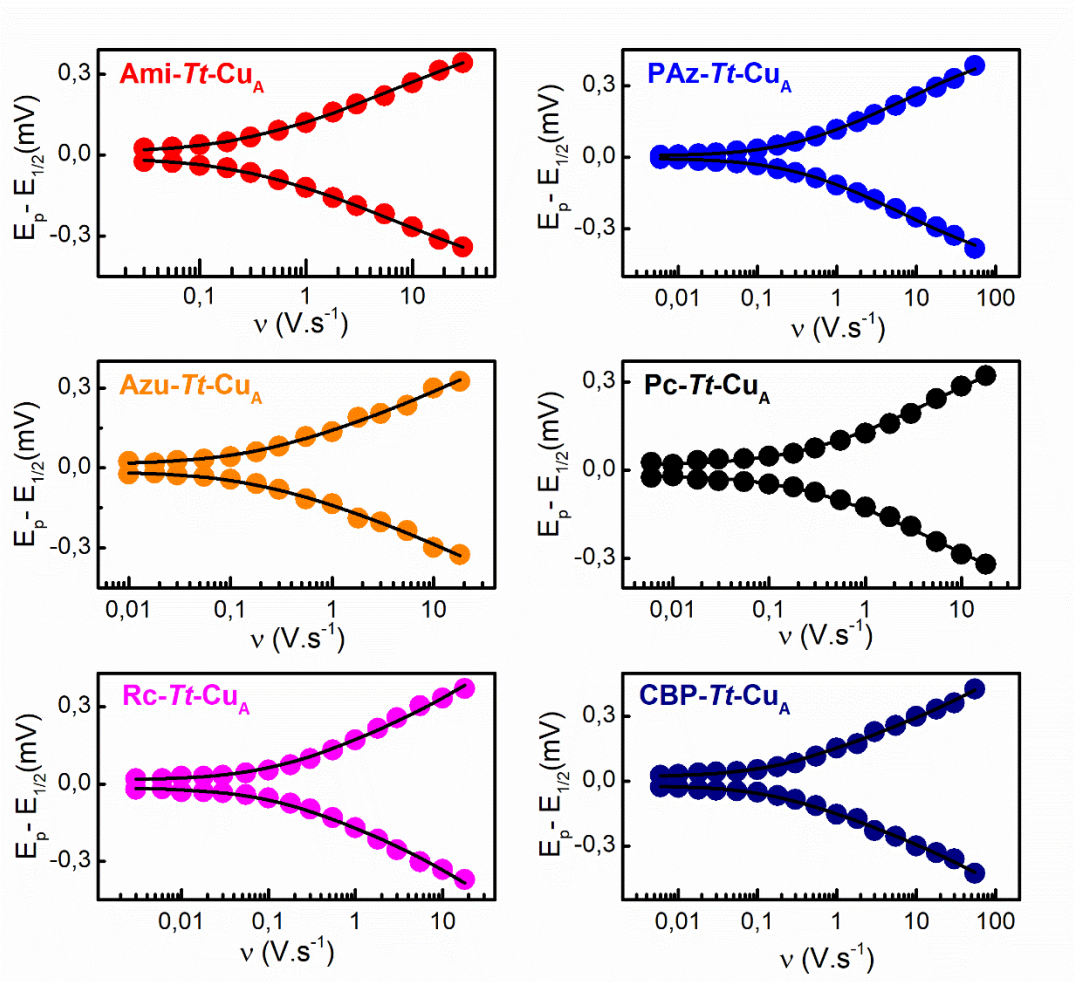


Figura 44: *Gráficos de "trompetas", $E_p - E_{1/2}$ vs velocidad de barrido, representativos obtenidos para estimar la energía de reorganización ajustando la ecuación de Marcus,* ecuación-19 de la sección-1.3.1 del Capítulo 1*, con el software JellyFit®. En negro se muestran los ajustes del programa. Todos los experimentos fueron realizados empleando las mismas condiciones experimentales que las determinaciones en función de la temperatura, buffer HEPES 10mM, pH 7, KNO_3 250mM a temperatura constante, 298K. Se emplearon velocidades de barrido de hasta 70 V.s^{-1} con el fin de alcanzar separaciones de pico muy superiores a 200mV asegurando la entrada a un régimen irreversible.*

A diferencia de los valores de potenciales de reducción los valores de λ varían fuertemente en el conjunto de quimeras, observándose una diferencia de más del doble (factor 2,3) entre el valor más bajo, 0,28 (±0,01) eV, y más alto, 0,63 (±0,05) eV. Estos valores se encuentran en el mismo orden que valores reportados en sistemas y condiciones de medida similares a las presentadas en este trabajo, es decir, electrodos de oro recubiertos con SAMs[105,110,113]. Para la proteína silvestre azurina se han reportado valores de 0,3 eV mediante estudios similares, también se observan valores de λ del mismo orden para proteínas quimeras que comparten la matriz de Azurina pero difieren en el bucle que contiene los

ligandos que generan el sitio metálico de T1, es decir un sistema completamente análogo al estudiado en esta tesis, donde utilizaron la matriz de azurina como andamio proteico. Los valores hallados en ese trabajo, Tabla-11, son muy similares entre sí con diferencias que no superan el 10%, a diferencia de las quimeras de *Tt*-Cu_A.

Tabla-11: *Parámetros de activación de proteínas adsorbidas sobre electrodos de oro funcionalizados con SAMs obtenidos mediante diferentes metodologías.*

Quimeras en matriz proteica de *Tt*-Cu_A							
	Am-*Tt*-Cu_A	PAz-*Tt*-Cu_A	Pc-*Tt*-Cu_A	Az-*Tt*-Cu_A	CBP-*Tt*-Cu_A	Rc-*Tt*-Cu_A	2R2R-*Tt*-Cu_A
$\lambda^{Arrhenius}$ (eV)	0,29 (±0,05)	0,28 (±0,01)	0,31 (±0,05)	0,47 (±0,04)	0,63 (±0,05)	0,56 (±0,07)	0,3 (±0,1)
λ^{Marcus} (eV)	0,18 (±0,1)	0,17 (±0,1)	0,17 (±0,1)	0,54 (±0,2)	0,69 (±0,2)	0,43 (±0,2)	---
Quimeras en matriz proteica de Azurina							
	Am-Azu	Pc-Azu	4A3A-Azu	Azurina	4A4A-Azu	---	---
$\lambda^{Arrhenius}$ (eV)	0,33 (±0,01)	0,36 (±0,01)	0,32 (±0,01)	0,35 (±0,01)	0,31 (±0,01)	---	---

La particularidad más destacable de resultados obtenidos para las quimeras en matriz de *Tt*-Cu_A es que los valores de λ se incrementan a medida que lo hace el largo del bucle implantado, Figura-45-A. Esto contrasta fuertemente con el sistema de quimeras basados en la matriz de Azurina comentados previamente, aun cuando los bucles empleados en esos sistemas presentan largos comparables a los bucles empleados en nuestras quimeras, entre 7 y 11 residuos. En términos porcentuales se tiene una variación en los valores de λ del 10% en quimeras en matriz de Azurina y un incremento del 130% en quimeras en matriz de *Tt*-Cu_A. Este resultado pone de manifiesto la importancia de la matriz proteica en la determinación de este importante parámetro, y sugiere al mismo tiempo, la posibilidad de modularlo de manera sistemática, sencillamente eligiendo adecuadamente el largo del bucle a implantar. A la fecha no ha habido reportes de una modulación de esta magnitud en cupredoxinas mediante una estrategia de intercambio de bucles.

A partir de las DM se pudo obtener el valor del área de superficie accesible a solvente (ASAS) para el sitio metálico, es decir, el conjunto átomo de cobre y cadenas laterales de residuos coordinantes, verificándose que a mayor largo de bucle mayor es la accesibilidad del solvente al sitio activo, Figura-45-B. Esta correlación es inmediata para el estado reducido, y con mayor dispersión para el estado oxidado. Esto indica que el incremento del λ se debe principalmente a la componente externa de la energía de reorganización, λ^{ext}. Desde el punto de vista de la teoría de TE de Marcus, tanto la dinámica proteica como la del solvente circundante son las encargadas de generar distorsiones alrededor de los mínimos de equilibrio que permiten a los reactivos alcanzar el punto de cruce con la parábola de productos. Y sólo en ese punto las energías electrónicas de ambos estados se igualarán permitiendo que ocurra la reacción de TE. Cuanto mayor sea la exposición del centro metálico al solvente mayor será la influencia del cambio de carga en este último llevando a que su configuración de equilibrio en reactivos y productos difiera en mayor grado. Esto equivale a decir que los mínimos de las parábolas de reactivos y productos se encuentran más alejados entre sí en el eje de coordenada

de reacción lo que implica que la intersección entre parábolas ocurra a mayores valores de energía libre. De este modo, en la exploración térmica de la superficie de reactivos deberá distorsionarse una mayor proporción de moléculas de solvente para llegar a la configuración que permita la TE, es decir incrementa la energía de activación del proceso. Esta observación es consistente con el hecho de que dado que la matriz de *Tt*-Cu_A se encuentra optimizada mediante selección natural para albergar un sitio binuclear de cobre, sitio de Cu_A, que ocupa un mayor volumen que el sitio T1 introducido, esto deja inevitablemente los sitios T1 implantados más expuestos al solvente. Además, como se comentó en la sección-3.4**,** los bucles introducidos no presentaron problemas para adoptar una estructura secundaria idéntica a la silvestre dadora del bucle, lo que sugiere que hay un espacio suficiente para este plegamiento. Si el espacio fuese inferior al silvestre, seguramente los bucles presentarían distorsiones en su estructura secundaria. Por otro lado, a pesar de existir una disminución de la restricción impuesta por la matriz proteica sobre el cobre, permitiendo una mayor diferencia entre estado oxidado y reducido, y por ende una mayor contribución de la componente interna de la energía de reorganización, λ^{int}, la falta de correlación entre los valores de λ y diferentes descriptores de tales distorsiones sugieren que esta sigue siendo una fracción minoritaria en el valor experimental, Figura-46.

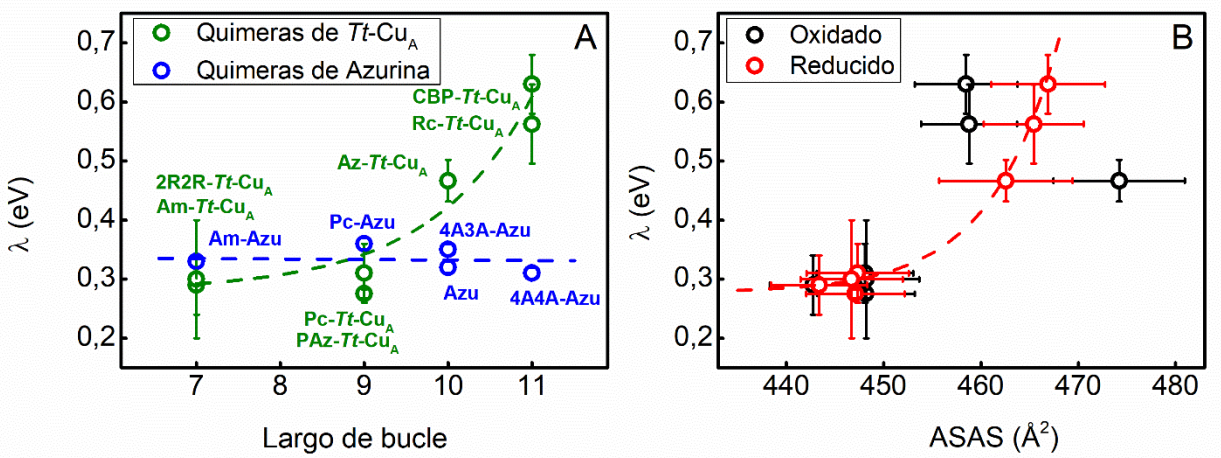


Figura 45: ***A.*** *Gráficos de λ en función del largo de bucle para las quimeras en matriz proteica de Tt-*Cu_A*, verde, y de quimeras en matriz proteica de azurina, azul, obtenidas en condiciones experimentales comparables a las empleadas en esta tesis.* ***B.*** *Gráficos de λ en función del área de superficie accesible a solvente (ASAS) obtenidas a partir de DM tanto para el estado oxidado, verde, como para el estado reducido, azul.*

Como se comentó previamente han habido muchos trabajos focalizados en el estudio de la modulación del potencial redox incluso se ha reportado que pueden realizarse sin afectar fuertemente los valores de λ[114], pero poco se ha comunicado sobre modulación de λ específicamente, y su impacto sobre el potencial redox. Los resultados comentados en esta sección no solo aportan una nueva estrategia para modular λ sino que también sugieren la posibilidad de hacerlo independientemente del potencial de reducción. Recordemos que el

potencial redox solo varía 60 mV a lo largo del conjunto de quimeras, y que estas diferencias respondían a diferentes variables, entre ellas distorsiones geométricas del sitio metálico. Por otro lado, resulta interesante señalar que las quimeras Am-*Tt*-Cu_A y 2R2R-*Tt*-Cu_A poseen ambas un largo de bucle de 7 residuos y poseen valores comparables de λ, sin embargo, difieren fuertemente en sus potenciales de reducción, aproximadamente 160 mV de diferencia, lo cual corrobora este desacople de parámetros. Otra razón que aporta a este desacople es la presencia de compensación entrópico/entálpica, la que anula por completo la influencia del solvente en el valor del potencial de reducción, dejando la modulación de este parámetro casi exclusivamente a parámetros geométricos y electrostáticos locales del sitio metálico.

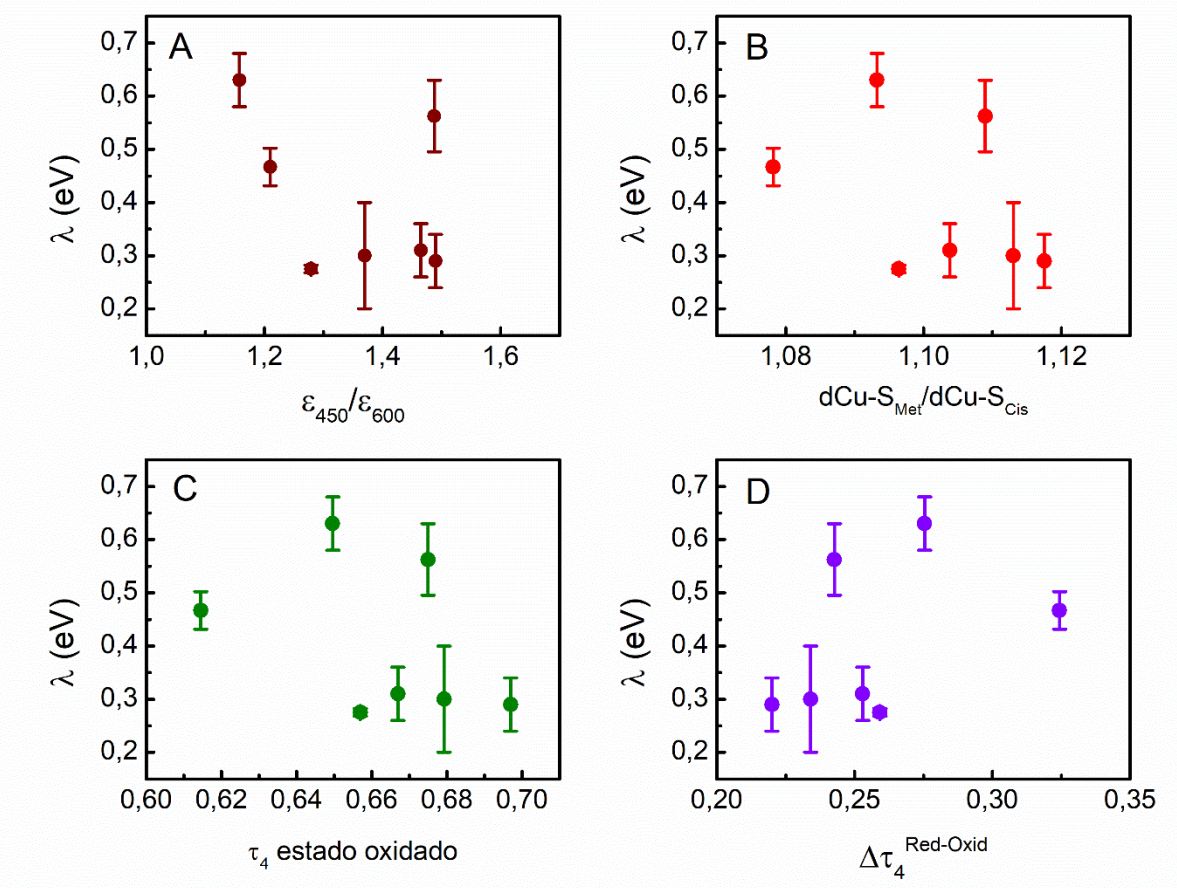


Figura 46: *Gráficos de λ en función de distintos descriptores de distorsiones geométricas del sitio metálico,* ***A.*** *cociente de intensidades de las bandas de transferencia de carga S_{cis}-Cu,* ***B.*** *cociente de distancias Cu-S_{Met} y Cu-S_{Cis},* ***C.*** *parámetro τ_4 que da cuenta del grado de distorsión tetragonal,* ***D.*** *Diferencia de τ_4 entre el estado reducido y el oxidado.*

3.7-Metaloproteínas con sitios de cobre de Tipo 2

3.7.1-Formación de un sitio de cobre de T2 mediante coordinación de un ligando exógeno.

Como señalamos anteriormente los sitios metálicos de estas proteínas quimeras se encuentran accesibles al solvente. Las diferencias en los niveles de exposición del centro metálico regulan el grado en que el solvente se ve afectado por el cambio de carga del metal, tras la reducción, y en consecuencia determina la magnitud de la energía de reorganización, en particular modulando la componente externa (λ^{ext}). Teniendo en cuenta esta observación nos propusimos indagar el efecto sobre la entrada de pequeñas moléculas con capacidad de coordinar al catión cobre II en el sitio activo de estas proteínas. Resultados previos en nuestro laboratorio sugieren que el imidazol es un candidato ideal para estos estudios dado que esta molécula, al formar parte de la cadena lateral del residuo histidina, es la encargada de coordinar estos iones metálicos en casi todos los sitios naturales reportados**.**[36,37,115]

La forma de explorar este aspecto en este sistema consiste en exponer las proteínas a concentraciones crecientes de imidazol y registrar los cambios espectroscópicos asociados. La estrategia está basada en la naturaleza intrínseca de estos sitios metálicos cuando se encuentran inmersos en matrices proteicas. En otras palabras, en el concepto del estado "entático" o "ajuste inducido"[116–118] que señalan la importancia de la matriz proteica en determinar las propiedades reactivas de los metales, forzando una geometría de coordinación diferente a la que el ion metálico adoptaría si no se encontrara inmerso en tal matriz. Efectos que en última instancia permiten también explicar diferencias espectrales, como el modelo de "distorsión acoplada". Entonces un sitio metálico con una coordinación no optima, expuesto a solvente, sería capaz de aceptar un nuevo ligando, en este caso de manera exógena, modificando drásticamente los niveles energéticos de los OM de mayor energía, y presentando cambios en su espectro de absorción en la región UV-visible.

3.7.1.1-Caracterización espectroscópica

El agregado de concentraciones en exceso de imidazol (relación 1000:1) a muestras proteicas a pH 7 (buffer fosfato) genera un cambio de color de manera inmediata, de un verde a un color amarillento. A su vez, el espectro de absorción electrónica presenta fuertes cambios, ver Figura-47. En todos los casos se observan espectros similares globalmente, con tres grandes envolventes con sus máximos principales en los rangos de 23300-24200 cm^{-1}, 18400-19600cm^{-1}, y 13900-14200 cm^{-1}. Estos cambios en la forma general del espectro de absorción presenta una enorme similitud con el centro de cobre encontrado en la proteína llamada Nitrosocianina, descubierta en *Nitrosomonas europea,*[42,119] el primer ejemplo conocido de un sitio T2 inmerso en una matriz proteica de tipo cupredoxina. Como tal, el sitio se encuentra conformado por residuos posicionados en un bucle que conecta dos hebras en un plegamiento tipo β-sándwich tal como ocurre en nuestras quimeras. Presenta un color rojizo intenso y un espectro de absorción electrónica con tres envolventes con sus máximos principales en 25550 cm^{-1}, 20350 cm^{-1} y 15000 cm^{-1}, ver Figura-48.

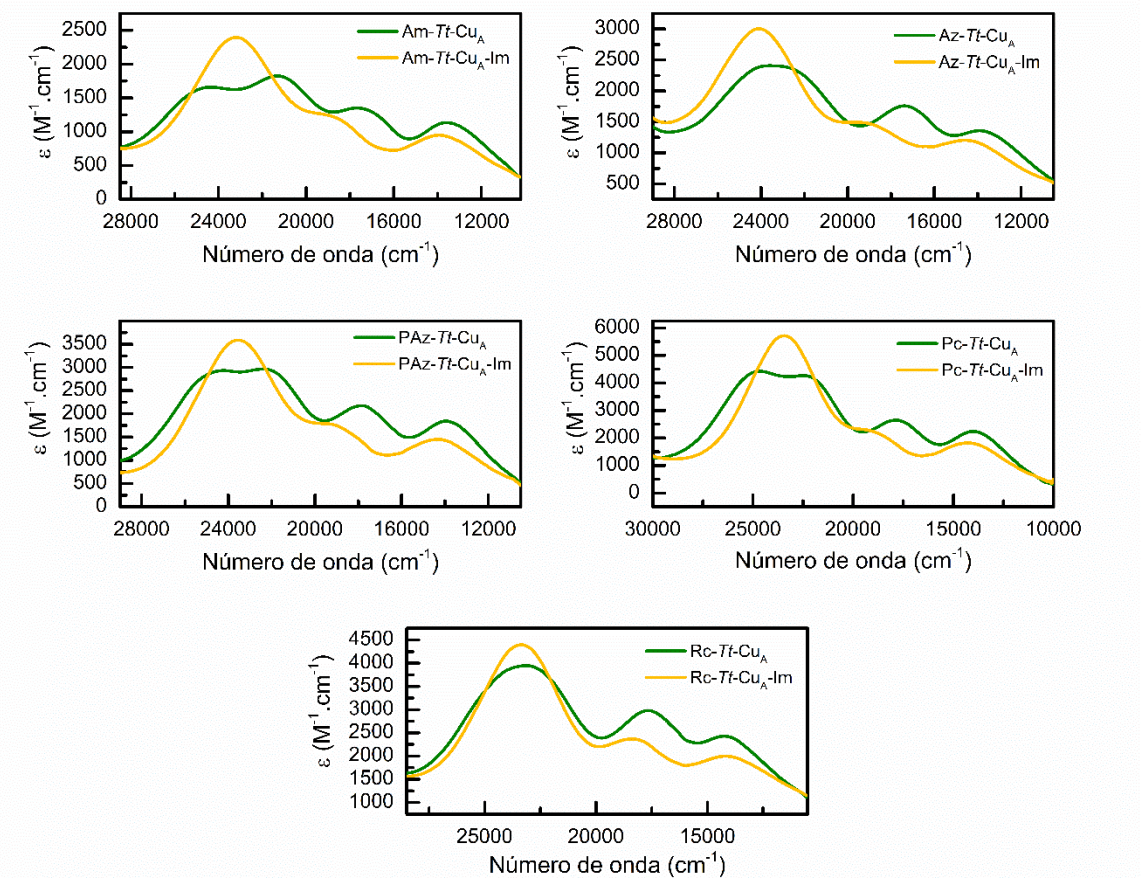


Figura 47: *Espectros de absorción electrónica para las quimeras y sus aductos de imidazol.*

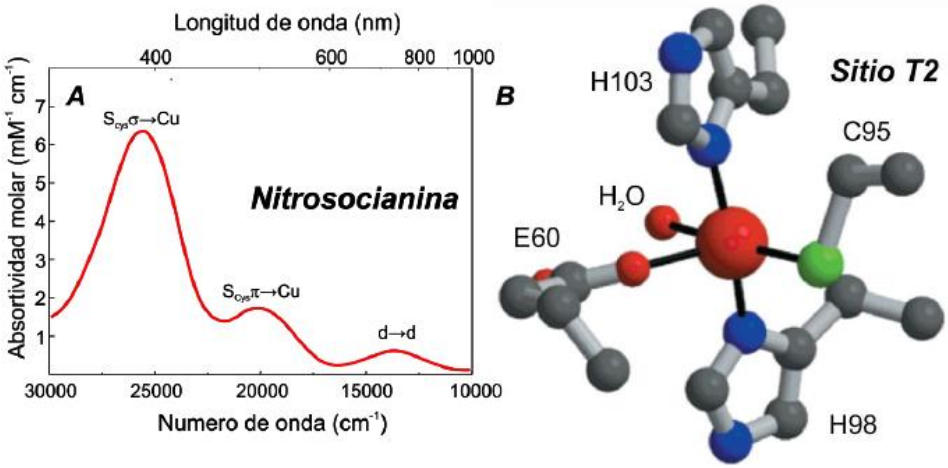


Figura 48: *(Figura adaptada de Arciero et al.2002*[42] *y Lieberman et al. 2001*[119]*)* ***A.*** *Espectro de absorción electrónica de Nitrosocianina,* ***B.*** *Estructura tridimensional del sitio de T2 de Nitrosocianina.*

Los sitios T2, a diferencia de los T1, presentan una mayor variabilidad en el tipo de residuos coordinantes lo cual se traduce en corrimientos del máximo y variación de las tonalidades que pueden ir del rojo al amarillo. Sin embargo, todos ellos presentan casi invariablemente una geometría pentacoordinada de tipo piramidal de base cuadrada. El aumento en el número de coordinación lleva a un incremento de la fuerza del campo de ligandos y con él corrimientos hacia el violeta en el espectro de absorción electrónico. Este corrimiento en las posiciones de las bandas principales también se verifica para las especies amarillas obtenidas al exponer a las quimeras verdes a soluciones con imidazol. Por otro lado, el incremento en intensidad de la banda de mayor energía indica un solapamiento entre los orbitales *d* del cobre y los orbitales *p* del sulfuro de la cisteína con mayor carácter sigma. Tal como se describió previamente para sitios T1, el cociente de las intensidades de las bandas de TCLM $S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$ ($R_L = \varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$) permite determinar el grado de distorsión tetragonal y el tipo de solapamiento entre estos orbitales. En el caso de los sitios T2 es necesario considerar el corrimiento al violeta y emplear en su lugar el cociente $R_L = \varepsilon_{390}/\varepsilon_{490}$. Para el caso de Nitrosociania y otros sitios T2 se obtienen valores en el rango 3,2-5,0, muy por arriba de los valores obtenidos por las quimeras, que se encuentran en el rango de 1,10-1,64, ver Tabla-2 y Figura-18. Para los aductos de las quimeras Az-*Tt*-Cu_A y Am-*Tt*-Cu_A, existen deconvoluciones de los espectros UV-visibles basadas en experimentos de dicroísmo circular[37], lo que permite la determinación adecuada del parámetro R_L (teniendo en cuenta el corrimiento al violeta se utilizó R_L muy próximo a $\varepsilon_{425}/\varepsilon_{525}$, empleando los valores correspondientes al máximo en cada caso) obteniéndose valores de 2,57 y 2,14, respectivamente. Asumiendo una estructura de bandas similar a la reportada para estas dos quimeras se realizaron deconvoluciones del resto de las proteínas de la colección para poder estimar el R_L en esos casos, los resultados se presentan en la Figura-49 y la Tabla-12.

Tabla-12: *Coeficientes de absorción molar de las TCLM π-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$ y σ-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$, su cociente (parámetro R_L), y el cociente de intensidades espectrales totales (parámetro R_ε) para los aductos de imidazol estudiados.*

	PAz-*Tt*-Cu_A-Im	Pc-*Tt*-Cu_A-Im	Rc-*Tt*-Cu_A-Im
$R_L = \varepsilon_{425}/\varepsilon_{520}$	2,38	3,2	2,45
ε_{425} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	3326	5807	3298
ε_{525} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	1399	1813	1346
$R_\varepsilon = A_{425}/A_{520}$	2,0	2,49	2,26
Posición σ-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$	23460 cm^{-1} (426 nm)	23436 cm^{-1} (427 nm)	23099 cm^{-1} (433 nm)
Posición π-$S_{cis}\rightarrow Cu^{+2}$	19532 cm^{-1} (512 nm)	19284 cm^{-1} (519 nm)	18498 cm^{-1} (541 nm)

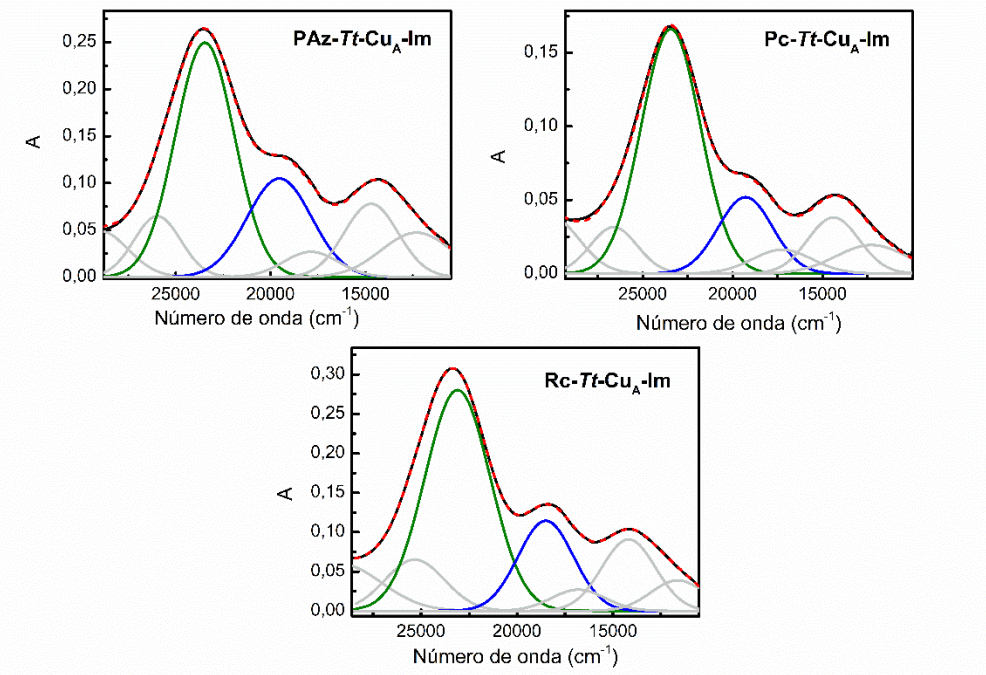


Figura 49: *Espectros de absorción electrónica presentando una deconvolución gaussiana de sus señales principales. En verde oliva se presenta la TCLM σ-S_{cis} →Cu^{+2} y en azul TCLM π-S_{cis} →Cu^{+2}. La curva negra corresponde al espectro experimental y la roja punteada al espectro reconstruido.*

Corrimientos menos pronunciados hacia el violeta sumado a valores de R_L intermedios entre aquellos observados para sitios T1 rómbicos y sitios T2 canónicos indican una situación en la que el solapamiento entre los orbitales *d* del cobre y *p* del azufre de la cisteína contiene menos carácter π que en las quimeras pero no llegan a alcanzar el carácter σ presente en los sitios T2, sugiriendo una geometría menos extrema.

Para clarificar estos aspectos en la geometría de coordinación en estos sitios se obtuvieron sus espectros EPR, ver Figura-50 y Tabla-13. Todas presentaron valores de $A_{\parallel}$ mayores que las quimeras en el rango 120 a 160 (x 10^{-4} cm^{-1}) tal como se observa para sitios T2. Sin embargo, en su conjunto poseen una media en torno a 133 (x 10^{-4} cm^{-1}), con lo que las posicionan en el límite inferior del rango típico de valores para sitios T2. Si se construye un diagrama de Peisach-Blumberg se observa claramente que estos sitios se posicionan en una zona intermedia entre sitios rómbicos y sitios T2, inmediatamente por debajo de los valores de $A_{\parallel}$ para SOD y Nitrosocianina, Figura-51. Sin embargo, en este tipo de diagramas también se han reconocido una relativamente nueva clase de sitios obtenidos mediante mutaciones puntuales de primera esfera de coordinación. Estos sitios llamados sitios T1,5, tal como su nombre lo indica, se ubican a mitad de camino entre la zona de sitios T1 y T2, con valores de $A_{\parallel}$ intermedios. Analizando la posición en conjunto de los aductos vemos que es más correcto agruparlos en esta categoría, a excepción quizás de Az-*Tt*-Cu_A-Im, que parece escaparse e introducirse en el área de los T2. Esto es consistente con lo comentado previamente con respecto a los valores de R_L, de hecho se han reportado valores de R_L de 1,8 y 2,7 para los

sitios T1,5 hallados en las mutantes Azurina-M121E (pH 7,5) y Azurina-M121K (pH 7,5), respectivamente[120,120,121].

Es interesante notar que la variedad roja *r*-CBP-*Tt*-Cu_A si es catalogable como un sitio T2 canónico, donde es posible que la molécula exógena sea una molécula de solvente. Ésta al ser de menor tamaño que una de imidazol podría acomodarse mejor en la esfera de coordinación permitiendo alcanzar una geometría que estabilice al cobre II. Mientras que, por otra parte, esto se vería impedido para una molécula de imidazol. Desafortunadamente no nos fue posible obtener espectros Raman resonante ni estructuras cristalográficas para estos sitios como para profundizar su estudio.

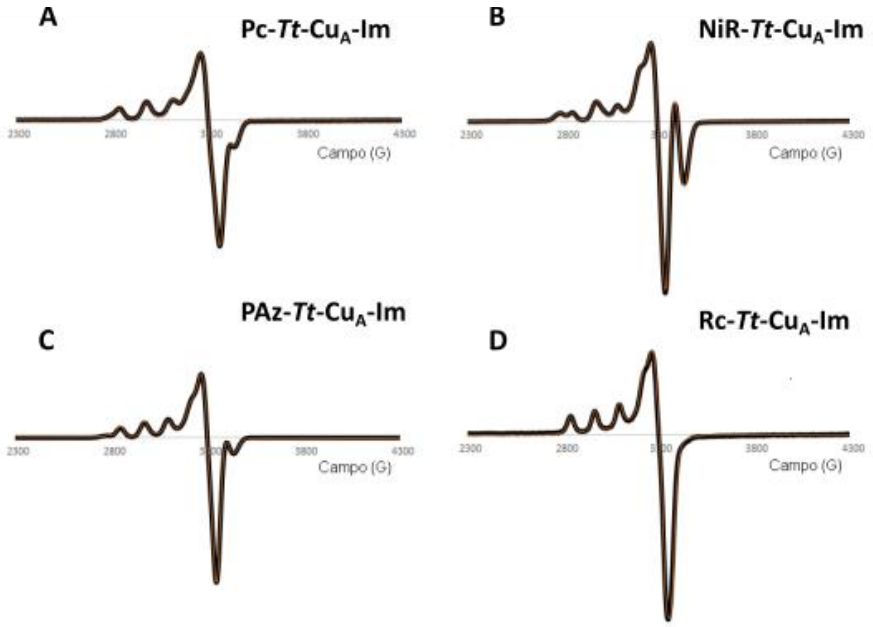


Figura 50: *(Figura adaptada de Leguto 2018*[43]*) Espectros de EPR para algunos aductos con imidazol. La línea negra representa el espectro experimental, y la línea coloreada tenue el espectro simulado.*

Tabla 13: *Parámetros espectrales obtenidos a partir de los ajustes de EPR para algunos aductos de imidazol.*

	Am-*Tt*-Cu_A-Im	PAz-*Tt*-Cu_A-Im	Pc-*Tt*-Cu_A-Im	Az-*Tt*-Cu_A-Im	Rc-*Tt*-Cu_A-Im	NiR-*Tt*-Cu_A-Im
$A_{\parallel}$ $(10^{-4}cm^{-1})$	125	130	126	161	120	137
g_z	2,234	2,230	2,229	2,228	2,235	2,222
g_y	2,048	2,054	2,045	2,053	2,051	2,046
g_x	2,042	2,036	2,043	2,041	2,043	2,040
$\Delta g_{\perp}$	0,006	0,018	0,002	0,012	0,008	0,006

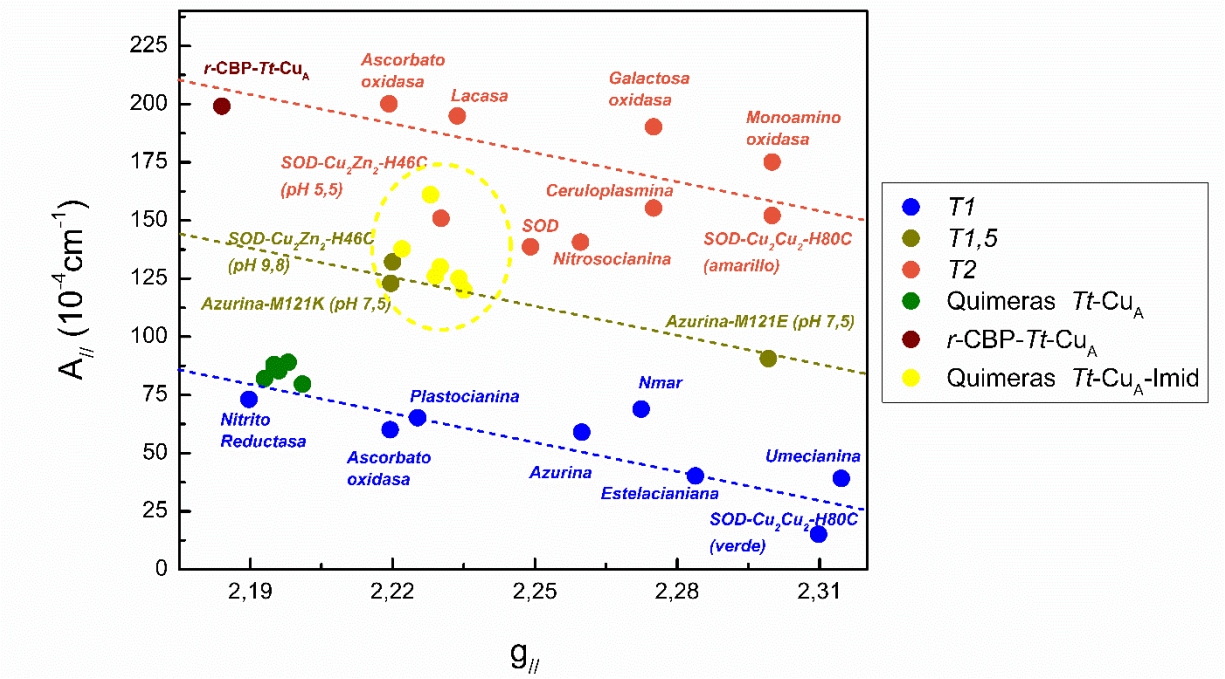


Figura 51: *Diagrama de Peisach-Blumberg presentando algunos ejemplos de los distintos sitios de cobre mononucleares (T1, T1,5 y T2), las quimeras y sus aductos formados con imidazol.*[43,44]

3.7.1.2-Caracterización electroquímica

Para completar la caracterización de este sistema se realizaron voltametrías de soluciones proteicas empleando electrodos de oro recubiertos con monocapas, Figura-52. Se observaron dos señales, una de ellas totalmente reversible, en torno a valores de potenciales de alrededor de 450 mV (vs EEH), correspondientes a las formas no coordinadas a imidazol. Luego una segunda señal entorno a valores de potenciales de 100 mV (vs EEH) correspondiente a los aductos con imidazol. Lo novedoso aquí es el hecho de que esta segunda señal de menor valor no es simétrica, presentando solamente una fuerte señal catódica, y una señal anódica muy poco intensa. Este comportamiento indica que la especie con el imidazol coordinado es inestable en su estado reducido. Esto es consistente con lo que se ha observado en la estructura del sitio T2 de Nitrosocianina[119] en el que se observa un sitio tetracoordinado en su estado reducido, habiendo expulsado una de las dos moléculas de agua presentes en el estado oxidado. Incluso se observa una situación similar en sitios T2 artificiales[122] en los que se ha propuesto un estado reducido con un centro metálico tri o tetracoordinado. Esto es consistente con la preferencia del cobre I por números de coordinación menores, como es también observado en complejos inorgánicos[13,14]. El caso de las quimeras es análogo en su totalidad, ya que el imidazol es libre de descoordinarse y abandonar las cercanías del cobre tras la reducción. Más aún, dado que la coordinación tentativa para estos sitios constaría del set presente en las quimeras (dos histidinas, una metionina y una cisteína) más un grupo imidazol extra (equivalente a una tercera histidina), la primera esfera de coordinación se asemeja a la de nitrosocianina reemplazando átomos de oxígeno por átomos de azufre y nitrógeno, ver

Figura-48. Los potenciales de reducción estimados van de -40 a 60 mV (vs EEH) con un único caso que se escapa del rango (PAz-*Tt*-Cu_A-Im con un valor de -225 mV), ver Tabla-14. De manera que resultan similares a aquel reportado para Nitrosocianina, de 80 mV. Dado que las señales voltamétricas son fuertemente asimétricas, donde la señal anódica es prácticamente inexistente y difícil de analizar, se aproxima el E^o a partir del valor del potencial de pico (E_p), el que en condiciones reversibles sigue la siguiente relación[123]:

$$E_p = E_{1/2} \pm 1{,}109\,\frac{RT}{nF} = E_{1/2} \pm \frac{28{,}5}{n}\,mV\ (a\ 298\ K) \qquad \textbf{Ecuación-5}$$

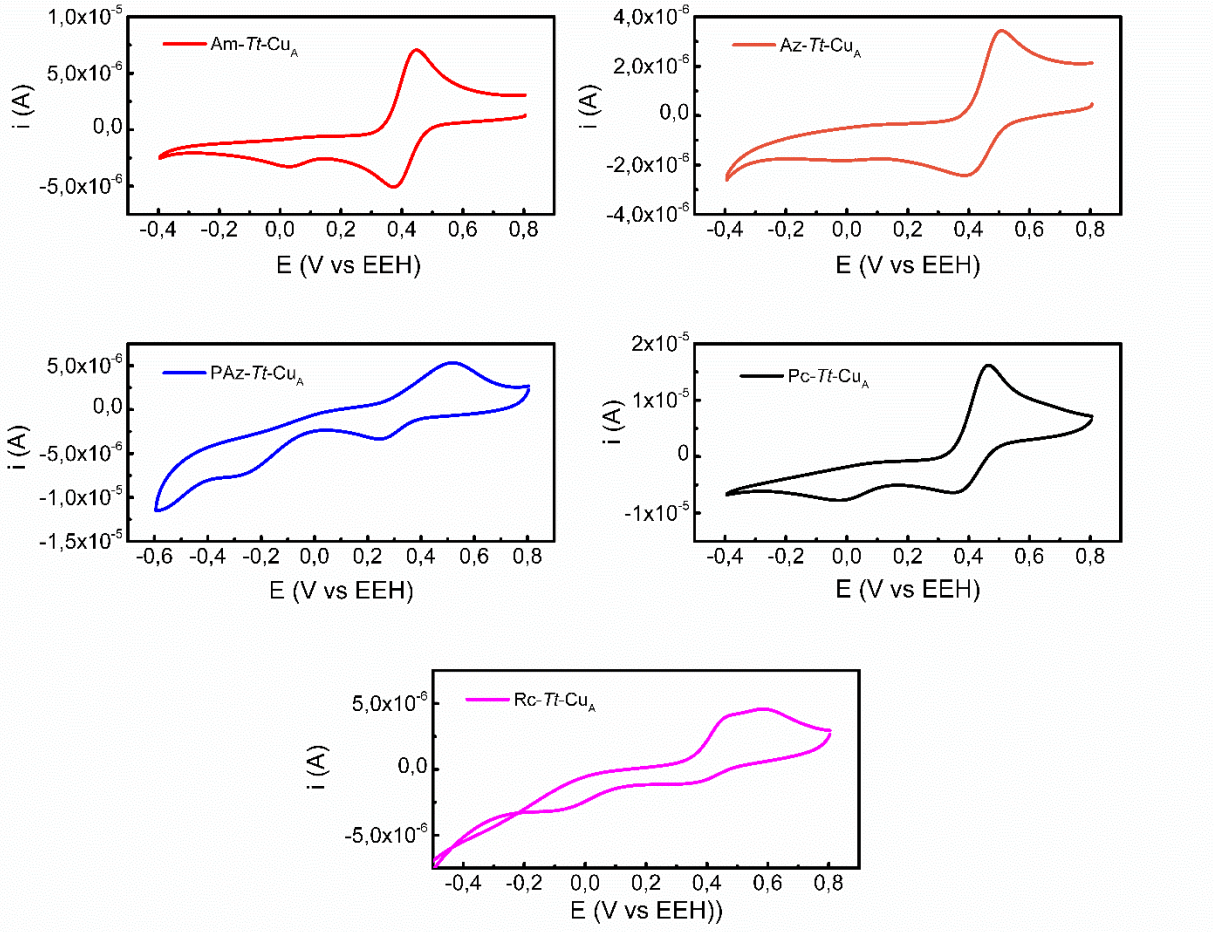


Figura 52: *Voltagramas obtenidos para mezclas de proteína con imidazol en una relación 1:20. Las VC fueron obtenidos en buffer fosfato (10mM) y KNO_3 (500mM), a pH 7 y 298K.*

Tabla 14: *Potenciales de reducción (E^o) y de pico catódico $E_{p,c}$ para los aductos de imidazol.*

	Am-*Tt*-Cu_A-Im	PAz-*Tt*-Cu_A-Im	Pc-*Tt*-Cu_A-Im	Az-*Tt*-Cu_A-Im	Rc-*Tt*-Cu_A-Im
E^o (mV vs EEH)	61 (±1)	-225 (±1)	20 (±1)	15 (±1)	-42 (±1)
$E_{p,c}$(mV vs EEH)	32 (±1)	-254 (±1)	-9(±1)	-14 (±1)	-70 (±1)

Es interesante el hecho de que al incrementar la velocidad de barrido la intensidad relativa del pico anódico aumenta, lo cual indica que se está capturando una pequeña fracción de aducto en estado reducido. Esto se vuelve interesante ya que los sitios de T2 se encuentran naturalmente seleccionados para llevar a cabo reacciones catalíticas, entonces lograr generar una población de estos aductos en estado reducido, al menos de manera transitoria e interfacial, permitiría llevar a cabo experimentos para testear posible actividad catalítica. Por otra parte, el hecho de que presenten una señal electroquímica mediante voltametría es una observación no menor ya que esto indica un grado de covalencia mayor en el enlace Cu-S_{cis} que en sitios T2, el cual se cree que está involucrado en el camino electrónico durante la reacción de TE[19,30]. Típicamente la forma de explorar electroquímicamente estos sistemas es mediante espectroelectroquímica, utilizando mediadores redox, es decir, pequeñas moléculas capaces de facilitar la TE entre el electrodo y el Cu[42,124] o diferentes modificaciones del electrodo[125–130] como consecuencia de su mayor grado de distorsión tetragonal y menor carácter π en enlace Cu-S_{cis}. Esta observación concuerda con el análisis presentado indicando que efectivamente estos centros son mejor descriptos como sitios T1,5.

Presentar una buena actividad electroquímica podría representar una ventaja a la hora de evaluar su aplicabilidad en el diseño de biodispositivos, ya que tienen una mayor capacidad de llevar a cabo TE directa que otros sistemas relacionados reportados.

3.7.1.3-Obtención de constantes de unión con imidazol

Con una caracterización espectroscópica y electroquímica inicial, pasamos a indagar sobre la funcionalidad de estos sitios. Con el fin de investigar si existen diferencias en la afinidad por esta molécula pequeña en las distintas quimeras, se realizaron titulaciones con imidazol, siguiendo los cambios mediante espectroscopia de absorción en la región de UV-visible, ver Figura-53. La presencia de puntos isosbésticos en todos los casos sugiere la aparición de una única especie coordinando imidazol, permitiendo pensar en un equilibrio entre solo dos especies, ligada y no ligada a imidazol.

$$K_f = \frac{[aducto]}{[proteina][imidazol]} \qquad \textbf{Ecuación-6}$$

Empleando la definición de grado de disociación, α, que básicamente expresa la proporción de una dada especie, ya sea aducto o proteína libre, relativa al total de proteína, Ecuaciones-7 y 8, la expresión de K_f se puede reescribir en forma de una ecuación logística, Ecuación-9, la que resulta particularmente apropiada para tratar los datos obtenidos en una titulación.

$$\alpha = \frac{[aducto]}{[aducto] + [proteina]} \qquad \textbf{Ecuación-7}$$

$$\alpha - 1 = \frac{[proteina]}{[aducto] + [proteina]} \qquad \textbf{Ecuación-8}$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + {}^{1}/_{K_f[Imidazol]}}$$ **Ecuación-9**

Se determinaron las concentraciones de proteína y aducto realizando una deconvolución espectral empleando los espectros puros de ambas especies. Las curvas se ajustaron a la Ecuación-9 con el fin de obtener las constantes de formación del aducto, K_f, los resultados se presentan en las Figura-54 y 55, y en la Tabla-15.

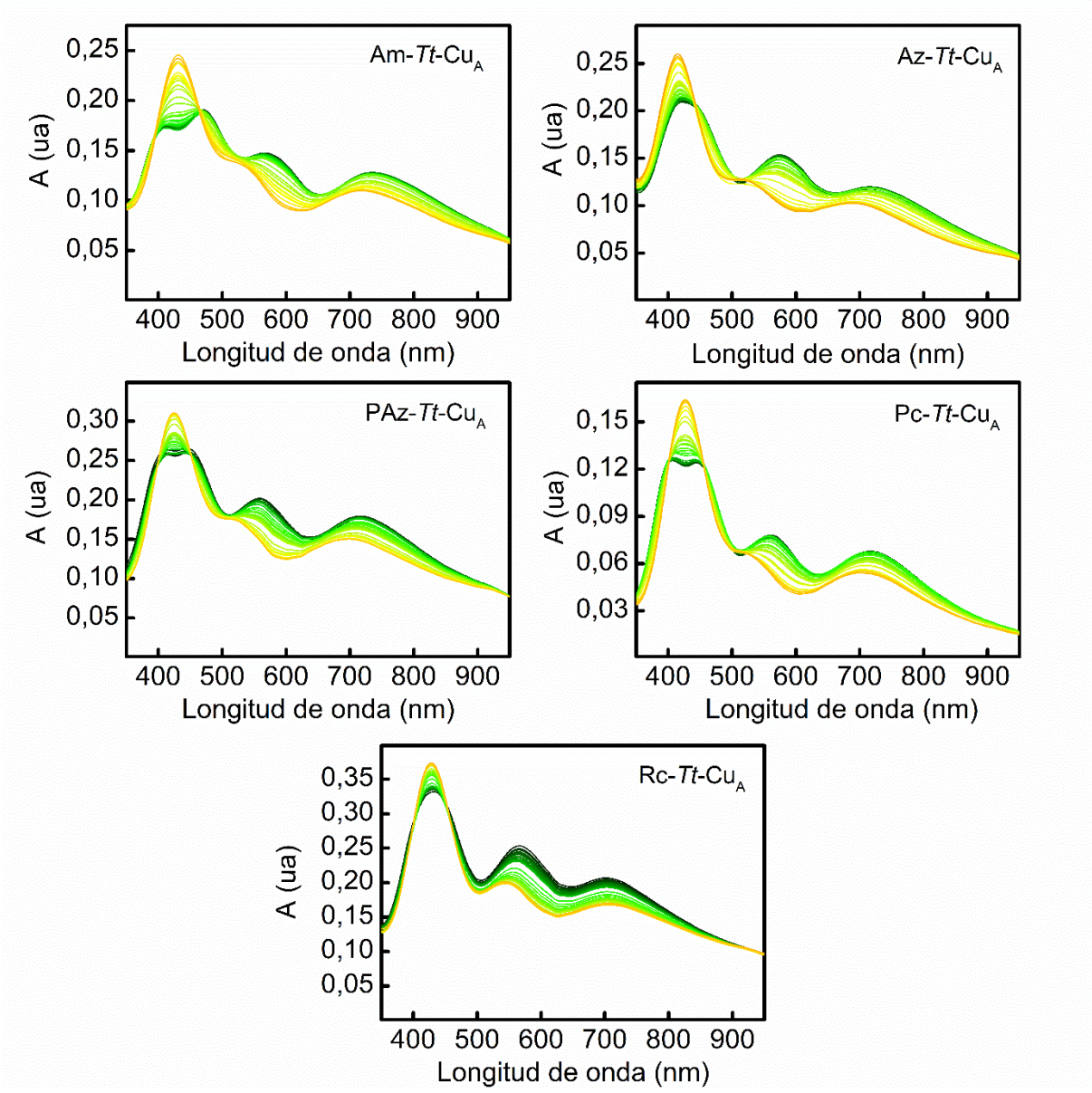


Figura 53: *Espectros de absorción electrónica en función de la concentración creciente de imidazol para el conjunto de quimeras estudiado. La titulación se desarrolla de verde a amarillo. El color verde intenso representa la proteína sin imidazol, mientras que el amarillo intenso representa el 100% de la proteína formando un aducto con el imidazol. Los espectros fueron obtenidos en buffer fosfato (10mM) y KNO_3 (500mM), a pH 7 y 298K.*

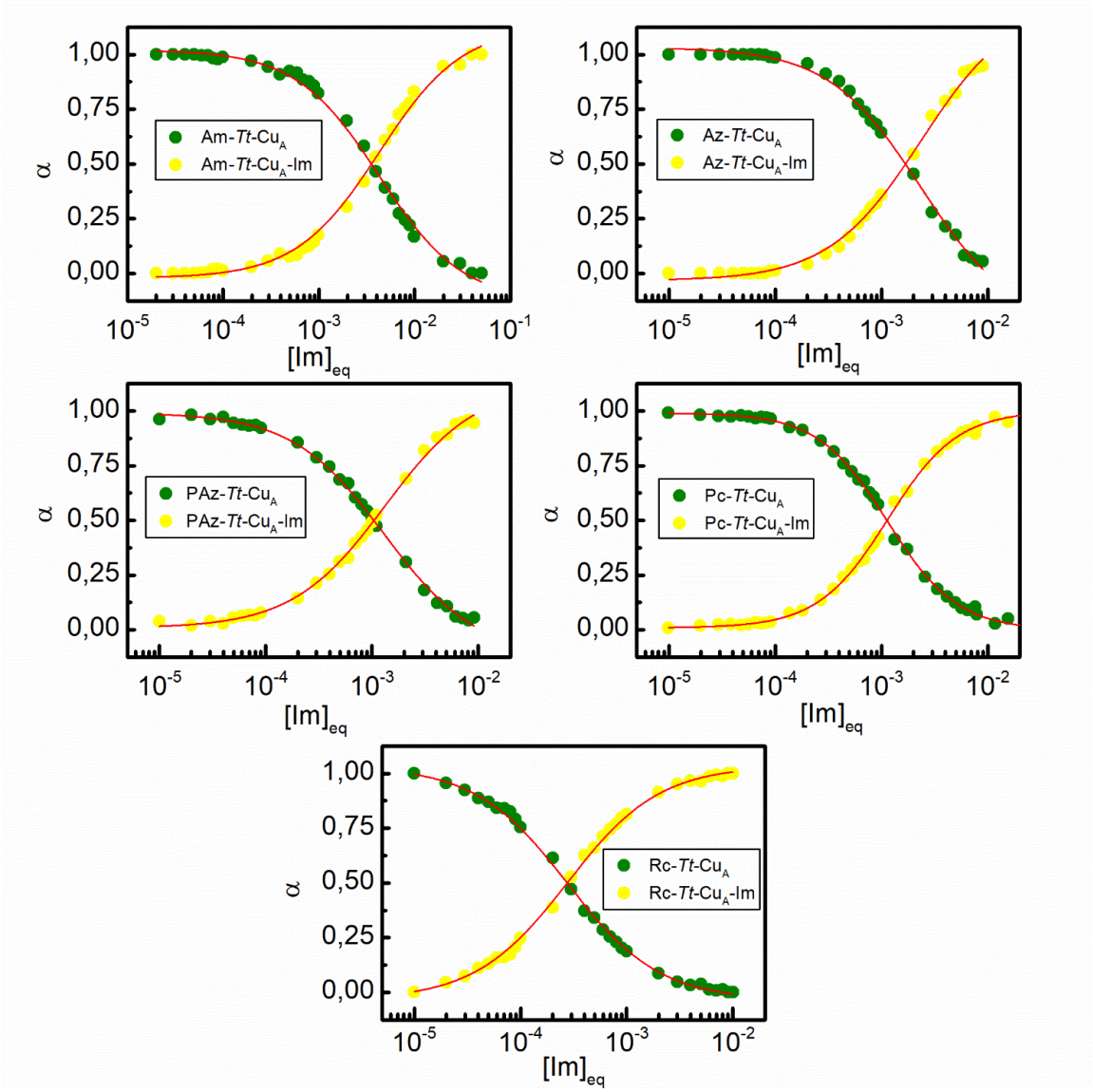


Figura 54: *Curvas de titulación con imidazol. Se representa el grado de disociación, α, en función de la concentración creciente de imidazol en equilibrio, $[Im]_{eq}$. En verde se muestra la proporción de proteína nativa, y en amarillo la proporción de aducto. Las líneas rojas representan un ajuste a la Ecuación-9.*

Tabla-15: *Valores de las constantes de formación del aducto con imidazol K_f, para las distintas proteínas estudiadas.*

	Am-*Tt*-Cu$_A$	Az-*Tt*-Cu$_A$	PAz-*Tt*-Cu$_A$	Pc-*Tt*-Cu$_A$	Rc-*Tt*-Cu$_A$
K_f	4,3 x 10^{-3} (±0,2 x 10^{-3})	2,4 x 10^{-3} (±0,1 x 10^{-3})	1,32 x 10^{-3} (±0,05 x 10^{-3})	1,24 x 10^{-3} (±0,07 x 10^{-3})	2,8 x 10^{-4} (±0,1 x 10^{-4})
K_f*	2,91 x 10^{-3} (±0,05 x 10^{-3})	1,28 x 10^{-3} (±0,05 x 10^{-3})	---	---	---

*Valores extraídos de literatura[37].

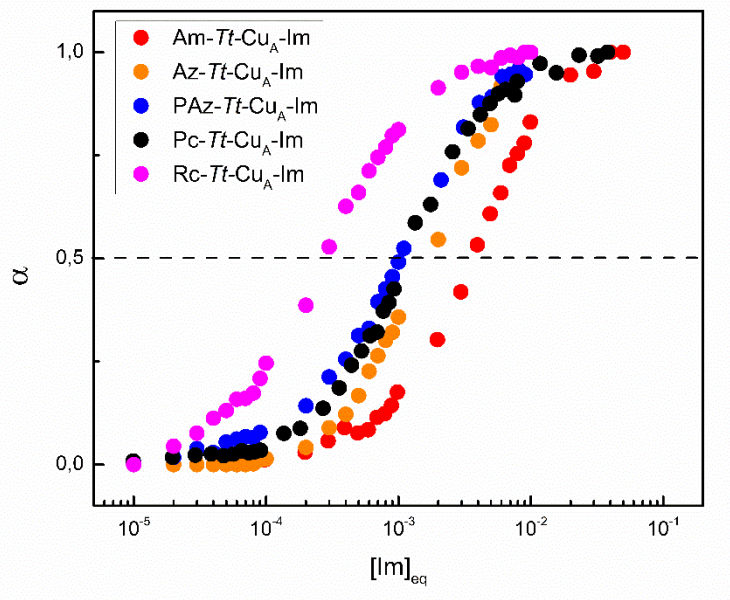


Figura 55: *Curvas de titulación con imidazol para todas las variantes estudiadas de forma comparativa. Se representa únicamente la curva correspondiente a la proporción de aducto en función de la concentración creciente de imidazol en equilibrio, por cuestiones de claridad.*

Esencialmente la afinidad del ligando por el sitio dependerá de dos factores:

1. La in/estabilidad debido a impedimento estérico generado por la cavidad en las cercanías del sitio de cobre,
2. La in/estabilidad debido a la estructura electrónica intrínseca del sitio de cobre.

El primero de los puntos determina la orientación y la distancia del ligando al sitio activo y dependerá tanto de las características de la cavidad en la quimera, que depende a su vez de la interacción entre las cadenas laterales de los residuos del bucle y aquellas de la matriz proteica de *Tt*-Cu_A, como de características del ligando exógeno utilizado. Una forma de determinar esta influencia, al menos de manera parcial, es ver si existe alguna correlación entre la constante de unión con la accesibilidad del sitio activo (cobre y cadenas laterales de ligandos). En la Figura-56 se presenta un gráfico de constante de formación, K_f, en función del ASAS, área de superficie accesible a solvente, estimado a partir de las DM. Como se puede ver no hay correlación entre ambos parámetros. Esto indica que la afinidad del ligando no parece estar determinada según su facilidad de acceso al sitio metálico. Sin embargo, no es posible descartar con este análisis sencillo efectos más sutiles sobre su orientación respecto a otros grupos coordinantes y la geometría global adoptada por el aducto proteína-Imidazol, la cual indefectiblemente estará influenciada por aspectos estéricos específicos en cada caso, dando cuenta, al menos en parte, de las diferencias espectrales observadas a lo largo del conjunto de quimeras estudiado.

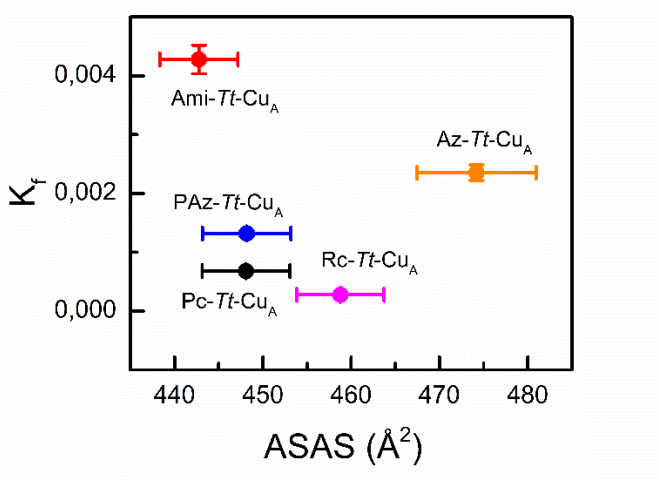


Figura 56: *Constante de formación del aducto, K_f, en función del área de superficie accesible a solvente, ASAS, obtenido a partir de las DM.*

Por otro lado, el otro aspecto importante que puede determinar la termodinámica de este proceso es la afinidad intrínseca del ion metálico por el ligando. Y en este sentido las pequeñas diferencias estructurales se vuelven relevantes para este análisis. Tanto la estructura secundaria adoptada por el bucle, que depende de su largo y secuencia aminoacídica, como la interacción estérica entre las cadenas laterales del bucle y matriz llevan a que la colección de quimeras presente pequeñas distorsiones geométricas en sus sitios. Estas distorsiones generan cambios en los niveles energéticos de los orbitales *d* del cobre, dado que el campo de ligandos es ligeramente diferente en cada caso, generando, *a priori*, diferente afinidad por un átomo dador de electrones, como es el nitrógeno en el caso de la molécula de imidazol. De esta manera se contrastaron los valores de K_f contra los parámetros empíricos diagnósticos del grado de distorsión geométrica a nivel del sitio metálico, como ser el cociente de intensidades a 450 y 600 nm ($\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$), y el potencial de reducción. En los resultados presentados en la Figura-57-A y B puede observarse que en ambos casos cuatro de las cinco proteínas evaluadas parecen presentar una correlación suave entre sus constantes de formación y estos parámetros. Esto sugiere que para un subconjunto de estas quimeras parece existir una relación entre el grado de distorsión alrededor del cobre y la afinidad por el imidazol como se planteó inicialmente, presentando el siguiente orden, decreciente, en su K_f: Az-*Tt*-Cu$_A$ > PAz-*Tt*-Cu$_A$ > Pc-*Tt*-Cu$_A$ > Rc-*Tt*-Cu$_A$. A partir de esta tendencia se buscaron correlaciones entre los valores de las constantes de formación y distintos parámetros geométricos obtenidos a partir de las DM. Entre ellos se emplearon el cociente de distancias Cu-S de los residuos coordinantes metionina y cisteína, y el parámetro τ_4. En la Figura-57-C y D se presentan estas comparaciones. En particular, según indica la Figura-57-C, la K_f aumenta a medida que disminuye el parámetro τ_4, lo que indica que tal incremento está relacionado con el incremento del carácter plano cuadrado en el sitio de cobre. Probablemente, esta relación se deba a que en este tipo de geometría se genera una nueva posición axial que admite un nuevo ligando. Recordemos que este parámetro va de plano cuadrado con τ_4= 0, a tetraédrico con τ_4= 1, por ende en todos los casos los sitios son esencialmente tetraedros fuertemente distorsionados ya que sus valores de τ_4 oscilan entre 0,6 - 0,7. Por otro lado, recordemos que una disminución del cociente dCu-S$_{Met}$/dCu-S$_{Cis}$ sugiere una mayor interacción entre el ligando axial metionina y el cobre lo cual

contribuye a sacarlo del plano NNS generado por los ligandos histidina y cisteína, favoreciendo un pasaje gradual hacia una distorsión tetragonal.

De estas observaciones se desprende el hecho de que, dado que tanto el potencial de reducción y la constante de formación del aducto se encuentran ligados, su modulación será en gran parte conjunta, al menos si se lo intenta hacer empleando una estrategia que introduzca cambios estructurales locales. Esto solo sería válido para este subconjunto de cuatro quimeras, quedando la variante Am-*Tt*-Cu_A fuera de esta tendencia. Recordemos que, si bien estos parámetros no son independientes, existen otras alternativas para modular el potencial redox que no implican *a priori* cambios geométricos a nivel del metal.

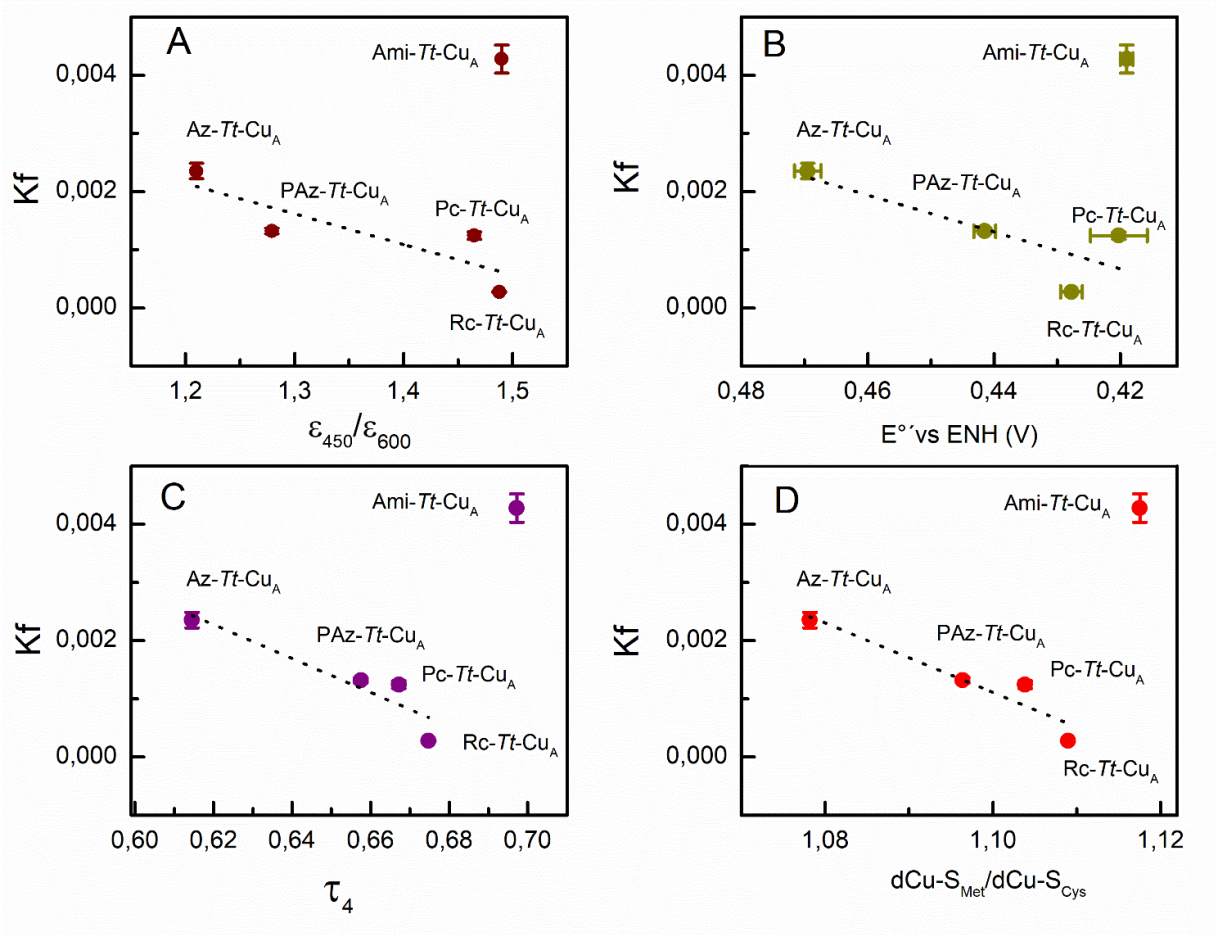


Figura 57: *Gráficos de K_f en función de diferentes parámetros estructurales y espectroscópicos diagnósticos de las distorsiones geométricas en el sitio de cobre.* ***A.*** *$\varepsilon_{450}/\varepsilon_{600}$, Cociente de intensidades de las bandas 450 y 600 nm,* ***B.*** *Cociente de distancias Cu-S del residuo metionina y el residuo cisteína,* ***C.*** *Parámetro τ_4,* ***D.*** *Potencial de reducción.*

Es importante destacar que en estos sistemas la generación de un sitio de tipo 2 de cobre se logra sin la necesidad de realizar mutaciones puntuales, y que se da de forma reversible. En todos los sistemas artificiales reportados hasta el momento, en los que se generó un sitio de tipo 2 de cobre fue necesario realizar mutaciones puntuales para reemplazar uno o varios de los residuos coordinantes. Por otro lado, de igual manera, todos los casos reportados de sitios

de cobre que tenían la habilidad de coordinar ligandos exógenos presentaban mutaciones que eliminaban alguno de los residuos naturales, generando así una cavidad en las cercanías del cobre. En estos sistemas la coordinación de la molécula exógena lograba recuperar, en distinto grado, las propiedades originales del sitio con sus cuatro ligando canónicos o se derivaba en sitios T1,5 o sitios T2.[131–133] En este sentido nuestras quimeras aportan una interesante y novedosa alternativa para la interconversión entre estas dos clases de centros metálicos, una característica que se vuelve potencialmente atractiva para el diseño de dispositivos basados en proteínas dirigidos al sensado de pequeñas moléculas. El sistema estudiado aquí presenta varias características deseables en proteínas escogidas como punto de partida para este tipo de proyectos las cuales pueden ser explotadas en el diseño de biodispositivos. Entre ellas podemos nombrar:

1) Son sistemas estables en rangos de temperatura normales, entre 4-40°C.
2) Toleran rangos de pH entre 4-8 sin problemas.
3) Son estables en condiciones adsorbidas sobre superficies biocompatibilizadas manteniendo intacta su actividad redox.
4) Como veremos más adelante en el Capítulo 5 son estables en presencia de altas concentraciones de agentes viscosantes como la sacarosa o polietilenglicol (PEG), o incluso de líquidos iónicos como el fosfato diácido de colina. Tanto el punto 3 como este son puntos de suma importancia ya que estas condiciones son típicamente empleadas en dispositivos bioelectrónicos[134–136].
5) Presentan cambios detectables en una o más de sus propiedades fisicoquímicas luego de la unión a la molécula blanco. Recordemos que en estos sitios su unión a una molécula pequeña de prueba lleva a fuertes cambios tanto espectrales como termodinámicos, corrimientos de bandas de mayor intensidad en espectros en la región UV-visible y disminución de su potencial de reducción unos 300-660 mV aproximadamente.
6) Ofrecen una manera sencilla, y sistematizable, de introducir cambios en los sitios activos que impactan directamente en la variable de importancia, en este caso la afinidad por la molécula diana. Esta misma característica fue explotada por la naturaleza para generar toda la diversidad de sitios de cobre en el plegamiento cupredoxina.
7) Presentan actividad de TE apreciable y rápida frente a electrodos de oro recubiertos con monocapas autoensambladas con un espaciador de alrededor de 10 Å, debido posiblemente a la alta covalencia del enlace Cu-S_{cis}.

Por otra parte, también aportan una plataforma que permite un estudio sistemático de la coordinación y propiedades espectroscópicas en este tipo de sitios de cobre sencillamente variando el tipo de agente exógeno empleado. Se debe tener en cuenta que los sitios T1,5 y T2 presentan una coordinación muy variable, y recibieron a lo largo de los años menor atención que sus hermanos los sitios de tipo 1.

3.7.2-Formación de un sitio de cobre Tipo 2 mediante ingeniería de bucles en la matriz de *Tt*-Cu_A.

Recientemente se reportó un sitio de cobre de T1 con características únicas perteneciente a la arquea *Nitrosopumilus maritimus*, de ahora en adelante *Nmar*.[137] Entre las nuevas características podemos mencionar que posee un centro muy expuesto a solvente capaz de incorporar una molécula de agua exógena coordinada el catión cobre, su potencial de reducción es de 354 mV (vs EEH), su espectro electrónico presenta dos intensas bandas en 400 y 600 nm, las cuales dan cuenta de un color púrpura intenso, y cataliza la oxidación de NO a NO_2^-. Presenta además una coordinación primaria diferente a todas las reportadas hasta el momento, con una arginina en lugar de la habitual metionina axial y una molécula de agua exógena coordinando directamente al átomo cobre, ver Figura-58. Estas características únicas nos llevaron a elegir el bucle de esta novedosa proteína para generar una quimera en la matriz de *Tt*-Cu_A, denominada *Nmar-Tt*-Cu_A. En esta oportunidad tal como ocurrió con las quimeras verdes uno de los ligandos Histidina proviene de la matriz proteica, mientras que los dos ligandos restantes se encuentran en el bucle, Figura 59-A.

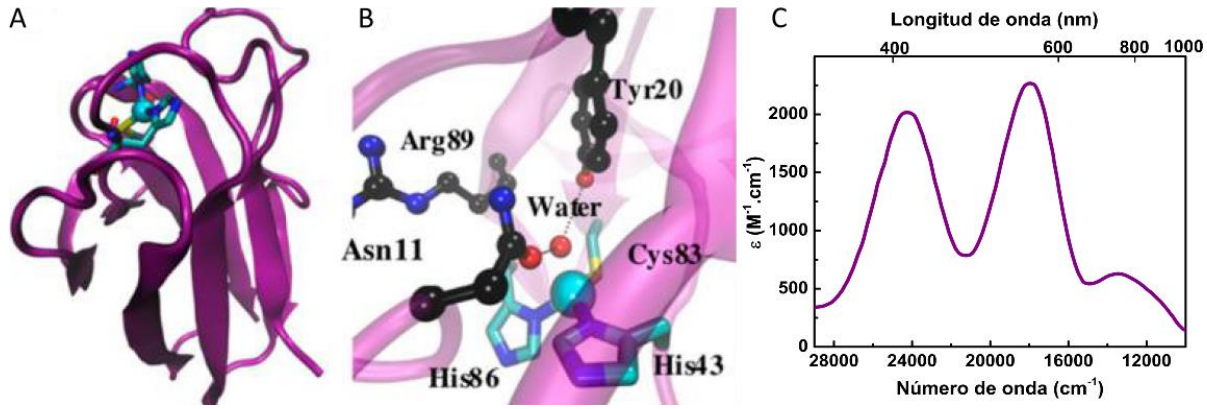


Figura 58: *(Figura adaptada de Hosseinzadeh et al.2016*[137]*)* ***A.*** *Estructura del dominio cupredoxina de Nmar mostrando elementos de estructura secundaria y el sitio metálico,* ***B.*** *Detalle del sitio metálico y su esfera de coordinación, primaria y secundaria,* ***C.*** *Espectro de absorción electrónica de Nmar.*

3.7.2.1-Caracterización espectroscópica

Su espectro de absorción electrónico es marcadamente diferente de aquel de las dos proteínas progenitoras, *Tt*-Cu_A y *Nmar*, y presenta similitudes con los espectros típicos de los sitios T2 como los de Nitrosocianina presentando también una coloración rojiza tenue, Figura-59-B. Tal como se comentó previamente una de las características sobresalientes del sitio de Nitrosocianina es su intensa banda en torno a los 25500 cm^{-1} (390 nm), la que presenta una absortividad molar de 7000 M^{-1} cm^{-1}. La *Nmar-Tt*-Cu_A presenta un máximo global en 25445 cm^{-1} (393 nm) con una absortividad molar mucho menor, de 1500 M^{-1} cm^{-1}, lo que indica diferencias a nivel electrónico, específicamente en el enlace Cu-S_{cis}.

Por otro lado, los resultados de experimentos de EPR también son compatibles con la presencia de un sitio T2 presentando una constante de acoplamiento hiperfino alta del orden de 199 x 10^{-4} cm^{-1}, Figura-60. A partir del análisis del espectro se llega a la conclusión de que existe un 10% de la señal compatible con un sitio de T1, con una $A_{//}$ de 87 x 10^{-4} cm^{-1} compatible con sitios T1 rómbicos, o distorsionados, lo que podría indicar que esta variante se encuentra en dos conformaciones, siendo la mayoritaria una con un sitio T2, Tabla-16. Se debe notar que tanto el espectro EPR como el UV-visible de *Nmar* revelan la existencia de una mezcla de sitios metálicos en una proporción 1:1, la que a su vez se ve influenciada por la viscosidad del medio. Dado que *Nmar* se trata del primer caso de una cupredoxina con un sitio expuesto y se comprobó que posee actividad catalítica, no es extraño que tales características se encuentren asociadas a una mayor flexibilidad local, que permita una interconversión entre dos mínimos locales. El hecho de que en *Nmar*-*Tt*-Cu_A la relación entre las poblaciones T1 y T2 se haya desplazado hacia una forma T2 predominante resalta el rol modulador de la matriz proteica con respecto al equilibrio conformacional del sitio.

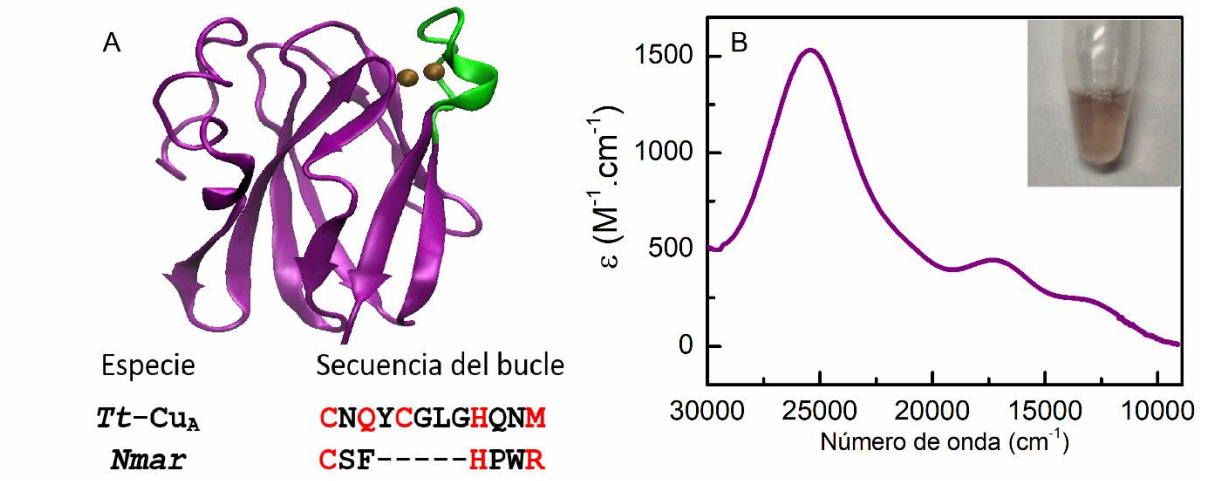


Figura 59: ***A.*** *Dominio de Tt-Cu_A (pdb 2CUA)*[138] *mostrando en verde el bucle reemplazado, en la parte inferior se presentan las secuencias de los bucles intercambiados.* ***B.*** *Espectro de absorción electrónico, con una fotografía de la solución proteica.*

Tabla-16: Valores de los parámetros de EPR obtenidos para la especie mayoritaria (sitio de T2) y especie minoritaria (sitio de T1).

	%	$g_{//}$	$g_{\perp}$		$A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$A_{\perp}$ (10^{-4} cm^{-1})	
T2	92	2,1828	2,0385	2,0522	199	17,3	0,2
T1	8	2,2171	2,0221	2,1123	87,1	2,9	3,1

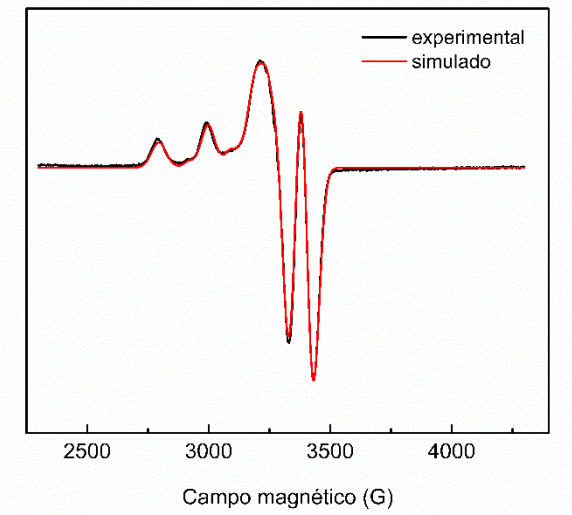


Figura 60: *Espectro EPR de banda X para la quimera Nmar-Tt-Cu$_A$.*

Se obtuvieron espectros Raman resonante a bajas temperaturas (77K) utilizando dos longitudes de onda de excitación distintas, 532 nm y 405 nm, Figura 61. Los espectros Rr presentan varias señales en la región de 300-500 cm^{-1} que se encuentran asignadas a modos vibracionales que involucran al enlace Cu-S$_{cis}$[44–49]. La frecuencia de vibración efectiva, $\langle \nu_{Cu-Scis} \rangle^{eff}$, que no es otra cosa que un promedio de la posición de las bandas pesado por sus intensidades, adopta un valor de 381 cm^{-1} y 385 cm^{-1}, para los espectros obtenidos a 532nm y 405 nm, respectivamente. Estos valores resultan prácticamente idénticos al reportado para la proteína nitrito reductasa, con un valor de 383 cm^{-1}. Recordemos que esta proteína alberga un sitio de T1 rómbico o distorsionado. Por otro lado, difiere fuertemente de proteínas con sitios de cobre T1 axiales o canónicos, con valores de alrededor de 403 cm^{-1} [51] como en el caso de Plastocianina, o de aquellos de sitios de T2 como Nitrosocianina, con un valor de 321 cm^{-1} [30]. Este parámetro ha sido ampliamente utilizado como estimador de la fuerza del enlace Cu-S$_{cis}$, y si bien, como se comentó previamente en la sección-3.3.3, el análisis de este parámetro no resulta trivial en las quimeras de *Tt*-Cu$_A$, se puede inferir de manera orientativa su fuerza de enlace, sin intenciones de obtener distancias de enlace a la décima de Angstroms[44,50]. De este modo, este resultado sugiere un enlace más corto, y por ende más débil, en *Nmar-Tt*-Cu$_A$ respecto de Nitrosocianina. Esta menor distancia se traduce, en términos del modelo de distorsión acoplada, en una menor distorsión tetragonal del sitio metálico, lo que a su vez es consistente con la disminución de la intensidad de la banda a 25445 cm^{-1} en el espectro de absorción UV-visible. Este hecho anticipa una posible actividad electroquímica aumentada respecto de otros sitios de T2, dado que se postuló que el grado de covalencia del enlace Cu-S$_{cis}$ se encuentra íntimamente relacionado con el *pathway* electrónico en este tipo de sitio metálicos[19,30].

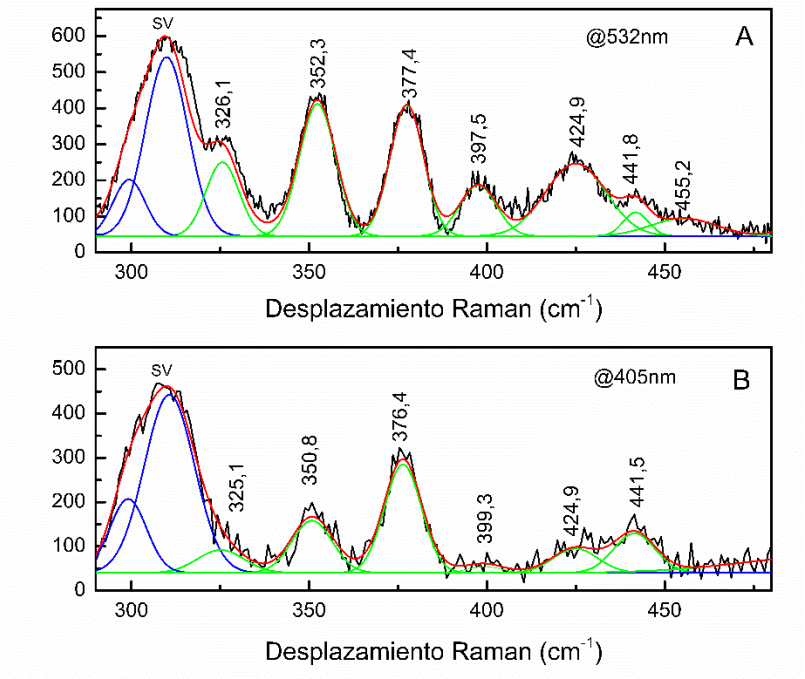


Figura 61: Espectros Raman resonante obtenidos a bajas temperaturas (77K) a dos frecuencias de excitación diferentes, **A.** 532nm y **B.** 405nm. Se presenta la deconvolución espectral, indicando en verde las bandas correspondientes al sitio metálico, en azul aquellas correspondientes al solvente y en rojo la suma total.

3.7.2.2-Caracterización electroquímica

Para explorar los aspectos funcionales de esta quimera se realizaron voltametrías de soluciones proteicas a pH 7 en función de la temperatura. Los voltagramas presentan señales cuasi-reversibles ligeramente asimétricas con separación entre picos en el rango 110-145mV, para las velocidades más lentas empleadas, que presentan un incremento lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para todas las temperaturas exploradas, tal como se espera para un régimen de control difusional de una solución de analito redox activo, Figura-62-A y B. Al igual que ocurrió con los sitios amarillos (aductos de imidazol) tratados en la sección anterior, esta nueva quimera también es redox activa frente a voltametría cíclica a diferencia de otros sitios T2 reportados en literatura. Esto es consistente con una mayor covalencia del enlace Cu-S_{cis}, lo cual se traduce también en una absortividad molar menor para la banda de transferencia de carga S_{cis}→Cu. El potencial de reducción a 298 K es de 242 mV (vs EEH) presentando un corrimiento de 100 mV hacia abajo respecto de *Nmar*, (354 mV vs EEH)[137]. Por otro lado, este valor es mucho mayor que el reportado para Nitrosocianina, (80mV vs ENH), lo que refuerza la observación de que este sitio presenta diferencias en las cercanías del cobre. Tal como se trató en secciones anteriores, el entorno proteico impone la geometría del campo de ligandos sobre el metal, alterando sus energías relativas modulando el valor del potencial de reducción. Se concluyó previamente que el trasplante de bucles de sitios T1 en la matriz de *Tt*-Cu_A podría haber relajado esta fuerza impuesta sobre el metal permitiendo al conjunto metal-ligandos adoptar una conformación más favorable en cada estado de reducción. Dado que en

proteínas portadoras de sitios T1 silvestres el potencial de reducción es menor que el que se esperaría para un complejo de cobre en solución con el mismo set de ligandos[139], el consenso es que en estas proteínas las matrices se imponen sobre el metal reduciendo los valores de potenciales redox. Al relajar tal condición, se observan incrementos en los valores de potencial redox, sección-3.5.1. Una situación similar podría estar operando en *Nmar*-*Tt*-Cu_A. Sin embargo, aquí el corrimiento es en la dirección opuesta. Se cree que el alto valor de potencial redox de *Nmar* silvestre fue optimizado, junto a un sitio metálico abierto y expuesto a solvente, para llevar a cabo una función catalítica. De modo que relajar tal situación llevaría a una disminución de este valor, tal como ocurre en *Nmar*-*Tt*-Cu_A. Esta propuesta es consistente con el hecho de que ciertos residuos clave, la tirosina-20 y la asparragina-11, ver Figura-58, que se encuentran formando enlaces de hidrógeno con la molécula de agua exógena que se encuentra coordinando al cobre en *Nmar* no se encuentran presente en la matriz de *Tt*-Cu_A, contribuyendo a la reducción de la constricción proteica sobre el sitio. Por supuesto que factores estéricos del binomio bucle-matriz también son una fuente importante que determina tal situación. Si bien, la relajación de la geometría del sitio lleva a una disminución del potencial redox, este aún se encuentra por arriba del esperado. Esto puede deberse a la presencia de un residuo de arginina que se encuentra ocupando la posición del residuo metionina que típicamente coordina al cobre. La presencia de un residuo con carga positiva lleva a una desestabilización relativa del estado oxidado frente al reducido, elevando el valor del potencial redox respecto a otros sitios T2. Sin embargo, el escenario puede ser aún más complejo, como veremos a continuación.

Los experimentos en función de la temperatura arrojaron resultados inesperados. En el rango de temperaturas explorado, de 4-40°C, se observó un incremento muy grande del valor del potencial de reducción, Figura-62-C y D. Este incremento lleva a la obtención de un valor de entropía de reducción, ΔS^0_{red} , de 60 (±4) J.K.mol^{-1}, y de entalpía de reducción, ΔH^0_{red}, de -6 (±1) kJ.mol^{-1}. Si se expresan estos valores en milivolts se tiene $T\Delta S^0_{red}F^{-1}$ = 184 (±11) mV y $-\Delta H^0_{red}F^{-1}$ = 60 (±11) mV, respectivamente. Según estos números la ΔS^0_{red} representa el 75% del valor de potencial redox, mientras que la ΔH^0_{red} solo una fracción menor. La mayoría de los sitios de cobre presentan ΔS^0_{red} negativas, siendo algunas excepciones el caso de pseudoazurina de *Alcaligenes faecalis S-6*, con ΔS^0_{red} = 37 J.K^{-1}.mol^{-1},[88] y la proteína básica de pepino de *Cucumis sativus* con una ΔS^0_{red} = 31 J.K^{-1}.mol^{-1}.[94] Sin embargo, en todos estos casos la componente entálpica es mucho mayor que la entrópica, y presentan una fuerte compensación entrópica/entálpica donde el término entrópico se cancela en su totalidad, ver sección-3.5.2. La quimera *Nmar*-*Tt*-Cu_A representa el único caso reportado hasta el momento de una metaloproteína de cobre con un potencial de reducción determinado principalmente por la componente entrópica, Figura-63.

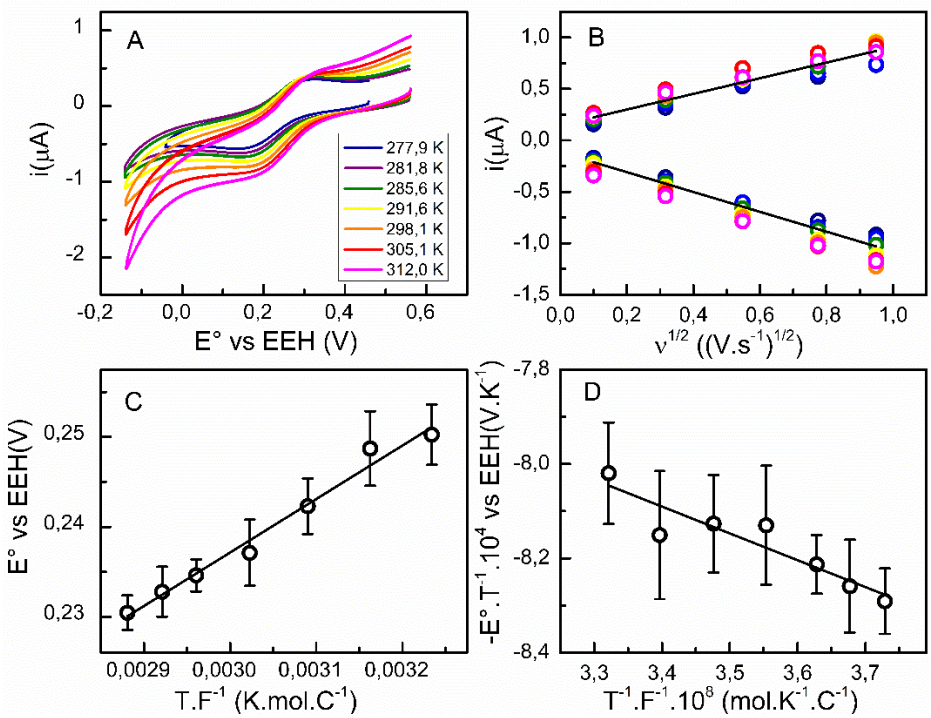


Figura 62: ***A.*** *Voltagramas obtenidos a partir de soluciones proteicas a pH 7 (buffer fosfato 10mM, KNO_3 500mM) en función de la temperatura registrados a 100mV/s,* ***B.*** *Corriente del máximo de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (ν),* ***C*** *y* ***D.*** *Distintas representaciones de la dependencia del potencial de reducción con la temperatura que permiten la obtención sus las componentes entrópicas y entálpicas.*

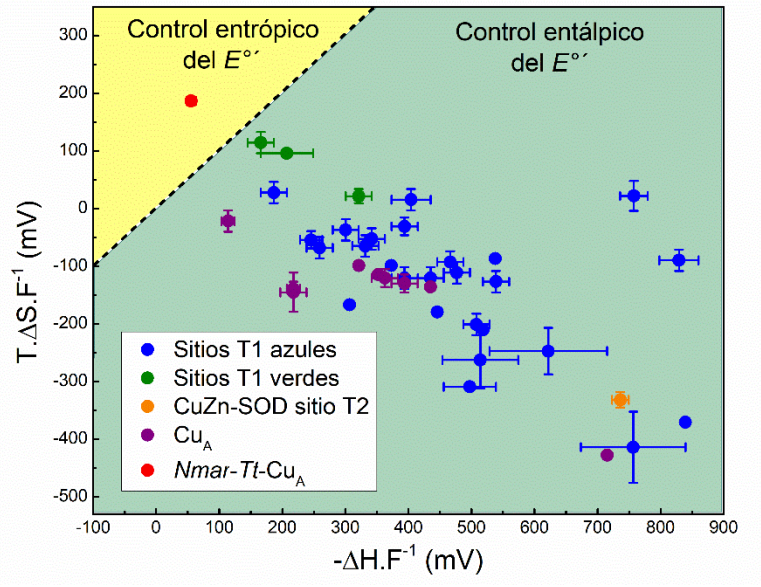


Figura 63: *Gráfico de componente entrópica en función de la componente entálpica del potencial de reducción. Se presentan todos los valores reportados en la literatura para sitios de cobre de distinta clase.*

Si bien esta característica es novedosa para proteínas de cobre, es común en muchas hemoperoxidasas, las que presentan altos valores positivos de ΔS_{Red}, así como también en algunos centros de hierro-azufre los que presentan un control entrópico con valores muy negativo de ΔS_{Red}.[87] Valores altos y positivos de entropías de reducción sugieren sitios metálicos abiertos, expuestos a solvente, que usualmente cumplen roles catalíticos. Esta mayor exposición promueve grandes reordenamientos de los dipolos de las moléculas de solvente al ocurrir la reacción de transferencia electrónica. Al cambiar la carga del catión cobre, disminuye el campo eléctrico al que se encuentran sometidas las moléculas de la esfera de hidratación de la proteína, de modo que estas experimentan un mayor grado de movilidad, ganando grados de libertad, con lo cual la entropía del sistema aumenta. En el caso de centros de hierro-azufre con alta exposición al solvente, una explicación electrostática también se adecua, sin embargo, ocurre el proceso inverso. Como los sitios tienen carga negativa, al reducirse, esta aumenta aún más, y el campo eléctrico local se intensifica, llevando a un menor grado de movilidad de los dipolos del solvente, y por ende a una menor entropía global.

Sin embargo, si bien las contribuciones de solvente a la entropía son claras, dada la rareza de estos resultados uno puede sospechar de la existencia de otras contribuciones adicionales a la entropía. Tal como se tratará en capítulos posteriores, existen ejemplos en la literatura de sistemas relacionados en los que existen otras contribuciones diferentes de la del solvente a los valores de entropías. Puntualmente, en sitios binucleares de cobre, sitios de Cu_A, que se tratarán en el Capítulo 5 de esta tesis, se logró demostrar que la multiplicidad electrónica de los dos estados alternativos que definen el estado fundamental determina tanto el signo como el valor de las entropías de reducción. Al mismo tiempo esta multiplicidad queda a merced de la diferencia de energía entre estos estados alternativos, la que pudo ser modulada de diferentes formas[81,82]. Entonces, siguiendo estos antecedentes, resulta factible pensar que la diferencia entre el subespacio conformacional entre ambos estados redox en *Nmar-Tt*-Cu_A podría explicar, al menos en parte, este alto valor de ΔS^0_{red}. Más aún, combinación de estudios tanto teóricos como experimentales de distintos grupos [140–142] sugieren que las formas oxidadas de algunos sitios de T1, como por ejemplo el de la nitrito reductasa, pueden existir en distintas conformaciones, una rómbica (verdosa) y otra axial (azul), que se encontrarían en equilibrio termodinámico. Por otra parte, hace algunos años el Prof. Yi Lu y su grupo describieron la conversión de un sitio T1 azul en otro de T2 verde tras la oxidación en un sistema que utilizó la proteína azurina con mutaciones que le confirieron un alto valor de potencial de reducción.[143] Por lo tanto, la presencia de múltiples conformaciones en sitios de cobre en matrices con plegamiento tipo cupredoxina parece ser posible, especialmente en sistemas en los que las restricciones impuestas por la matriz sobre el sitio metálico son más débiles, ya sea por razones naturales o artificiales[28]. Siguiendo este razonamiento, para el caso puntual de *Nmar-Tt*-Cu_A un valor positivo de entropía sería compatible con un mayor subespacio conformacional en el estado reducido, el que a su vez estaría determinado por un menor efecto restrictivo del andamiaje proteico sobre el sitio metálico. Aún es tema de debate el interrogante de si el efecto de la matriz proteica es más elevado en un estado redox en particular[13,144], sin embargo, es razonable pensar que esta cuestión no es fácilmente generalizable y queda sujeta a detalles de cada sistema en particular. Desafortunadamente los sitios de cobre I son mucho más difíciles de interrogar experimentalmente dado que son

diamagnéticos y no absorben en el espectro UV-visible[16], dificultando la posibilidad de obtener evidencia a favor o en contra de esta hipótesis.

3.8-Conclusiones

En este capítulo se presentó una serie de metaloproteínas conteniendo sitios de cobre de T1 generados mediante el reemplazo del bucle que conforma el sitio de Cu_A en un fragmento soluble de la Citocromo *c* oxidasa por secuencias análogas que conforman sitios T1 en otras proteínas. El análisis espectroscópico de estas proteínas quimeras indica que los sitios presentan características típicas de sitios T1 rómbicos, es decir con una geometría intermedia entre tetraédrica y plano cuadrada (distorsión tetragonal) comparable con aquella observada en el sitio T1 verde del nitrito reductasa. Por otra parte, el espectro de absorción electrónico se caracteriza por una fuerte envolvente en torno a 450 nm que indica una fuerte interacción del cobre con la metionina axial (corroborado por cristalografía y DM). Esta interacción parece estar impuesta por la nueva matriz proteica hospedadora del sitio ya que es común en todo el conjunto de quimeras donde, por otra parte, las restricciones nativas que experimentaban en sus respectivas matrices de origen se perdieron. El análisis electroquímico indica que esa situación llevó a un incremento en el potencial de reducción, con un valor medio en torno a 410-480 mV (vs EEH), lo que equivale a incrementos del orden de 50-210 mV. Además, las pequeñas diferencias geométricas de los sitios T1 en las quimeras, que explican en parte aspectos sutiles de los espectros UV-visibles (R_L), permiten dar cuenta de la sutil modulación del $E°$ de 60 mV a lo largo del conjunto. Notablemente, las energías de reorganización (λ) no parecen verse influenciadas por tales diferencias estructurales respondiendo fuertemente al grado de exposición del centro metálico al solvente. Esto indica que λ se ve determinada principalmente por su componente externa (λ^{ext}). Se observó que es posible modular en un factor mayor a dos el valor de λ controlando el grado de exposición del sitio metálico, que convenientemente en nuestro sistema se logra de manera muy sencilla, eligiendo adecuadamente el largo del bucle implantado. De este modo, se logró modular el $E°$ y el λ de manera independiente por primera vez en estos sistemas. La razón de este comportamiento parece deberse a dos aspectos clave de este sistema:

1) La diferencia en la sensibilidad de ambos parámetros ($E°$ y λ) por cambios en la geometría del sitio y efectos de solvente,

2) La mayor exposición al solvente en sí misma. En los sistemas silvestres (nativos) los sitios se encuentran inmersos en la matriz proteica, protegidos del solvente precisamente para evitar no solo reacciones laterales con otras moléculas, sino también para disminuir la componente λ^{ext}.

Se observó que estas quimeras pueden unir pequeñas moléculas como el imidazol, el que al coordinarse con el cobre da lugar a sitios de cobre que pueden catalogarse en base a espectroscopia de absorción electrónica y EPR como sitios de tipo 1,5. Este tipo de sitios se caracteriza por presentar propiedades intermedias entre sitios T1 y T2. En particular al generarse estos sitios su coloración cambia, así como su potencial de reducción. Estas características sumado a la estabilidad en general de estos sistemas tanto en solución como

adsorbidas sobre superficies las convierten en un sistema interesantes para el estudio y diseño de sistemas de sensado de pequeñas moléculas.

Hacia el final del capítulo se presenta una quimera donde el bucle implantado carece de la metionina coordinante axial. Esto dio lugar a la formación de un sitio T2 de color rojizo que sorprendentemente presenta una actividad electroquímica notablemente superior a otros sitios T2, presumiblemente debido a una interacción Cu-S_{cis} incrementada. Esta quimera se destaca del resto del conjunto no solo en su coloración sino también en sus propiedades termodinámicas, convirtiéndose en la primera metaloproteína de cobre con un potencial de reducción determinado entrópicamente, es decir, donde su componente entrópica es mayor en módulo que su contraparte entálpica. Este ejemplo, sumado al resto de los resultados presentados en este capítulo (y de manera más amplia en esta tesis) demuestran que aún hay mucho por aprender de este tipo de sistemas artificiales sencillos obtenidos a través de una estrategia de rediseño de metaloproteínas silvestres.

3.9-Referencias

[1] E.T. Adman, Copper Protein Structures, in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, D.S. Eisenberg (Eds.), Advances in Protein Chemistry, Academic Press, 1991: pp. 145–197. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60536-7.

[2] C. Dennison, Investigating the structure and function of cupredoxins, Coordination Chemistry Reviews. 249 (2005) 3025–3054. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.021.

[3] L. Chen, R. Durley, B.J. Poliks, K. Hamada, Z. Chen, F.S. Mathews, V.L. Davidson, Y. Satow, E. Huizinga, F.M. Vellieux, Crystal structure of an electron-transfer complex between methylamine dehydrogenase and amicyanin, Biochemistry. 31 (1992) 4959–4964. https://doi.org/10.1021/bi00136a006.

[4] V.L. Davidson, L.H. Jones, Complex Formation with Methylamine Dehydrogenase Affects the Pathway of Electron Transfer from Amicyanin to Cytochrome c-551i (∗), Journal of Biological Chemistry. 270 (1995) 23941–23943. https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.23941.

[5] Y.L. Hyun, V.L. Davidson, Electron transfer reactions between aromatic amine dehydrogenase and azurin, Biochemistry. 34 (1995) 12249–12254. https://doi.org/10.1021/bi00038a020.

[6] P.B. Crowley, G. Otting, B.G. Schlarb-Ridley, G.W. Canters, M. Ubbink, Hydrophobic Interactions in a Cyanobacterial Plastocyanin−Cytochrome f Complex, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 10444–10453. https://doi.org/10.1021/ja0112700.

[7] M. Ubbink, M. Ejdebäck, B.G. Karlsson, D.S. Bendall, The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics, Structure. 6 (1998) 323–335. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00035-5.

[8] J. Liu, S. Chakraborty, P. Hosseinzadeh, Y. Yu, S. Tian, I. Petrik, A. Bhagi, Y. Lu, Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers, Chem. Rev. 114 (2014) 4366–4469. https://doi.org/10.1021/cr400479b.

[9] A.M. Nersissian, J.S. Valentine, C. Immoos, M.G. Hill, P.J. Hart, G. Williams, R.G. Herrmann, Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: Plant-specific mononuclear blue copper proteins, Protein Science. 7 (1998) 1915–1929. https://doi.org/10.1002/pro.5560070907.

[10] J.D. King, C.L. McIntosh, C.M. Halsey, B.M. Lada, D.M. Niedzwiedzki, J.W. Cooley, R.E. Blankenship, Metalloproteins Diversified: The Auracyanins Are a Family of Cupredoxins That Stretch the Spectral and Redox Limits of Blue Copper Proteins, Biochemistry. 52 (2013) 8267–8275. https://doi.org/10.1021/bi401163g.

[11] M. Choi, V.L. Davidson, Cupredoxins—A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes, Metallomics. 3 (2011) 140–151. https://doi.org/10.1039/C0MT00061B.

[12] E.T. Adman, J.W. Godden, S. Turley, The Structure of Copper-nitrite Reductase from Achromobacter cycloclastes at Five pH Values, with NO−2 Bound and with Type II Copper Depleted, J. Biol. Chem. 270 (1995) 27458–27474. https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27458.

[13] J.J. Warren, K.M. Lancaster, J.H. Richards, H.B. Gray, Inner- and outer-sphere metal coordination in blue copper proteins, Journal of Inorganic Biochemistry. 115 (2012) 119–126. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.05.002.

[14] H.B. Gray, B.G. Malmström, R.J.P. Williams, Copper coordination in blue proteins, J. Biol. Inorg. Chem. 5 (2000) 551–559. https://doi.org/10.1007/s007750000146.

[15] R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology, Chem. Rev. 96 (1996) 2239–2314. https://doi.org/10.1021/cr9500390.

[16] J.A. Guckert, M.D. Lowery, E.I. Solomon, Electronic Structure of the Reduced Blue Copper Active Site: Contributions to Reduction Potentials and Geometry, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 2817–2844. https://doi.org/10.1021/ja00115a016.

[17] J.M. Guss, P.R. Harrowell, M. Murata, V.A. Norris, H.C. Freeman, Crystal structure analyses of reduced (CuI) poplar plastocyanin at six pH values, Journal of Molecular Biology. 192 (1986) 361–387. https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90371-2.

[18] M. Koch, M. Velarde, M.D. Harrison, S. Echt, M. Fischer, A. Messerschmidt, C. Dennison, Crystal Structures of Oxidized and Reduced Stellacyanin from Horseradish Roots, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 158–166. https://doi.org/10.1021/ja046184p.
[19] E.I. Solomon, R.K. Szilagyi, S. DeBeer George, L. Basumallick, Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins, Chem. Rev. 104 (2004) 419–458. https://doi.org/10.1021/cr0206317.
[20] B.L. Vallee, R.J.P. Williams, Metalloenzymes: The Entatic Nature of their Active Sites, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 59 (1968) 498–505.
[21] H.B. Gray, Bo.G. Malmström, On the Relationship between Protein-Forced Ligand Fields and the Properties of Blue Copper Centers, Comments on Inorganic Chemistry. 2 (1983) 203–209. https://doi.org/10.1080/02603598308078118.
[22] R.J.P. Williams, Energised (entatic) states of groups and of secondary structures in proteins and metalloproteins, in: P. Christen, E. Hofmann (Eds.), EJB Reviews, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1996: pp. 257–275. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85252-7_18.
[23] W.E.B. Shepard, R.L. Kingston, B.F. Anderson, E.N. Baker, Structure of apo-azurin from Alcaligenes denitrificans at 1.8 Å resolution, Acta Cryst D. 49 (1993) 331–343. https://doi.org/10.1107/S0907444992013544.
[24] K. Petratos, M. Papadovasilaki, Z. Dauter, The crystal structure of apo-pseudoazurin from Alcaligenes faecalis S-6, FEBS Letters. 368 (1995) 432–434. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00705-E.
[25] T.P. Garrett, D.J. Clingeleffer, J.M. Guss, S.J. Rogers, H.C. Freeman, The crystal structure of poplar apoplastocyanin at 1.8-A resolution. The geometry of the copper-binding site is created by the polypeptide., Journal of Biological Chemistry. 259 (1984) 2822–2825. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43220-0.
[26] E.I. Solomon, Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry: Blue to Green to Red Copper Sites, Inorg. Chem. 45 (2006) 8012–8025. https://doi.org/10.1021/ic060450d.
[27] L.B. LaCroix, S.E. Shadle, Y. Wang, B.A. Averill, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, 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. 118 (1996) 7755–7768. https://doi.org/10.1021/ja961217p.
[28] E.I. Solomon, R.G. Hadt, Recent advances in understanding blue copper proteins, Coordination Chemistry Reviews. 255 (2011) 774–789. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.008.
[29] L. Basumallick, S.D. George, D.W. Randall, B. Hedman, K.O. Hodgson, K. Fujisawa, E.I. Solomon, Spectroscopic comparison of the five-coordinate [Cu(SMeIm)(HB(3,5-iPr2pz)3)] with the four-coordinate [Cu(SCPh3)(HB(3,5-iPr2pz)3)]: effect of coordination number increase on a blue copper type site, Inorganica Chimica Acta. 337 (2002) 357–365. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(02)01104-0.
[30] L. Basumallick, R. Sarangi, S. DeBeer George, B. Elmore, A.B. Hooper, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, 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. 127 (2005) 3531–3544. https://doi.org/10.1021/ja044412+.
[31] C. Buning, G.W. Canters, P. Comba, C. Dennison, L. Jeuken, M. Melter, J. Sanders-Loehr, Loop-Directed Mutagenesis of the Blue Copper Protein Amicyanin from Paracoccus versutus and Its Effect on the Structure and the Activity of the Type-1 Copper Site, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 204–211. https://doi.org/10.1021/ja992796b.
[32] C. Dennison, The role of ligand-containing loops at copper sites in proteins, Natural Product Reports. 25 (2008) 15–24. https://doi.org/10.1039/B707987G.
[33] M.G. Savelieff, Y. Lu, CuA centers and their biosynthetic models in azurin, J Biol Inorg Chem. 15 (2010) 461–483. https://doi.org/10.1007/s00775-010-0625-2.
[34] L.B. LaCroix, D.W. Randall, A.M. Nersissian, C.W.G. Hoitink, G.W. Canters, J.S. Valentine, E.I. Solomon, Spectroscopic and Geometric Variations in Perturbed Blue Copper Centers: Electronic Structures of Stellacyanin and Cucumber Basic Protein, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 9621–9631. https://doi.org/10.1021/ja980606b.

[35] A.A. GEWIRTH, E.I. SOLOMON, Electronic structure of plastocyanin: excited state spectral features, J. Am. Chem. Soc. 110 (1988) 3811–3819.
[36] E.I. Solomon, D.W. Randall, T. Glaser, Electronic structures of active sites in electron transfer metalloproteins: contributions to reactivity, Coordination Chemistry Reviews. 200–202 (2000) 595–632. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00332-5.
[37] A. Espinoza-Cara, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, S. Klinke, L.H. Otero, D.H. Murgida, A.J. Vila, Engineering a bifunctional copper site in the cupredoxin fold by loop-directed mutagenesis, Chem. Sci. 9 (2018) 6692–6702. https://doi.org/10.1039/C8SC01444B.
[38] R.G. Hadt, X. Xie, S.R. Pauleta, I. Moura, E.I. Solomon, 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, Journal of Inorganic Biochemistry. 115 (2012) 155–162. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.03.006.
[39] J.F. Hall, L.D. Kanbi, I. Harvey, L.M. Murphy, S.S. Hasnain, Modulating the Redox Potential and Acid Stability of Rusticyanin by Site-Directed Mutagenesis of Ser86, Biochemistry. 37 (1998) 11451–11458. https://doi.org/10.1021/bi980960m.
[40] C. Dennison, E. Vijgenboom, W.R. Hagen, G.W. Canters, Loop-Directed Mutagenesis Converts Amicyanin from Thiobacillus versutus into a Novel Blue Copper Protein, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 7406–7407. https://doi.org/10.1021/ja953256r.
[41] J. Peisach, W.E. Blumberg, Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins, Archives of Biochemistry and Biophysics. 165 (1974) 691–708. https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90298-7.
[42] D.M. Arciero, B.S. Pierce, M.P. Hendrich, A.B. Hooper, Nitrosocyanin, a Red Cupredoxin-like Protein from Nitrosomonas europaea, Biochemistry. 41 (2002) 1703–1709. https://doi.org/10.1021/bi015908w.
[43] Alcides J. Leguto, Rediseño racional de cupredoxinas, Rosario, Argentina, 2018.
[44] C.R. Andrew, H. Yeom, J.S. Valentine, B.G. Karlsson, G. van Pouderoyen, G.W. Canters, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, N. Bonander, Raman Spectroscopy as an Indicator of Cu-S Bond Length in Type 1 and Type 2 Copper Cysteinate Proteins, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 11489–11498. https://doi.org/10.1021/ja00104a032.
[45] C.R. Andrew, J. Han, T. den Blaauwen, G. van Pouderoyen, E. Vijgenboom, G.W. Canters, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, Cysteine ligand vibrations are responsible for the complex resonance Raman spectrum of azurin, JBIC. 2 (1997) 98–107. https://doi.org/10.1007/s007750050111.
[46] C.R. Andrew, J. Sanders-Loehr, Copper−Sulfur Proteins: Using Raman Spectroscopy To Predict Coordination Geometry, Acc. Chem. Res. 29 (1996) 365–372. https://doi.org/10.1021/ar950084u.
[47] B.C. Dave, J.P. Germanas, R.S. Czernuszewicz, The first direct evidence for copper(II)-cysteine vibrations in blue copper proteins: resonance Raman spectra of 34S-Cys-labeled azurins reveal correlation of copper-sulfur stretching frequency with metal site geometry, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 12175–12176. https://doi.org/10.1021/ja00078a070.
[48] J. Han, E.T. Adman, T. Beppu, R. Codd, H.C. Freeman, L. Huq, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, Resonance Raman spectra of plastocyanin and pseudoazurin: evidence for conserved cysteine ligand conformations in cupredoxins (blue copper proteins), Biochemistry. 30 (1991) 10904–10913. https://doi.org/10.1021/bi00109a014.
[49] L. Nestor, J.A. Larrabee, G. Woolery, B. Reinhammar, T.G. Spiro, Resonance Raman spectra of blue copper proteins: assignments from normal mode calculations and copper-63/copper-65 and H2O/D2O shifts for stellacyanin and laccase, Biochemistry. 23 (1984) 1084–1093. https://doi.org/10.1021/bi00301a008.
[50] D.R. Herschbach, V.W. Laurie, Anharmonic Potential Constants and Their Dependence upon Bond Length, J. Chem. Phys. 35 (1961) 458–464. https://doi.org/10.1063/1.1731952.
[51] D.F. Blair, G.W. Campbell, W.K. Cho, A.M. English, H.A. Fry, V. Lum, K.A. Norton, J.R. Schoonover, S.I. Chan, Resonance Raman studies of blue copper proteins: effects of temperature and isotopic

substitutions. Structural and thermodynamic implications, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 5755–5766. https://doi.org/10.1021/ja00306a025.
[52] A. Stein, T. Kortemme, Improvements to Robotics-Inspired Conformational Sampling in Rosetta, PLoS One. 8 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063090.
[53] E. Krieger, G. Vriend, YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations, Bioinformatics. 30 (2014) 2981–2982. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426.
[54] E. Krieger, G. Vriend, New ways to boost molecular dynamics simulations, Journal of Computational Chemistry. 36 (2015) 996–1007. https://doi.org/10.1002/jcc.23899.
[55] R. Salomon-Ferrer, A.W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R.C. Walker, Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald, J. Chem. Theory Comput. 9 (2013) 3878–3888. https://doi.org/10.1021/ct400314y.
[56] K. Sato, C. Li, I. Salard, A.J. Thompson, M.J. Banfield, C. Dennison, Metal-binding loop length and not sequence dictates structure, PNAS. 106 (2009) 5616–5621. https://doi.org/10.1073/pnas.0811324106.
[57] L. Yang, D.R. Powell, R.P. Houser, Structural variation in copper(I) complexes with pyridylmethylamide ligands: structural analysis with a new four-coordinate geometry index, τ4, Dalton Trans. (2007) 955–964. https://doi.org/10.1039/B617136B.
[58] C.A. Hurd, N.A. Besley, D. Robinson, A QM/MM study of the nature of the entatic state in plastocyanin, Journal of Computational Chemistry. 38 (2017) 1431–1437. https://doi.org/10.1002/jcc.24666.
[59] S. Yanagisawa, C. Dennison, Loop-Contraction Mutagenesis of Type 1 Copper Sites, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 15711–15719. https://doi.org/10.1021/ja047295r.
[60] C. Li, M.J. Banfield, C. Dennison, Engineering Copper Sites in Proteins: Loops Confer Native Structures and Properties to Chimeric Cupredoxins, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 709–718. https://doi.org/10.1021/ja0661562.
[61] P. Wittung-Stafshede, M.G. Hill, E. Gomez, A.J. Di Bilio, B.G. Karlsson, J. Leckner, J.R. Winkler, H.B. Gray, B.G. Malmström, Reduction potentials of blue and purple copper proteins in their unfolded states: a closer look at rack-induced coordination, JBIC. 3 (1998) 367–370. https://doi.org/10.1007/s007750050246.
[62] P. Wittung-Stafshede, B.G. Malmström, D. Sanders, J.A. Fee, J.R. Winkler, H.B. Gray, Effect of Redox State on the Folding Free Energy of a Thermostable Electron-Transfer Metalloprotein: The CuA Domain of Cytochrome Oxidase from Thermus thermophilus, Biochemistry. 37 (1998) 3172–3177. https://doi.org/10.1021/bi972901z.
[63] H. Li, S.P. Webb, J. Ivanic, J.H. Jensen, Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 8010–8019. https://doi.org/10.1021/ja049345y.
[64] M.V. Botuyan, A. Toy-Palmer, J. Chung, R.C. Blake II, P. Beroza, D.A. Case, H.J. Dyson, NMR Solution Structure of Cu(I) Rusticyanin fromThiobacillus ferrooxidans: Structural Basis for the Extreme Acid Stability and Redox Potential, Journal of Molecular Biology. 263 (1996) 752–767. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0613.
[65] A. Donaire, B. Jiménez, J.-M. Moratal, J.F. Hall, S.S. Hasnain, Electronic Characterization of the Oxidized State of the Blue Copper Protein Rusticyanin by 1H NMR: Is the Axial Methionine the Dominant Influence for the High Redox Potential?, Biochemistry. 40 (2001) 837–846. https://doi.org/10.1021/bi001971u.
[66] H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G.W. Canters, Crystal structure analysis of oxidized Pseudomonas aeruginosa azurin at pH 5·5 and pH 9·0: A pH-induced conformational transition involves a peptide bond flip, Journal of Molecular Biology. 221 (1991) 765–772. https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80173-R.
[67] E.N. Baker, Structure of azurin from Alcaligenes denitrificans refinement at 1·8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules, Journal of Molecular Biology. 203 (1988) 1071–1095. https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90129-5.
[68] W.E.B. Shepard, B.F. Anderson, D.A. Lewandoski, G.E. Norris, E.N. Baker, Copper coordination geometry in azurin undergoes minimal change on reduction of copper(II) to copper(I), J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 7817–7819. https://doi.org/10.1021/ja00177a065.

[69] J.M. Guss, H.D. Bartunik, H.C. Freeman, Accuracy and precision in protein structure analysis: restrained least-squares refinement of the structure of poplar plastocyanin at 1.33 Å resolution, Acta Cryst B. 48 (1992) 790–811. https://doi.org/10.1107/S0108768192004270.
[70] C.A. Collyer, J.M. Guss, Y. Sugimura, F. Yoshizaki, H.C. Freeman, Crystal structure of plastocyanin from a green alga, Enteromorpha prolifera, Journal of Molecular Biology. 211 (1990) 617–632. https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90269-R.
[71] L.M. Cunane, Z.-W. Chen, R.C.E. Durley, F.S. Mathews, X-ray Structure of the Cupredoxin Amicyanin, from Paracoccus denitrificans, Refined at 1.31 Å Resolution, Acta Cryst D. 52 (1996) 676–686. https://doi.org/10.1107/S0907444996001072.
[72] K. Petratos, Z. Dauter, K.S. Wilson, Refinement of the structure of pseudoazurin from Alcaligenes faecalis S-6 at 1.55 Å resolution, Acta Cryst B. 44 (1988) 628–636. https://doi.org/10.1107/S0108768188008912.
[73] J.M. Guss, E.A. Merritt, R.P. Phizackerley, H.C. Freeman, The Structure of a Phytocyanin, the Basic Blue Protein from Cucumber, Refined at 1.8 Å Resolution, Journal of Molecular Biology. 262 (1996) 686–705. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0545.
[74] R.G. Hadt, N. Sun, N.M. Marshall, K.O. Hodgson, B. Hedman, Y. Lu, E.I. Solomon, 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. 134 (2012) 16701–16716. https://doi.org/10.1021/ja306438n.
[75] S. Yanagisawa, M.J. Banfield, C. Dennison, The Role of Hydrogen Bonding at the Active Site of a Cupredoxin: The Phe114Pro Azurin Variant, Biochemistry. 45 (2006) 8812–8822. https://doi.org/10.1021/bi0606851.
[76] N.M. Marshall, D.K. Garner, T.D. Wilson, Y.-G. Gao, H. Robinson, M.J. Nilges, Y. Lu, Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range, Nature. 462 (2009) 113–116. https://doi.org/10.1038/nature08551.
[77] P. Hosseinzadeh, N.M. Marshall, K.N. Chacón, Y. Yu, M.J. Nilges, S.Y. New, S.A. Tashkov, N. Blackburn, Y. Lu, Design of a single protein that spans the entire 2-V range of physiological redox potentials, PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.). 113 (2016) 262–267. https://doi.org/10.1073/pnas.1515897112.
[78] S.M. Berry, M.H. Baker, N.J. Reardon, Reduction potential variations in azurin through secondary coordination sphere phenylalanine incorporations, Journal of Inorganic Biochemistry. 104 (2010) 1071–1078. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.06.004.
[79] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, Journal of Molecular Biology. 157 (1982) 105–132. https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0.
[80] T.P. Hopp, K.R. Woods, Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences, PNAS. 78 (1981) 3824–3828. https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3824.
[81] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.E. Llases, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Fine Tuning of Functional Features of the CuA Site by Loop-Directed Mutagenesis, Inorg. Chem. 58 (2019) 2149–2157. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03244.
[82] D. Alvarez-Paggi, U.A. Zitare, J. Szuster, M.N. Morgada, A.J. Leguto, A.J. Vila, D.H. Murgida, Tuning of Enthalpic/Entropic Parameters of a Protein Redox Center through Manipulation of the Electronic Partition Function, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 9803–9806. https://doi.org/10.1021/jacs.7b05199.
[83] E.T. Adman, G.W. Canters, H. a. O. Hill, N.A. Kitchen, The effect of pH and temperature on the structure of the active site of azurin from Pseudomonas aeruginosa, FEBS Letters. 143 (1982) 287–292. https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80118-X.
[84] T. Pascher, B.G. Karlsson, M. Nordling, B.G. Malmström, T. Vänngård, Reduction potentials and their pH dependence in site-directed-mutant forms of azurin from Pseudomonas aeruginosa, European Journal of Biochemistry. 212 (1993) 289–296. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17661.x.
[85] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Loschi, M. Sola, Redox properties of the basic blue protein (plantacyanin) from spinach, Journal of Inorganic Biochemistry. 69 (1998) 97–100. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)10026-5.

[86] G. Battistuzzi, M. Borsari, G. Di Rocco, A. Ranieri, M. Sola, Enthalpy/entropy compensation phenomena in the reduction thermodynamics of electron transport metalloproteins, J Biol Inorg Chem. 9 (2004) 23–26. https://doi.org/10.1007/s00775-003-0490-3.
[87] G. Di Rocco, G. Battistuzzi, M. Borsari, C.A. Bortolotti, A. Ranieri, M. Sola, The enthalpic and entropic terms of the reduction potential of metalloproteins: Determinants and interplay, Coordination Chemistry Reviews. 445 (2021) 214071. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214071.
[88] G. Battistuzzi, M. Bellei, M. Borsari, G.W. Canters, E. de Waal, L.J.C. Jeuken, A. Ranieri, M. Sola, Control of Metalloprotein Reduction Potential: Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Blue Copper Proteins, Biochemistry. 42 (2003) 9214–9220. https://doi.org/10.1021/bi034585w.
[89] G. Battistuzzi, M. Borsari, G.W. Canters, E. de Waal, L. Loschi, G. Warmerdam, M. Sola, Enthalpic and Entropic Contributions to the Mutational Changes in the Reduction Potential of Azurin, Biochemistry. 40 (2001) 6707–6712. https://doi.org/10.1021/bi010333o.
[90] M. Boström, D.R.M. Williams, B.W. Ninham, Specific ion effects: Role of salt and buffer in protonation of cytochrome c, Eur. Phys. J. E. 13 (2004) 239–245. https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10072-0.
[91] S. Monari, G. Battistuzzi, C. Dennison, M. Borsari, A. Ranieri, M.J. Siwek, M. Sola, Factors Affecting the Electron Transfer Properties of an Immobilized Cupredoxin, J. Phys. Chem. C. 114 (2010) 22322–22329. https://doi.org/10.1021/jp110096a.
[92] G. Battistuzzi, M. Borsari, M. Sola, Anion Binding to Cytochromec2: Implications on Protein–Ion Interactions in Class I Cytochromesc, Archives of Biochemistry and Biophysics. 339 (1997) 283–290. https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9862.
[93] X. Liu, Y. Huang, W. Zhang, G. Fan, C. Fan, G. Li, Electrochemical Investigation of Redox Thermodynamics of Immobilized Myoglobin: Ionic and Ligation Effects, Langmuir. 21 (2005) 375–378. https://doi.org/10.1021/la047928f.
[94] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Loschi, M. Sola, Redox thermodynamics, acid-base equilibria and salt-induced effects for the cucumber basic protein. General implications for blue-copper proteins, JBIC. 2 (1997) 350–359. https://doi.org/10.1007/s007750050142.
[95] M.C. Gurau, S.-M. Lim, E.T. Castellana, F. Albertorio, S. Kataoka, P.S. Cremer, On the Mechanism of the Hofmeister Effect, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 10522–10523. https://doi.org/10.1021/ja047715c.
[96] P. Jungwirth, P.S. Cremer, Beyond Hofmeister, Nature Chemistry. 6 (2014) 261–263. https://doi.org/10.1038/nchem.1899.
[97] E. Lee, J.-H. Choi, M. Cho, The effect of Hofmeister anions on water structure at protein surfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 20008–20015. https://doi.org/10.1039/C7CP02826A.
[98] M.A. Metrick, G. MacDonald, Hofmeister ion effects on the solvation and thermal stability of model proteins lysozyme and myoglobin, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 469 (2015) 242–251. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.038.
[99] J. Paterová, K.B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H.I. Okur, W.R. Liu, C. Hilty, P.S. Cremer, P. Jungwirth, Reversal of the Hofmeister Series: Specific Ion Effects on Peptides, J. Phys. Chem. B. 117 (2013) 8150–8158. https://doi.org/10.1021/jp405683s.
[100] X. Chen, S.C. Flores, S.-M. Lim, Y. Zhang, T. Yang, J. Kherb, P.S. Cremer, Specific Anion Effects on Water Structure Adjacent to Protein Monolayers, Langmuir. 26 (2010) 16447–16454. https://doi.org/10.1021/la1015862.
[101] X. Chen, T. Yang, S. Kataoka, P.S. Cremer, Specific Ion Effects on Interfacial Water Structure near Macromolecules, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 12272–12279. https://doi.org/10.1021/ja073869r.
[102] S.C. Flores, J. Kherb, P.S. Cremer, Direct and Reverse Hofmeister Effects on Interfacial Water Structure, J. Phys. Chem. C. 116 (2012) 14408–14413. https://doi.org/10.1021/jp3029352.
[103] M.G. Cacace, E.M. Landau, J.J. Ramsden, The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena, Quarterly Reviews of Biophysics. 30 (1997) 241–277. https://doi.org/10.1017/S0033583597003363.
[104] D. Alvarez-Paggi, L.A. Abriata, D.H. Murgida, A.J. Vila, Native CuA redox sites are largely resilient to pH variations within a physiological range, Chem. Commun. 49 (2013) 5381–5383. https://doi.org/10.1039/C3CC40457A.

[105] L.A. Abriata, D. Álvarez-Paggi, G.N. Ledesma, N.J. Blackburn, A.J. Vila, D.H. Murgida, Alternative ground states enable pathway switching in biological electron transfer, PNAS. 109 (2012) 17348–17353. https://doi.org/10.1073/pnas.1204251109.
[106] U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, M.N. Morgada, L.A. Abriata, A.J. Vila, D.H. Murgida, Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in CuA Sites of Cytochrome c Oxidase, Angewandte Chemie International Edition. 54 (2015) 9555–9559. https://doi.org/10.1002/anie.201504188.
[107] J.H. Raberg, J. Vatamanu, S. Harris, C.H.M. van Oversteeg, A. Ramos, O. Borodin, T. Cuk, Probing Electric Double Layer Composition via in-Situ Vibrational Spectroscopy and Molecular Simulations, J. Phys. Chem. Lett. (2019). https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.9b00879.
[108] M.C.O. Monteiro, M.T.M. Koper, Measuring local pH in electrochemistry, Current Opinion in Electrochemistry. 25 (2021) 100649. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.100649.
[109] K. Fujita, N. Nakamura, H. Ohno, B.S. Leigh, K. Niki, H.B. Gray, J.H. Richards, Mimicking Protein−Protein Electron Transfer: Voltammetry of Pseudomonas aeruginosa Azurin and the Thermus thermophilus CuA Domain at ω-Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 13954–13961. https://doi.org/10.1021/ja047875o.
[110] S. Monari, G. Battistuzzi, C.A. Bortolotti, S. Yanagisawa, K. Sato, C. Li, I. Salard, D. Kostrz, M. Borsari, A. Ranieri, C. Dennison, M. Sola, Understanding the Mechanism of Short-Range Electron Transfer Using an Immobilized Cupredoxin, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 11848–11851. https://doi.org/10.1021/ja303425b.
[111] L.J.C. Jeuken, J.P. McEvoy, F.A. Armstrong, 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. 106 (2002) 2304–2313. https://doi.org/10.1021/jp0134291.
[112] L.J.C. Jeuken, Conformational reorganisation in interfacial protein electron transfer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1604 (2003) 67–76. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00026-4.
[113] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, M. Shushanyan, K.L. Davis, D.H. Waldeck, R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, PNAS. 107 (2010) 2757–2762. https://doi.org/10.1073/pnas.0910837107.
[114] O. Farver, N.M. Marshall, S. Wherland, Y. Lu, I. Pecht, Designed azurins show lower reorganization free energies for intraprotein electron transfer, PNAS. 110 (2013) 10536–10540. https://doi.org/10.1073/pnas.1215081110.
[115] E.I. Solomon, D.E. Heppner, E.M. Johnston, J.W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, R.G. Hadt, L. Tian, Copper Active Sites in Biology, Chem. Rev. 114 (2014) 3659–3853. https://doi.org/10.1021/cr400327t.
[116] B.G. Karlsson, R. Aasa, B.G. Malmström, L.G. Lundberg, Rack-induced bonding in blue copper proteins: Spectroscopic properties and reduction potential of the azurin mutant Met-121 → Leu, FEBS Letters. 253 (1989) 99–102. https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80938-X.
[117] B.G. Malmström, Rack-induced bonding in blue-copper proteins, in: P. Christen, E. Hofmann (Eds.), EJB Reviews 1994, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1995: pp. 157–164. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79502-2_12.
[118] A. Messerschmidt, L. Prade, S.J. Kroes, J. Sanders–Loehr, R. Huber, G.W. Canters, Rack-induced metal binding vs. flexibility: Met121His azurin crystal structures at different pH, PNAS. 95 (1998) 3443–3448. https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3443.
[119] R.L. Lieberman, D.M. Arciero, A.B. Hooper, A.C. Rosenzweig, Crystal Structure of a Novel Red Copper Protein from Nitrosomonas europaea, Biochemistry. 40 (2001) 5674–5681. https://doi.org/10.1021/bi0102611.
[120] B.G. Karlsson, M. Nordling, T. Pascher, L.-C. Tsai, L. Sjölin, L.G. Lundberg, Cassette mutagenesis of Met121 in azurin from Pseudomonas aeruginosa, Protein Engineering, Design and Selection. 4 (1991) 343–349. https://doi.org/10.1093/protein/4.3.343.

[121] R.W. Strange, L. Murphy, B.G. Karlsson, P.F. Lindley, L.G. Lundberg, B. Reinhammar, S.S. Hasnain, Crystallization and preliminary crystallographic data for the azurin mutant End-121 from Pseudomonas aeruginosa, Acta Cryst D. 50 (1994) 37–39. https://doi.org/10.1107/S0907444993008509.
[122] K.J. Koebke, V.L. Pecoraro, Development of de Novo Copper Nitrite Reductases: Where We Are and Where We Need To Go, ACS Catal. 8 (2018) 8046–8057. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b02153.
[123] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods. Fundamentals and Applications, second edition, John Wiley & Sons, Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin, n.d.
[124] C.S.S. CLAIR, H.B. GRAY, J.S. VALENTINE, Spectroelectrochemistry of copper-zinc superoxide dismutase, Inorg. Chem. (Print). 31 (1992) 925–927. https://doi.org/10.1021/ic00031a041.
[125] M. Borsari, H.A. Azab, Voltammetric behaviour of bovine erythrocyte superoxide dismutase, Journal of Electroanalytical Chemistry. 342 (1992) 229–233. https://doi.org/10.1016/0022-0728(92)85053-6.
[126] H.A. AZAB, L. BANCI, M. BORSARI, C. LUCHINAT, M. SOLA, M.S. VIEZZOLI, Redox chemistry of superoxide dismutase. Cyclic voltammetry of wild-type enzymes and mutants on functionally relevant residues, Inorg. Chem. (Print). 31 (1992) 4649–4655. https://doi.org/10.1021/ic00048a037.
[127] X. Wu, X. Meng, Z. Wang, Z. Zhang, Study on the direct electron transfer process of superoxide dismutase at cysteine modified gold electrodes, Chem. Lett. 28 (1999) 1271–1272. https://doi.org/10.1246/cl.1999.1271.
[128] B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, Electrochemistry of immobilized CuZnSOD and FeSOD and their interaction with superoxide radicals, Biosensors and Bioelectronics. 18 (2003) 295–302. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00174-4.
[129] Y. Tian, L. Mao, T. Okajima, T. Ohsaka, Electrochemistry and Electrocatalytic Activities of Superoxide Dismutases at Gold Electrodes Modified with a Self-Assembled Monolayer, Anal. Chem. 76 (2004) 4162–4168. https://doi.org/10.1021/ac049707k.
[130] Y. Tian, M. Shioda, S. Kasahara, T. Okajima, L. Mao, T. Hisabori, T. Ohsaka, A facilitated electron transfer of copper–zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1569 (2002) 151–158. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00246-X.
[131] T. Den Blaauwen, G.W. Canters, Creation of type-1 and type-2 copper sites by addition of exogenous ligands to the Pseudomonas aeruginosa azurin His117Gly mutant, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 1121–1129. https://doi.org/10.1021/ja00056a042.
[132] T. den Blaauwen, C.W.G. Hoitink, G.W. Canters, J. Han, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, Resonance Raman spectroscopy of the azurin His117Gly mutant. Interconversion of type 1 and type 2 copper sites through exogenous ligands, Biochemistry. 32 (1993) 12455–12464. https://doi.org/10.1021/bi00097a025.
[133] G. van Pouderoyen, C.R. Andrew, T.M. Loehr, J. Sanders-Loehr, S. Mazumdar, H.A.O. Hill, G.W. Canters, Spectroscopic and Mechanistic Studies of Type-1 and Type-2 Copper Sites in Pseudomonas aeruginosa Azurin As Obtained by Addition of External Ligands to Mutant His46Gly, Biochemistry. 35 (1996) 1397–1407. https://doi.org/10.1021/bi951604w.
[134] P. Rahimi, H. Ghourchian, H.-A. Rafiee-Pour, Superoxide radical biosensor based on a nano-composite containing cytochrome c, Analyst. 136 (2011) 3803–3808. https://doi.org/10.1039/C1AN15380C.
[135] H. Sun, Direct electrochemical and electrocatalytic properties of heme protein immobilized on ionic liquid-clay-nanoparticle-composite films, J Porous Mater. 13 (2006) 393–397. https://doi.org/10.1007/s10934-006-8036-z.
[136] K. Fujita, K. Murata, M. Masuda, N. Nakamura, H. Ohno, Ionic liquids designed for advanced applications in bioelectrochemistry, RSC Advances. 2 (2012) 4018–4030. https://doi.org/10.1039/C2RA01045C.
[137] P. Hosseinzadeh, S. Tian, N.M. Marshall, J. Hemp, T. Mullen, M.J. Nilges, Y.-G. Gao, H. Robinson, D.A. Stahl, R.B. Gennis, Y. Lu, A Purple Cupredoxin from Nitrosopumilus maritimus Containing a Mononuclear Type 1 Copper Center with an Open Binding Site, J. Am. Chem. Soc. 138 (2016) 6324–6327. https://doi.org/10.1021/jacs.5b13128.

[138] C.E. Slutter, D. Sanders, P. Wittung, B.G. Malmström, R. Aasa, J.H. Richards, H.B. Gray, J.A. Fee, Water-Soluble, Recombinant CuA-Domain of the Cytochrome ba3 Subunit II from Thermus thermophilus, Biochemistry. 35 (1996) 3387–3395. https://doi.org/10.1021/bi9525839.
[139] K.D. Karlin, J.K. Yandell, Redox behavior of blue copper model complexes. Redox potentials and electron-transfer kinetics of some copper(II)-copper(I) complexes with nitrogen and thioether donors, Inorg. Chem. 23 (1984) 1184–1188. https://doi.org/10.1021/ic00177a003.
[140] P. Comba, V. Müller, R. Remenyi, Interpretation of the temperature-dependent color of blue copper protein mutants, Journal of Inorganic Biochemistry. 98 (2004) 896–902. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.12.004.
[141] K. Pierloot, J.O.A. De Kerpel, U. Ryde, M.H.M. Olsson, B.O. Roos, Relation between the Structure and Spectroscopic Properties of Blue Copper Proteins, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 13156–13166. https://doi.org/10.1021/ja982385f.
[142] S. Ghosh, X. Xie, A. Dey, Y. Sun, C.P. Scholes, E.I. Solomon, Thermodynamic equilibrium between blue and green copper sites and the role of the protein in controlling function, PNAS. 106 (2009) 4969–4974. https://doi.org/10.1073/pnas.0900995106.
[143] P. Hosseinzadeh, N.M. Marshall, K.N. Chacón, Y. Yu, M.J. Nilges, S.Y. New, S.A. Tashkov, N.J. Blackburn, Y. Lu, Design of a single protein that spans the entire 2-V range of physiological redox potentials, PNAS. 113 (2016) 262–267. https://doi.org/10.1073/pnas.1515897112.
[144] M.C. Machczynski, H.B. Gray, J.H. Richards, An outer-sphere hydrogen-bond network constrains copper coordination in blue proteins, Journal of Inorganic Biochemistry. 88 (2002) 375–380. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00364-1.

Capítulo 4

Metaloproteínas artificiales conteniendo sitios de Cu_A.

4.1- Introducción

4.1.1- El sitio de Cu_A en la naturaleza

La citrocromo *c* oxidasa (CcO) es el último complejo proteico en la cadena respiratoria mitocondrial y bacteriana, donde su rol es el de mediar la transferencia electrónica entre el citocromo c y una molécula de oxígeno, acoplando el flujo de electrones con un bombeo protónico activo.[1] Es así que la energía libre del proceso de TE es utilizada para generar una diferencia de potencial electroquímico transmembrana de protones. Este gradiente de protones se disipa a través de complejos enzimáticos permitiendo la formación de un enlace fosfato-fosfato de alta energía en la molécula de ATP. Este es esencialmente el postulado de la teoría quimiosmótica enunciada por Dr. Mitchell que se encuentra en el corazón del funcionamiento celular.[2–4]

La CcO pertenece a la familia de las oxígeno-reductasas de hemo/Cu (HCO) que se encuentra presente en los tres dominios de la vida Bacteria, Arquea y Eucaria. Si bien aún existe cierto debate sobre su clasificación[5,6] estudios basados en análisis filogenéticos sugieren que esta familia puede clasificarse en 3 tipos: Tipo A (a su vez dividido en A1 y A2), Tipo B y Tipo C, Figura 1.[7] Esta clasificación se encuentra principalmente guiada por las similitudes de los canales protónicos, residuos coordinantes en los sitios metálicos y residuos catalíticos específicos de la subunidad 1. Este es un grupo de proteínas transmembrana que presentan varios centros metálicos en su matriz encargados de llevar a cabo distintos pasos de TE intraproteica, transportando los electrones desde el citocromo *c* hasta el aceptor final de electrones. Reciben su nombre por presentar en una de sus subunidades, un grupo hemo de bajo espín, y un sitio bimetálico catalítico formado por un hemo de alto espín y un átomo de cobre (llamado Cu_B).[7–11] Todas las HCO poseen una segunda subunidad proteica, la subunidad 2, la que en los subgrupos de Tipo A y B contiene un sitio binuclear de cobre, sitio de Cu_A, mientras que por otro lado, en las de Tipo C, este centro metálico se encuentra ausente y en su lugar poseen una tercera subunidad conteniendo grupos hemo extra, ver Figura 1. Esta gran diferencia permitió que el dador de electrones sea el citocromo *c* en las de Tipo A y B, formando el subgrupo de las Citocromo *c* oxidasas, o alternativamente, sea una molécula de quinol en las de tipo C, originando el subgrupo de las quinol oxidasas. Un cuarto grupo de

proteínas que se encuentra íntimamente relacionado a las HCO es el de las óxido nítrico reductasas (NOR). Este grupo, como su nombre los indica, es capaz de reducir dos moléculas de óxido nítrico y originar una molécula de agua y de óxido nitroso como productos, en una reacción que consume dos electrones y que no se encuentra asociada a ningún tipo de bombeo protónico pese a su inherente similitud estructural en la subunidad 1.[12]

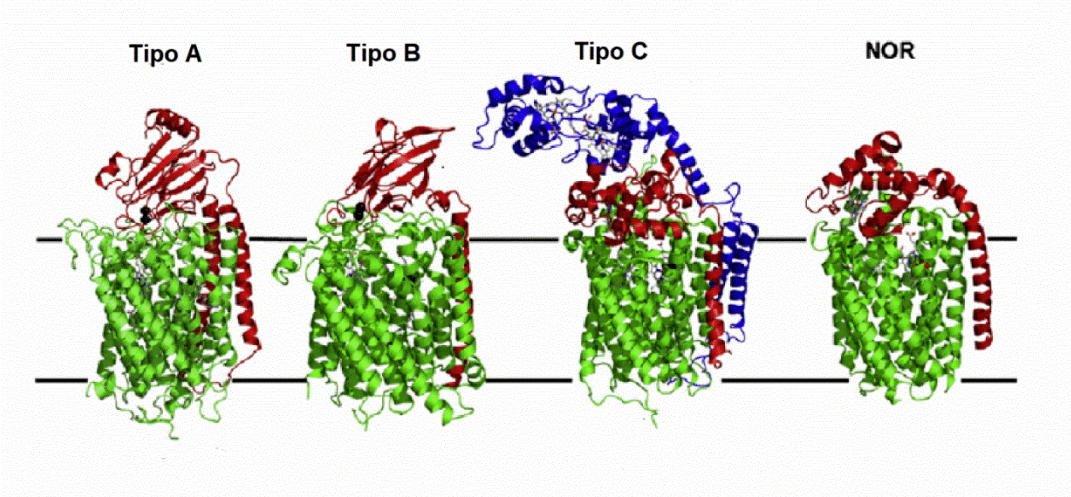


Figura 1: *(Figura adaptada de Sousa et al. 2012*[10]*) Representación de la estructura cristalográfica de los tres tipos de HCO, y de la NOR que es una proteína íntimamente relacionada. En verde la subunidad 1 (catalítica), en rojo la subunidad 2 (los tipos A y B contienen sitios de Cu_A) y en azul la unidad extra de la quinol oxidasa.*

Si bien existe una gran variedad de CcO que contienen sitios de Cu_A en sus estructuras, en esta tesis se prestara especial atención al sitio de Cu_A de la CcO de una eubacteria extremófila gram negativa llamada *Thermus thermophilus*. Este organismo posee dos CcO, la *caa*$_3$-CcO y la *ba*$_3$-CcO[13]. Las CcO se nombran según el tipo de grupos hemo que contengan.[14,15] La *caa*$_3$-CcO es una HCO de Tipo A2 que tiene la peculiaridad de tener un dominio de citocromo *c* unido covalentemente a la subunidad 2 de CcO[16–19], ver Figura 2. Estos dominios aparecen como genes fusionados en el genoma y dan lugar a una estructura conformada por tres subunidades, donde dos de ellas son producto de fusión de dos subunidades de menor tamaño, denominadas sub I/III, producto de la fusión de las subunidades I y III, y la sub IIc, producto de la fusión de la subunidad II y el citocromo *c*. Mientras que una tercera subunidad, sub IV, termina el diseño aportando dos hélices de anclaje transmembrana[20]. Por otro lado, la *ba*$_3$-CcO es una HCO de Tipo B con una estructura más simple que aquella de la *caa*$_3$-CcO, ya que carece de la subunidad 3, tiene una subunidad 2 más pequeña y una subunidad 1 más grande, así como también carece del dominio de citocromo *c* extra que caracteriza a la *caa*$_3$-CcO, ver Figura 3.[21–24] Sin embargo, presenta una tercera subunidad, la subunidad 2-A, la que presenta un dominio transmembrana extra.[25] En el caso de la *ba*$_3$-CcO la subunidad 2 contiene un sitio definido de unión al citocromo c soluble. Este sitio contiene una zona de residuos hidrofóbicos conservados, principalmente fenilalaninas, que intervienen no solo en la unión a su dador de electrones natural, el citocromo c_{552} (cit-c_{552}),

sino que también se ven involucrados en el camino o *pathway* electrónico que conecta el hemo c del cit-c_{552} con el sitio de Cu_A en la CcO[25–29]. Si bien existe evidencia que indica la existencia de algunos contactos electrostáticos adicionales, en ciertas CcO como en la *aa*$_3$-CcO de *Paracoccus denitrificans*[30], la interacción cit-c_{552}/*ba*$_3$-CcO es esencialmente hidrofóbica, en fuerte contraste con su análogo eucariota donde esta interacción es principalmente electrostática[20,23].

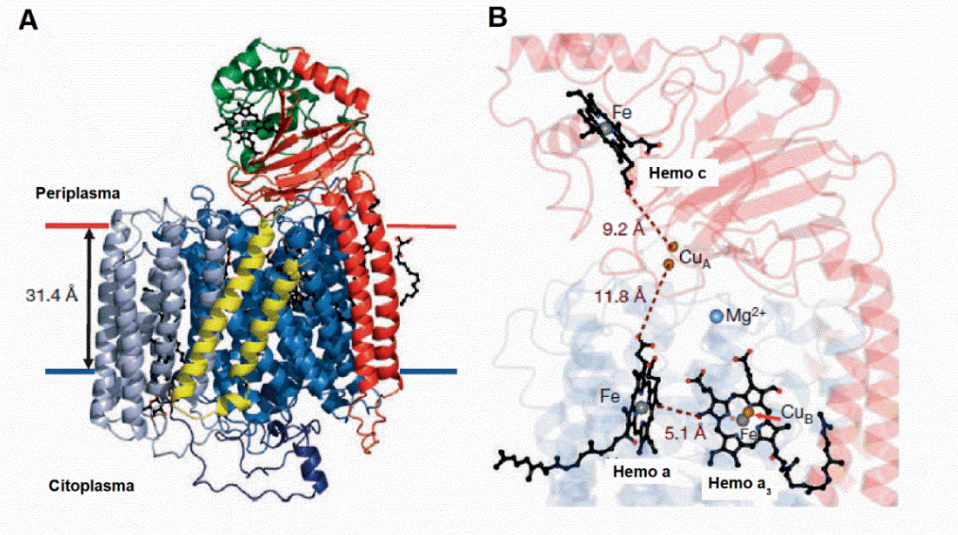


Figura 2: *(Figura adaptada de Lyons et al. 2012*[20]*)* ***A.*** *Representación de la estructura de la CcO caa*$_3$ *(PDB 2YEV) de Thermus thermophilus HB8, se indican en distintos colores las diferentes subunidades, en particular, se indican en verde el dominio de citocromo c unido covalentemente a la subunidad 2, que contiene el sitio de* Cu_A*.* ***B.*** *Detalle de los diferentes centros metálicos presentes en ella. Se indica adicionalmente la distancia entre ellos en Å.*

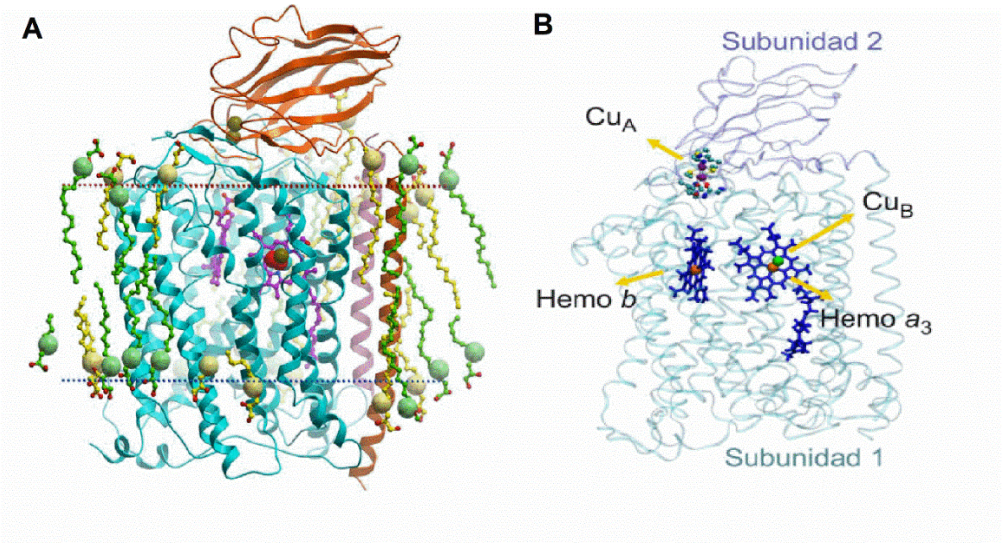


Figura 3: *(Figura adaptada de Tiefenbrunn et al. 2011*[22]*)* ***A.*** *Representación de la estructura de la CcO ba*$_3$ *(PDB 3S8G) de Thermus thermophilus, se indica en rojo la subunidad 2, que contiene el sitio de* Cu_A*, en celeste la subunidad 1 transmembrana, en purpura los grupos hemo y en verde y amarillo moléculas lipídicas co-cristalizadas.* ***B.*** *Detalle de los diferentes centros metálicos presentes en ella.*

La subunidad 2 de la *ba*$_3$-CcO está conformada por un dominio expuesto a la cara periplásmica cuya dimensiones son 35 x 29 x 20 Å conformado principalmente por 8 hojas-β antiparalelas originando una estructura de β-sandwich, es decir, dos hojas-β que se cierran sobre sí mismas, Figura 4, y un segundo dominio que lo ancla a la membrana conformado por una hélice-α, Figura-3[22,24,25]. El β-sandwich que contiene el sitio binuclear de Cu_A representa el plegamiento típico de las cupredoxinas[31] comentado en capítulos anteriores, donde los centros de cobre se encuentran ubicados en los bucles que unen dos hebras-β consecutivas. En particular, el sitio de Cu_A está rodeado por tres de estos bucles, y el bucle entre los residuos 148-161 contiene cinco de los seis residuos coordinantes que dan origen al centro metálico. El sitio de Cu_A se organiza gracias a un motivo aminoacídico conservado[32] a lo largo de diferentes organismos: H-X_{34}-C-X_3-C-X_3-H-X_2-M, donde gran parte de esta secuencia conservada se encuentra sobre el bucle 148-161.

A lo largo de este capítulo se estudiará un fragmento soluble de la subunidad II que contiene el β-sandwich con el sitio de Cu_A (dominio de Cu_A) valiéndonos de la estructura intrínseca del sitio metálico para la generación de variantes mutagénicas que introduzcan distinto grado de distorsiones geométricas alrededor de los átomos de cobre. En particular se empleará la estrategia de intercambio de bucles,[33,34] en la cual las secuencias que conforman los tres bucles que rodean el centro de Cu_A serán reemplazados por secuencias análogas pertenecientes a otros organismos, generando un conjunto de proteínas quimeras donde se preserve un sitio binuclear de Cu_A perfectamente funcional.[35]

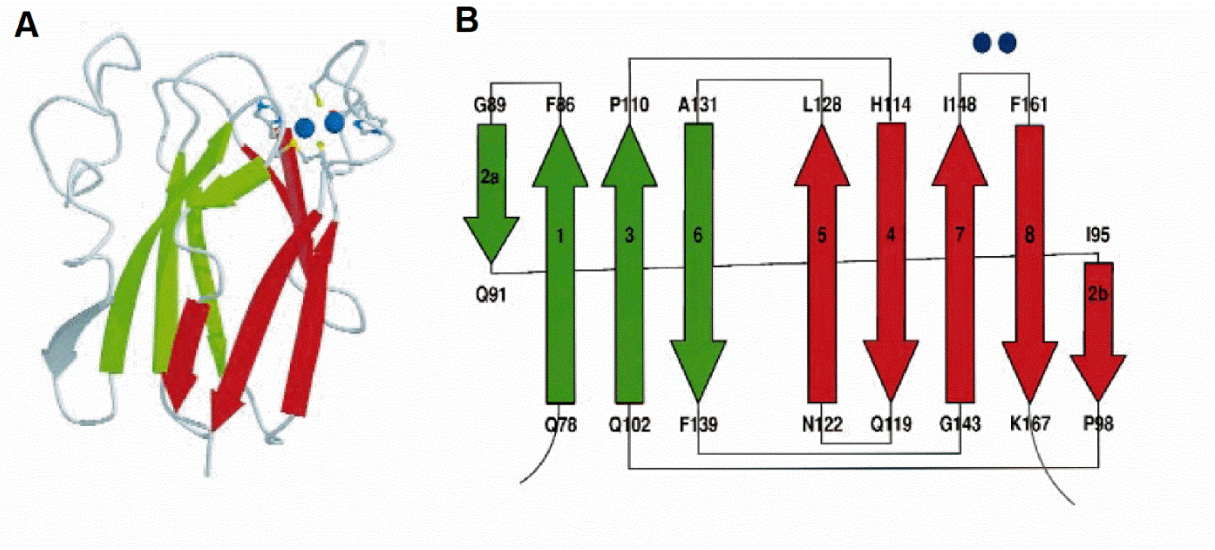


Figura-4: *(Figura adaptada de Williams et al. 1999*[24]*) A. Representación de un fragmento soluble de la subunidad 2 de la ba*$_3$*-CcO de Thermus thermophilus indicando en color verde y rojo la estructura de β-sandwich, y el sitio de* Cu_A*. B. Diagrama de la topología de la estructura del β-sandwich numerando residuos frontera de cada hebra-β y ubicando el sitio de* Cu_A*. Notar la hebra-β2 que se parte en dos, entre residuos 91-95, y permite el giro de la hoja-β sobre si misma.*

Además de ser un sitio metálico clave en las CcO, el sitio de Cu_A, también puede darse en otro tipo de enzimas como las N_2O reductasas (N_2OR).[36,37] Estas enzimas son esenciales para el proceso de desnitrificación, llevando a cabo la conversión de una molécula de óxido nitroso, en una de nitrógeno molecular y agua.[38] Un aspecto interesante de estas enzimas es la presencia de un segundo sitio de cobre, el sitio de Cu_Z, el que está constituido por cuatro átomos de cobre coordinados en un arreglo tetraédrico alrededor de un sulfuro central, donde un total de siete histidinas y tres ligandos exógenos, presuntamente moléculas de agua, completan la coordinación de los átomos de cobre.[39–42] Aunque existe evidencia de que un segundo grupo sulfuro podría estar presente en el sitio.[43] Este sitio sería el encargado de llevar a cabo la reducción del N_2O a N_2,[44] mientras que el sitio de Cu_A media la TE entre el dador de electrones, que puede ser un citocromo *c* o una molécula de pseudoazurina[45–48], y el sitio de Cu_Z catalítico. La N_2OR presenta una estructura homodimérica donde cada monómero posee dos dominios. El sitio de Cu_Z se encuentra hacia el extremo N terminal, donde el polipéptido adopta una estructura de barril-β con forma de aspas de turbina, mientras que el sitio de Cu_A se encuentra a unos 40 Å de distancia hacia el extremo C terminal donde el dominio adopta un plegamiento tipo cupredoxina. Al formarse el dímero el sitio de Cu_A de un monómero queda a 10 Å del sitio de Cu_Z del monómero adyacente, aumentando el acoplamiento electrónico entre ambos sitios metálicos de manera que la TE termina siendo inter-monómeros, Figura-5.

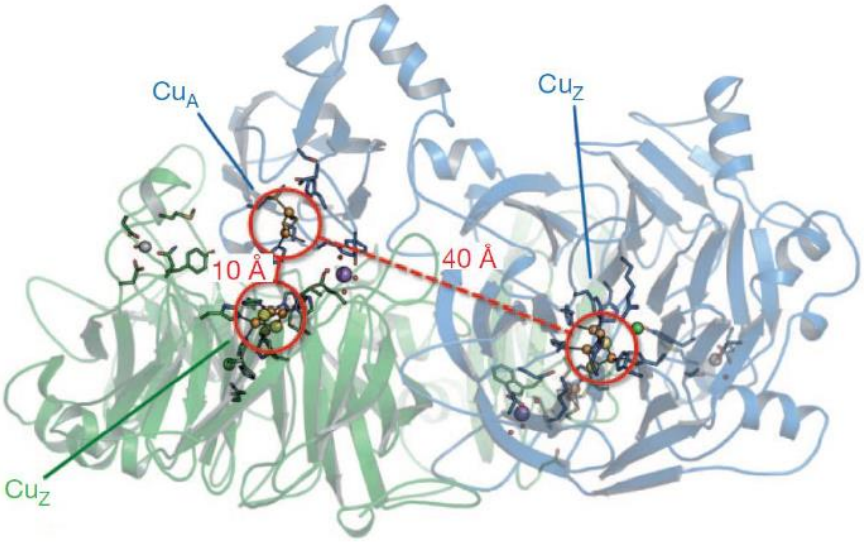


Figura-5: *(Figura adaptada de Pomoski et al.2011*[43]*) Representación de un homodímero de N_2O reductasa de Pseudomonas stutzeri. Ambos monómeros se encuentran coloreados de azul y verdes. Se presenta un detalle de los sitios activos de Cu_A y Cu_Z y las distancias entre ellos.*

Recientemente se ha descubierto en un grupo de bacterias capaces de extraer energía a partir de la oxidación de metano y amonio la existencia de un sitio de Cu_A atípico.[49] Este sitio novedoso se encuentra en un grupo de proteínas codificadas en el mismo operón que otras proteínas involucradas en la bioquímica del metano que son dependientes de cobre. Un operón

es una estructura génica de expresión conjunta típica de organismos procariotas[50]. Lo llamativo de este caso es que el sitio no se encuentra en una estructura proteica conformada por un único polipéptido, sino que se genera en la interfaz de un homodímero de una proteica llamada *PmoD*, Figura 6. Más aún, el motivo conservado en este caso es el siguiente: C-X_7-M-X-H, y se encuentra duplicado en el sitio, lo que da lugar al primer centro de Cu_A simétrico, es decir con igual tipo de ligandos en ambos átomos de cobre, en particular presentando un ligando metionina sobre cada átomo de cobre.

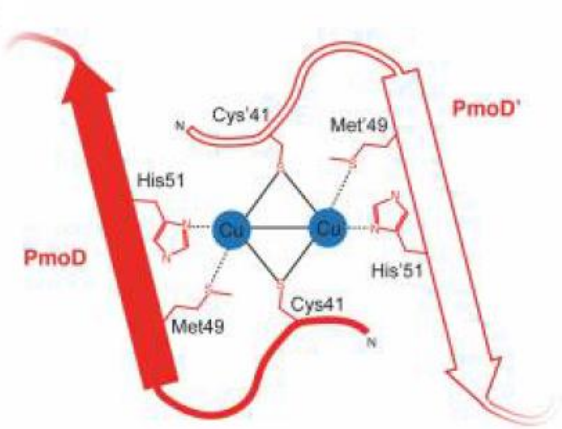


Figura-6: *(Figura adaptada de Ross et al. 2019*[24]*) Representación del sitio de Cu_A del domino periplásmico de la PmoD de Methylocystis sp. Puede observarse la formación del sitio de Cu_A en la interfaz del homodímero, y la simetría sin precedente de los ligandos de los átomos de cobre.*

4.1.2- Estructura electrónica del sitio de Cu_A

Si bien a lo largo de los años la naturaleza de este sitio fue objeto de controversia y debate,[32,51–55] hoy en día se cuenta con varias estructuras cristalográficas que demuestran en detalle la estructura del sitio, y una batería de estudios espectroscópicos y teóricos que permiten entender en profundidad ciertos detalles sobre la estructura electrónica del sitio.[20,22,24,25,30,56–59]. El sitio de Cu_A es el primer sitio metálico en la naturaleza donde dos átomos de cobre presentan un enlace covalente entre sí.[60,61] Se encuentran además coordinados ecuatorialmente por dos histidinas y uno de los átomos de cobre por una metionina mientras que el otro por un carbonilo amídico de un residuo cuya identidad puede ser variable.[35,49,62] Axialmente ambos cobres se encuentran puenteados por dos sulfuros cisteínicos, uno por arriba y otro por debajo del plano formado por los átomos de cobre y los residuos ecuatoriales. De este modo, ambos átomos de cobre quedan en un arreglo cuasi-tetraédrico, con una distancia Cu-Cu de alrededor de 2,5 Å que permite un enlace entre los átomos metálicos, Figura-7. El hecho de que el conjunto de residuos coordinantes esté totalmente conservado señala la importancia de los mismos en mantener y determinar las propiedades estructurales y funcionales del sitio.

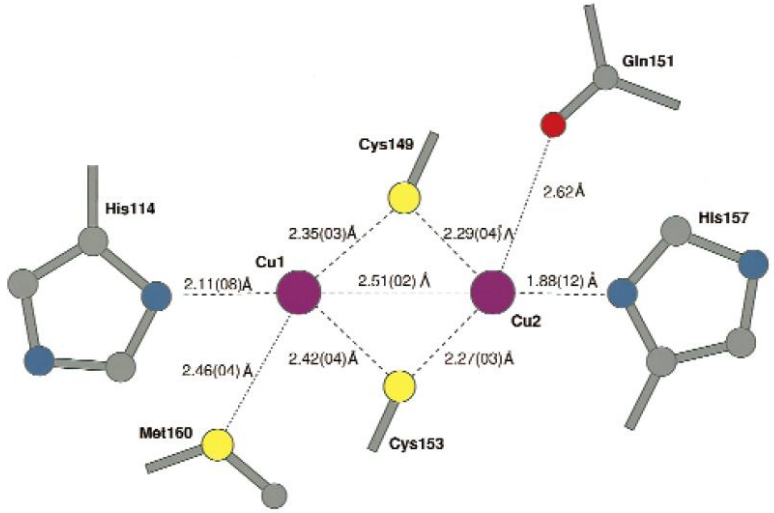


Figura 7: *(Figura adaptada de Williams et al. 1999*[24]*) Sitio de Cu_A de Thermus thermophilus indicando cadenas laterales de residuos coordinantes y distancias de enlace cristalográficas.*

En sus inicios el estudio de estos centros metálicos involucró un esfuerzo conjunto desde la bioquímica como desde la bioinorgánica, donde el estudio de sistemas biológicos, de los que no se contaba con conocimiento estructural, se veía complementado con el estudio de complejos inorgánicos. El estudio de una diversidad de complejos inorgánicos que presentaban un centro binuclear de cobre que lograban reproducir en cierta medida aspectos espectroscópicos de los sitios nativos permitió entender aspectos importantes.[63–72] Sin embargo, la necesidad de contar con un modelo robusto y estable de un sitio de Cu_A en un entorno proteico, llevo a la generación de sistemas quiméricos donde mediante ingeniería de bucles se logró reconstruir un sitio funcional de Cu_A en una matriz proteica foránea. El primer ejemplo lo constituye la reconstrucción de un sitio de Cu_A en un domino soluble de la subunidad 2 de la quinol oxidasa de *Escherichia coli*, recordemos que este tipo de enzimas no posee naturalmente un sitio de Cu_A, ver sección anterior. En este caso sencillamente se introdujeron mediante mutación puntual los residuos conservados necesarios para que el sitio se ensamble.[73,74] Más tarde la estrategia de reemplazo de bucles permitió introducir sitios bimetálicos de Cu_A en matrices que normalmente albergaban sitio de cobre de T1.[75–77] Es así que se reportaron dos tipos de quimeras, Cu_A-Ami y Cu_A-Azu, donde el sitio de Cu_A fue introducido en las matrices de amicianina y azurina, respectivamente. Estos sistemas presentaron la ventaja de ser sistemas más estables que muchas variantes nativas y permitieron realizar una batería de estudios tanto espectroscópicos como teóricos. Posteriormente se logró expresar un dominio soluble que contenía sitio de Cu_A en su matriz proteica original, permitiendo extender los estudios a un modelo nativo robusto.[62] Recientemente se reportó que fue posible introducir este tipo de centros metálicos en matrices proteicas diferentes de las cupredoxinas, íntegramente compuestas por estructuras secundarias de α-hélices tanto naturales[78] como artificiales[79], que retienen características distintivas de estos centros metálicos.

En el estado oxidado el sitio de Cu_A presenta una valencia mixta (VM) de clase III, donde la carga formal de ambos átomos de cobre se puede representar de la siguiente manera $Cu^{+1,5}$-

$Cu^{+1,5}$.[80–82] Diferentes estudios llevaron a determinar que el sitio de Cu_A en un entorno proteico presenta un estado fundamental de tipo "*sigma*" y un primer estado excitado de tipo "*pi*". Si bien la terminología sigma o pi se emplea típicamente para describir el modo de solapamiento orbital en distintas teorías, en este caso se utilizan para identificar a los dos estados electrónicos del sitio redox, en los que la simetría de sus orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) es de uno u otro tipo, σ_u^* o π_u, ver Figura 8.[80,83–85]

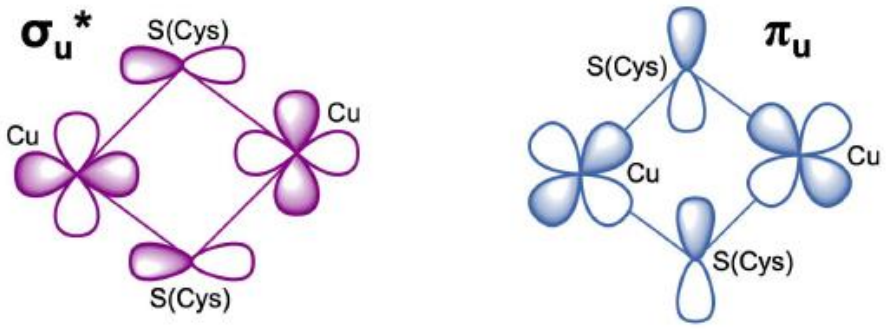


Figura 8: *(Figura adaptada de Ross et al. 2019*[49]*) Esquema del solapamiento orbital entre los orbitales d de los átomos de cobre y los orbitales p de los sulfuros coordinantes, mostrando la diferencia que da lugar a los dos estados electrónicos presentes en el sitio de Cu_A, conocidos como estados σ_u^* y π_u.*

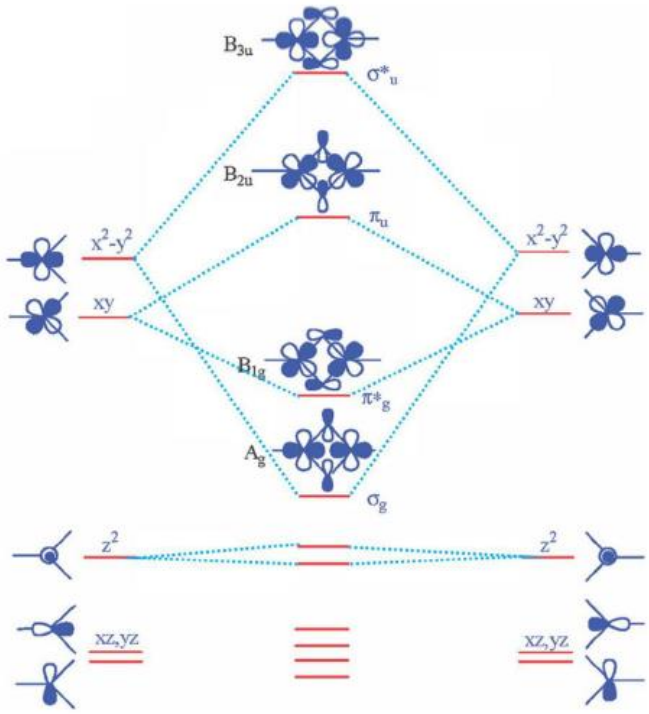


Figura 9: *(Figura adaptada de Xie et al. 2008*[84]*) Diagrama de OM simplificado para un diamante Cu_2S_2 plano. Se muestra el acoplamiento entre dos monómeros $NCuS_2$ C_{2v} con su HOMO de simetría σ_u^*.*

En la Figura 9 se presenta el diagrama de OM completo para el fragmento del diamante Cu_2S_2 del sitio de Cu_A de la quimera Cu_A-Azu, donde se puede observar que el estado

fundamental es de tipo σ_u^*.[84] El reordenamiento en el estado excitado hace que el diagrama modifique su ordenamiento general, y en particular el orbital π_u que se encontraba inmediatamente por debajo en energía del orbital σ_u^*, lo supere en energía, constituyendo el HOMO de este nuevo estado electrónico. A partir del estudio de complejos bioinorgánicos, se llegó a la conclusión de que en esos complejos el HOMO del estado fundamental presentaba un solapamiento orbital de tipo π_u, preservando la VM, pero con una distancia Cu-Cu del orden de los 3 Å,[66,67] mayor que en sistemas biológicos, donde se determinó una distancia del orden de 2,4-2,5 Å.[61,86] Esto no solo señaló que el estado fundamental en esos sitios presentaba la misma simetría que el estado excitado electrónico en los sitios en entornos proteicos, sino que la distancia Cu-Cu era un factor clave de la simetría del solapamiento orbital, lo que fue verificado posteriormente mediante cálculos computacionales, ver Figura 10.[80,83,87]

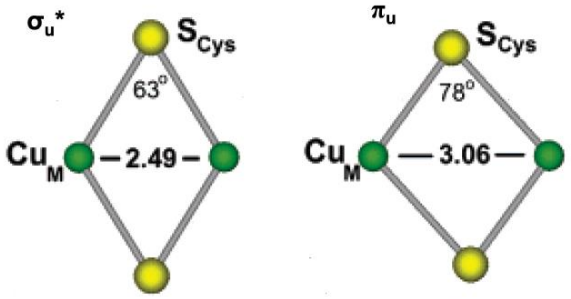


Figura 10: *(Figura adaptada de Gorelsky et al. 2006*[83]*) Esquema simplificado del diamante Cu_2S_2 para los estados σ_u^* y π_u obtenidos mediante optimizaciones DFT de las estructuras del sitio de Cu_A, sin entorno proteico.*

Este escenario en el que la fuerza del campo de ligados y la distancia Cu-Cu determinan cual es la simetría del HOMO fue aceptado por la comunidad científica con relativa rapidez, aun cuando existían observaciones experimentales que no terminaban de encontrar explicación en esta visión. En particular existía una inconsistencia en los valores de la diferencia de energía entre los estados σ_u^* y π_u ($\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$) determinados por dos técnicas espectroscópicas diferentes, EPR y RMN. A partir de experimentos de EPR se estimaron valores del orden de 3000-4500 cm^{-1},[80,88] mientras que, por otro lado, experimentos de RMN paramagnético indicaban que el estado π_u era térmicamente accesible encontrándose solo alrededor de 350-600 cm^{-1} por encima del estado fundamental σ_u^*.[89,90] Esta discrepancia fue resuelta de un modo muy ingenioso, obteniendo mediante cálculos TD-DFT la superficie de energía potencial (SEP) para el sitio de Cu_A en función de la distancia Cu-Cu. Estos cálculos revelaron que existe un fuerte acoplamiento electrónico entre los estados σ_u^* y π_u, los cuales a su vez dependen fuertemente de la distancia Cu-Cu, ver Figura 11.[83] Los estados σ_u^* y π_u forman entonces una superficie adiabática con dos mínimos, caracterizados por dos geometrías distintas, donde ahora estos corresponden a dos estados electrónicos fundamentales del estado oxidado. Este nuevo escenario concilia las discrepancias espectroscópicas, el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ obtenido a partir de experimentos de RMN corresponde con una transición adiabática, es decir sin abandonar la

SEP, entre los estados σ_u^* y π_u fundamentales. Por otro lado, los valores obtenidos a partir de experimentos de EPR corresponden con una transición vertical, donde se llega a un estado π_u en la SEP excitada, donde se mantiene la distancia Cu-Cu del estado σ_u^*.

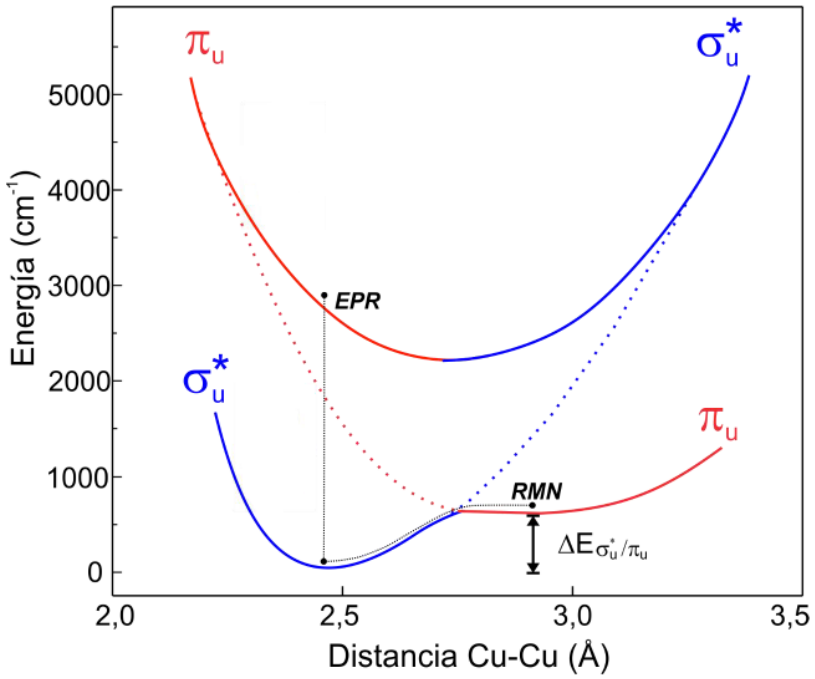


Figura 11: *(Figura adaptada de Alvarez-Paggi et al. 2014*[91]*) Esquema de la SEP del sitio de Cu_A empleando como coordenada la distancia entre los átomos de cobre para el estado fundamental y el primer estado electrónicamente excitado del estado oxidado. Las Líneas punteadas indican las transiciones vertical y horizontal (o adiabática) obtenidas mediante EPR y RMN, respectivamente.*

4.1.3- Algunos antecedentes del grupo

En nuestro laboratorio se estudió intensamente un fragmento soluble de la CcO de *Thermus thermophilus* que presenta un sitio de Cu_A en su estructura nativa. Al provenir de un organismo termófilo este dominio presenta gran estabilidad y permitió que se apliquen una gran gama de técnicas experimentales. Este sistema se generó mediante la eliminación de alrededor de 32 residuos que conformaban el dominio hidrofóbico transmembrana, dando como resultado una proteína de 136 aminoácidos con un peso de aproximadamente 15 KDa.[62]

Se estimaron los espectros de absorción electrónica de los estados σ_u^* y π_u mediante cálculos TD-DFT a partir de la estructura cristalina del sitio de Cu_A de *Thermus thermophilus*, tanto del sitio silvestre como de una mutante puntual donde se reemplazó la metionina axial por una histidina, llamada M160H, ver Figura 12.[92] Estos cálculos permitieron identificar aspectos espectrales distintivos de ambos estados, verificando para el estado π_u un fuerte

corrimiento de las bandas principales de TCLM S_{cis} → Cu hacia el violeta y un corrimiento menos pronunciado hacia el rojo de la banda de intervalencia $\Psi \rightarrow \Psi^*$. Esto permitió entender los cambios espectrales observados en distintas mutantes puntuales[92–94], así como en variantes quiméricas de este centro.[35] Específicamente, de la quimera *Tt*-3L-*Hs*, variante en la que la secuencia de los tres bucles que conforman el sitio de Cu_A fue intercambiada por su análogo eucariota, ver Figura 13 y Tabla 1 más adelante. Las mutantes M160H y *Tt*-3L-*Hs* presentaron una fuerte intensificación de la banda en torno a los 357 nm, lo cual indica que la población en el estado π_u se ha incrementado. Sus espectros corresponderán entonces a una mezcla de poblaciones de los sitios de Cu_A en los estados σ_u^* y π_u. Dado que en el Cu_A nativo solo una fracción muy minoritaria cuenta con la energía suficiente para superar el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y acceder al estado π_u, todo esto llevo a pensar que quizás la diferencia de energía entre ambos estados, el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, habría cambiado en las mutantes.

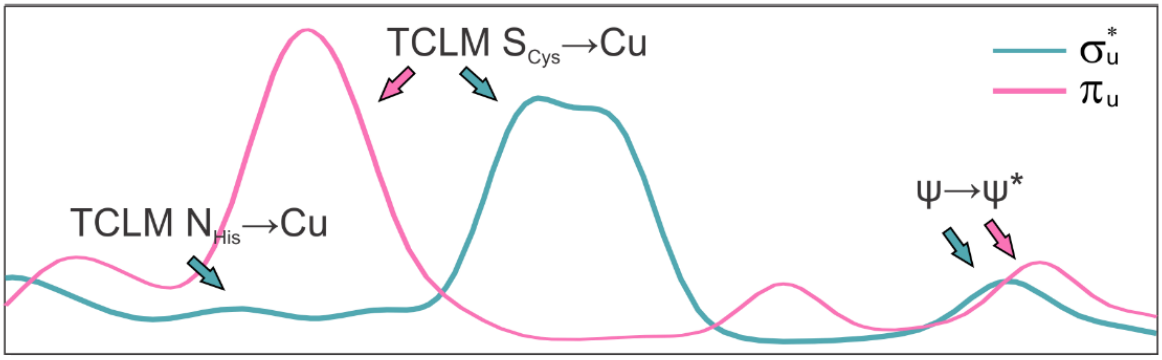


Figura 12: *Espectros de absorción electrónica simulados del sitio de Cu_A de Thermus Thermophilus en sus estados fundamentales alternativos: σ_u^* (celeste) y π_u (rosa). Se encuentran indicadas las bandas de TCLM S_{cis} → Cu y de intervalencia $\Psi \rightarrow \Psi^*$.*

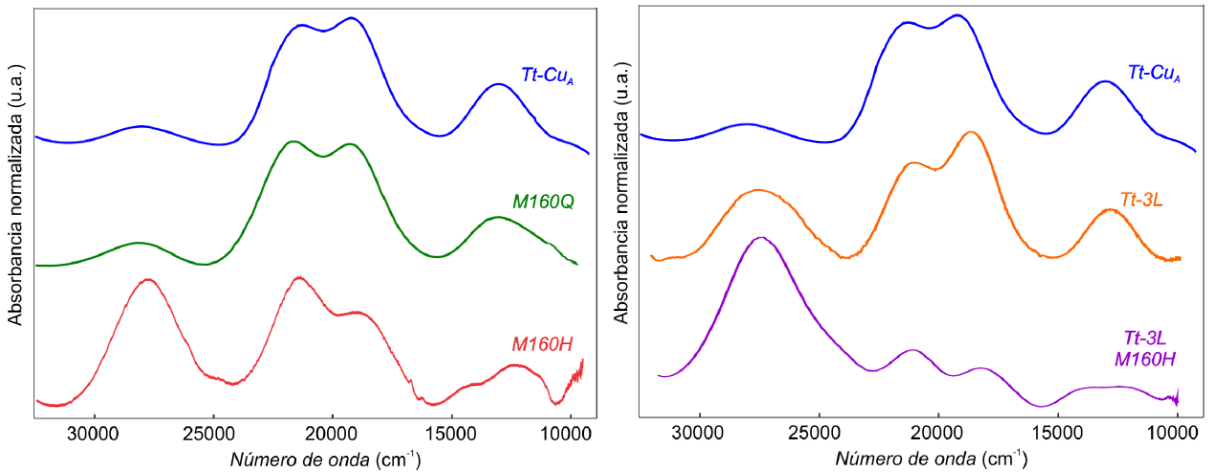


Figura 13: *Espectros de absorción electrónica para diferentes variantes del sitio de Cu_A de Thermus thermophilus estudiadas en nuestro laboratorio, izquierda, mutantes puntuales, y derecha quimeras Tt-3L-Hs.*

Estudios de RMN demostraron que efectivamente este era el caso. Sistemáticamente, se observó que la banda situada en 357 nm (≈26000 cm^{-1}) incrementaba su intensidad a medida que disminuía el valor calculado del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, ver Tabla 1. Esta correlación permitió emplear los espectros de absorción en el UV-visible para la estimación del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ a través de las siguientes ecuaciones:

$$P_{\pi_u} = \frac{(A_{357nm} - 0{,}32\ A_{540nm})/1{,}33}{A_{540nm} + (A_{357nm} - 0{,}32\ A_{540nm})/1{,}33} \qquad \textbf{Ecuación-1}$$

$$\ln\left(\frac{P_{\pi_u}}{1 - P_{\pi_u}}\right) = -\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T \qquad \textbf{Ecuación-2}$$

En primer lugar, se estiman las proporciones de las poblaciones en ambos estados alternativos, P_{π_u} y $P_{\sigma_u^*}$ (donde $P_{\pi_u} + P_{\sigma_u^*} = 1$), a partir de las intensidades de las bandas de TCLM S_{cis} → Cu, que según estimaciones previas se encuentran centradas a los 540 nm y 357 nm, para los estados σ_u^* y π_u, respectivamente.[92,95] Para los cálculos se consideró que la absortividad molar de esta banda es un 33% más intensa en el estado π_u, tal como se determinó mediante cálculos TD-DFT. Además, se corrigió la señal de TCLM S_{cis} → Cu del estado π_u por la contribución de la banda TCLM N_{His} → Cu del estado σ_u^* que solapa con ella. Esta se estimó que contribuye con un 32% de la intensidad de la intensidad de absorción a 540 nm. Esto se basó no solo en los espectros calculados, sino también en el espectro experimental de la variante M160Q que posee una población π_u del 1%, y se asume que el espectro medido corresponde exclusivamente al estado σ_u^*, Figura 13 y Tabla 1.

Tabla 1: *Valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, poblaciones en los estados σ_u^* y π_u, valores de energía de reorganización (λ) experimentales y calculados para los diferentes sitios de Cu_A estudiados*

Proteína	λ_{Exp} (eV)[A]	λ_{Calc}(eV)[B]		$\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$($cm^{-1}$)* (±50)	Población σ_u^*(%)	Población π_u(%)
		σ_u^*	π_u			
Tt-Cu_A silvestre	0,27	0,32	0,63	600	95	5
M160Q	0,29	0,41	0,57	900	99	1
M160H (pH 3,5)	0,34	0,26	0,48	312	77	23
M160H (pH 7)	0,6	---	---	200	72	28
Tt-3L-*Hs*	0,53	---	---	240	76	24
Tt-3L-*Hs-M160H*	0,6	---	---	12	51	49

*valores obtenidos a pH 7 a menos que se indique otro valor. A. Tomados de referencias [95,96] y B. de referencia [92].

Más aún, la combinación de perturbaciones presentes en la doble mutante *Tt*-3L-M160H, Figura 13, demuestra que las perturbaciones introducidas en la primera y segunda esfera de coordinación presentan efectos aditivos.[96] Este resultado y el de la quimera *Tt*-3L-*Hs* van en línea con la observación previa de que no solo cambios en la distancia Cu-Cu permiten un cambio de estados electrónicos, sino que pequeñas perturbaciones de ángulos diedros de ambas histidinas coordinantes, así como también de pequeños cambios que perturben la

planaridad del diamante Cu_2S_2 en el sitio metálico son capaces de alterar los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y promover la transición entre estados.[92]

Los distintos enfoques a lo largo de los años ayudaron a profundizar el entendimiento estructural y electrónico del sitio de Cu_A, sin embargo, el estudio funcional electroquímico no fue objeto de intenso estudio en ninguno de los casos, y hay pocos trabajos dedicados a estos aspectos.[97–104] En nuestro laboratorio, y en intensa colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Vila, se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de las propiedades de TE en diversos estados, ya sea de proteínas en solución como de películas de proteicas adsorbidas sobre electrodos, complementadas con cálculos teóricos.[35,91–96,105–110] Entre los primeros resultados, se logró estimar los valores de las energías de reorganización de TE empleando voltametría cíclica de películas proteicas adsorbidas sobre electrodos biocompatibilizados. Estos resultados arrojaron solo dos grupos de valores, de alrededor de 0,3 eV y 0,6 eV. Sorprendentemente, cálculos teóricos de la energía de reorganización arrojaron los mismos dos valores, uno de ellos cuando la reacción de TE tenía lugar desde el estado electrónico fundamental σ_u^* y el otro cuando tenía lugar desde el estado electrónico alternativo π_u, ver Tabla 1.[92] Esto llevo a pensar que la accesibilidad al estado alternativo π_u, modulada por el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, permitía en algunos casos que la TE ocurra desde un estado u otro. Sorprendentemente, electroquímicamente sólo se observaba una única especie electroactiva principal. Estas observaciones llevaron a proponer una hipótesis conciliadora que permitió dar cuenta de toda la evidencia experimental, que se comentará en la siguiente sección. Estudios posteriores ayudaron a consolidar esta propuesta, y parte de ellos serán el objeto de discusión de este capítulo.[95,96,108]

4.1.4- Hipótesis de trabajo: acoplamiento de coordenadas de reacción de TE e interconversión σ_u^*/π_u

Si bien la coordenada de reacción (CR) de la TE no es conocida, existe mucha evidencia que señala que la CR de la interconversión σ_u^*/π_u involucra un cambio en la distancia Cu-Cu, así como también cambios en ángulos diedros y distorsiones del diamante Cu_2S_2. Si ambas CR, la de la TE y la de la interconversión σ_u^*/π_u estuvieran acopladas, al comenzar el rearreglo del sistema que permite que las energías electrónicas de productos y reactivos se igualen, requisito para que se dé la TE, el sistema recorre las mismas distorsiones geométricas que llevan al sistema desde la geometría del estado σ_u^* al estado π_u, en otras palabras, ciertos cambios estructurales serían los mismos.

Dado que ambas reacciones son procesos activados, se pueden anticipar dos escenarios posibles teniendo en consideración las magnitudes relativas de las barreras de energía relevantes para ambos procesos, la energía libre de activación, $\Delta G_{TE}^{\#}$, y el valor de la diferencia energética entre estados σ_u^* y π_u, $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$:

- Si $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u} >> \Delta G_{TE}^{\#}$ al comenzar el desplazamiento sobre la CR compartida, el sistema alcanza el punto de cruce para la TE antes que aquel para el pasaje al estado π_u, de modo que la reacción de TE ocurre antes, Figura 14-A.

- Por el contrario, si $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ << $\Delta G_{TE}^{\#}$, al desplazarse por la CR en dirección al punto de cruce con la parábola del estado reducido, ahora el gran acoplamiento entre las parábolas del estado oxidado previene que se alcance ese cruce desde el estado σ_u^*. En cambio, el sistema alcanza el estado π_u antes y es desde allí que ocurre la TE necesariamente, Figura 14-B.

El hecho de que experimentalmente solo se observan dos valores de energías de activación, correspondientes con aquellos calculados para el estado σ_u^* o el estado π_u, y no se observan dos especies en las voltametrías, apoyan fuertemente esta visión del proceso.

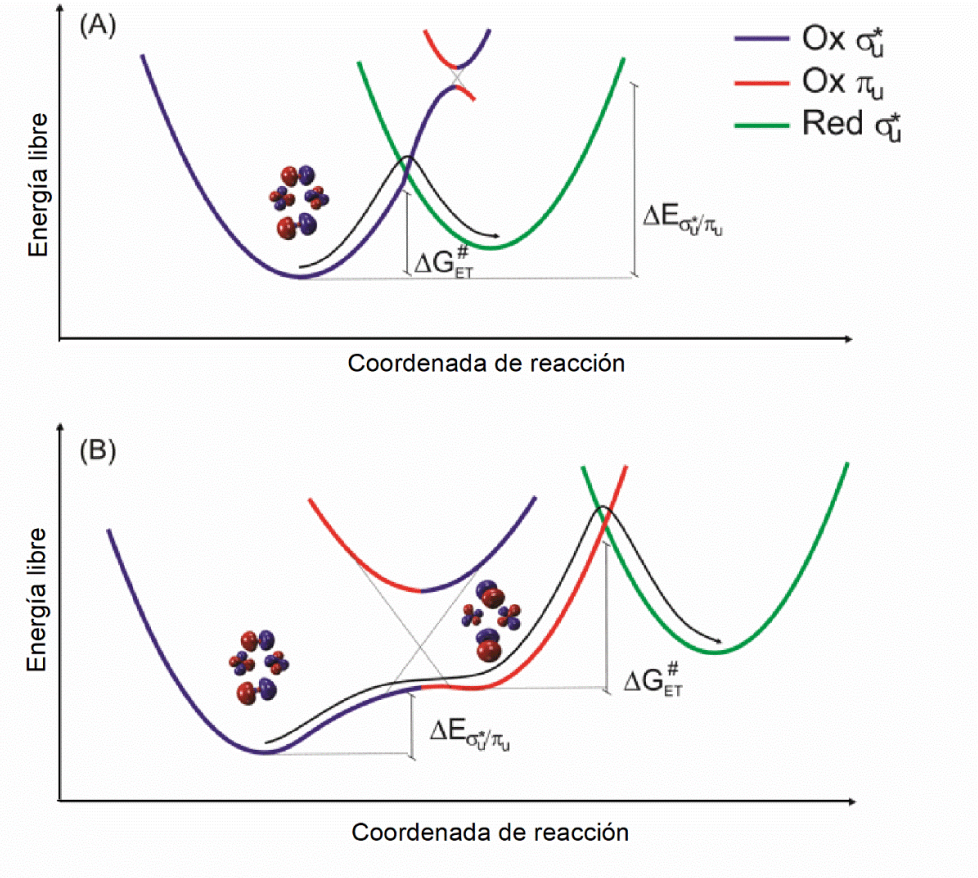


Figura 14: *Representación esquemática de los perfiles de energía libre del sitio de Cu_A en función de la coordenada de reacción de la TE.* ***A.*** *Esquema que representa la situación en la que la energía libre de activación del proceso de reducción, $\Delta G_{TE}^{\#}$, es más pequeña que el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Situación en la que la reacción de TE ocurre exclusivamente desde el estado σ_u^*.* ***B.*** *Representan en la que el valor de $\Delta G_{TE}^{\#}$ es mayor que el de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, de modo que en esta caso el estado oxidado puede acceder al estado fundamental alternativo π_u previo a la reacción de TE, de modo que esta tiene lugar exclusivamente desde este estado.*

4.1.5- Implicancias en la TE *in vivo*

La idea generalizada previa a estos estudios asumía que la matriz proteica imponía restricciones sobre el sitio metálico forzando una geometría tal que el estado σ_u^* quedara determinado asegurando así una baja energía de activación para el proceso de TE. Recordemos que $\Delta G_{TE}^{\#}$ para σ_u^* es aproximadamente la mitad que para la reacción desde el estado π_u. Sin embargo la evidencia experimental es que la TE puede ocurrir desde el estado π_u y que este estado es fácilmente accesible, térmicamente, introduciendo perturbaciones estructurales relativamente pequeñas.

Un detalle interesante es que el estado π_u presenta un acoplamiento electrónico favorable para la TE desde la molécula de Citocromo c_{552}. Puntualmente el enlace S_{Met}-Cu presenta una covalencia aumentada en este estado, y permite un camino electrónico posible y favorable en el complejo proteico Cu_A-Cit c_{552}. Además, este residuo se encuentra en las vecindades del parche hidrofóbico que constituye el sitio de unión con el citocromo.[26,27,103,111,112] El aumento de covalencia del enlace S_{Met}-Cu en el estado π_u garantiza un incremento de la velocidad de TE sobrecompensando el incremento en la energía de activación. Además, se confirmó mediante RMN y cálculos que hay densidad de espín electrónica neta sobre el azufre de la metionina.[110]

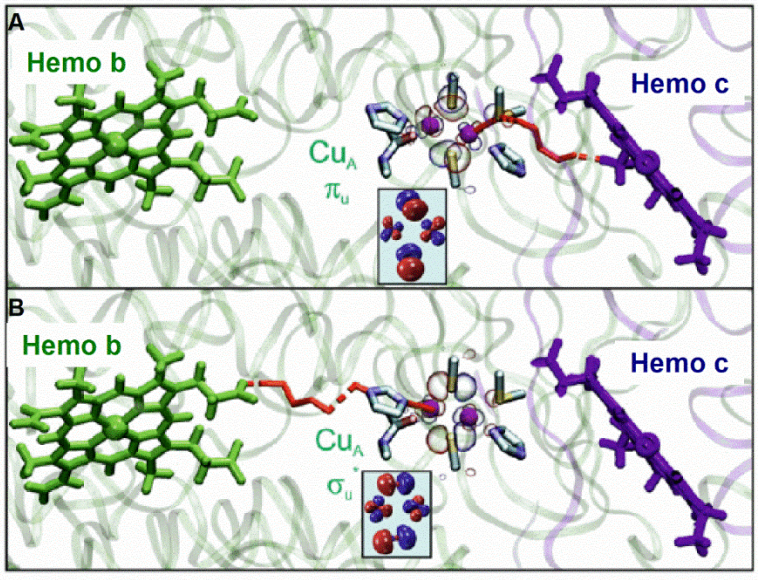


Figura 15: *(Figura adaptada de Abriata et al 2012)* ***A.*** *Camino electrónico óptimo para la entrada del electrón al sitio de Cu_A en el estado π_u,* ***B.*** *Camino electrónico óptimo para la salida le electrón del sitio de Cu_A hacia el hemo b.*

Por otro lado, la salida del electrón desde el sitio de Cu_A hacia el siguiente centro metálico de la CcO, el hemo *b*, involucra la histidina 157, la que presenta una covalencia del doble en el estado σ_u^* respecto del estado π_u, lo que sugiere que la TE al hemo *b* esta favorecida desde el estado σ_u^*. Entonces la imagen global del proceso seria la siguiente, la interacción entre el Cit

c_{552} con el dominio de Cu_A, genera cambios estructurales que permitirían el acceso al estado π_u lo que favorecería el ingreso del electrón, una vez reducido el sitio de Cu_A pasa al estado σ_u^* y, de ese modo, la TE rio abajo. De este modo se asegura una TE unidireccional entre los diferentes centros metálicos. Un detalle no menor, es que el estado reducido del sitio de Cu_A no existe ningún mínimo de energía correspondiente a un estado π_u, apoyando la hipótesis.

A pesar de toda la evidencia acumulada que apoya la hipótesis de trabajo, aún no ha sido posible registrar un cambio entre estados σ_u^* y π_u en el sitio de Cu_A nativo. Solamente ha sido posible modificar las poblaciones relativas mediante mutaciones o intercambio de bucles. Sin embargo, la mutante M160H si verifica una interconversión σ_u^*/π_u reversible dependiente del pH en la misma proteína.[95] Y a su vez, la constante de TE en el estado π_u es mayor que en el estado σ_u^*, pese a su mayor valor de energía de activación, lo que, de cierto modo, va en línea con la hipótesis de lo que ocurriría *in vivo* en el complejo Cu_A-Cit $_{C552}$. Este no es un detalle menor ya que es la primera vez que se observa esta interconversión entre estados que se postula como mecanismo clave en la direccionalidad de la reacción de TE *in vivo*.

4.2- Generación de proteínas quimeras con sitios de Cu_A

La estrategia empleada para estudiar las propiedades estructurales y funcionales de este centro metálico tan importante y particular se basa en la generación de proteínas quimeras. Análogamente a lo comentado en el capítulo anterior, las quimeras se generaron reemplazando la secuencia de los bucles que conforman el sitio por secuencias análogas de otras especies. En esta oportunidad las secuencias corresponden a los bucles que conforman el sitio de Cu_A, en particular de organismos eucariotas como el humano y el organismo vegetal superior más estudiado, la *Arabidopsis thaliana*. De este modo, se contarán con dos quimeras en la que los tres bucles fueron íntegramente reemplazados, estas quimeras se llaman *Tt*-3L-*At* (*Arabidopsis thaliana*) y *Tt*-3L-*Hs* (*Homo sapiens*), ver Figura 16. Dado que la variante *Tt*-3L-*Hs* ha sido previamente caracterizada, en esta oportunidad se generaron quimeras en las que sólo uno de los bucles es reemplazado, dejando los otros dos con secuencia nativa. De este modo se generaron dos quimeras nuevas llamadas *Tt*-1L-E y *Tt*-1L-L. Los nombres hacen referencia al bucle relacionado con la entrada del electrón al sitio (*entry*), *Tt*-1L-E, y al bucle más largo, que contiene 5 de los 6 residuos coordinantes (*ligand), Tt*-1L-L. En ambos casos se emplearon secuencias de humano, como en *Tt*-3L-*Hs*.

Tabla 2: *Secuencias de los bucles que conforman el sitio de Cu_A en las distintas variantes estudiadas. Los residuos coordinantes se encuentran señalados en rojo.*

Proteína	Secuencia aminoacídica de los bucles		
	86-89	110-115	149-160
Tt-Cu_A silvestre	**FAFG**	**PDVIHG**	**CNQYCGLGHQNM**
Tt-1L-E	**HQWY**	**PDVIHG**	**CNQYCGLGHQNM**
Tt-1L-L	**FAFG**	**PDVIHG**	**CSEICGANHSNM**
Tt-3L-*Hs*	**HQWY**	**PDVIHG**	**CSEICGANHSNM**
Tt-3L-*At*	**HQWY**	**ADVIHG**	**CSEICGTNHAFM**

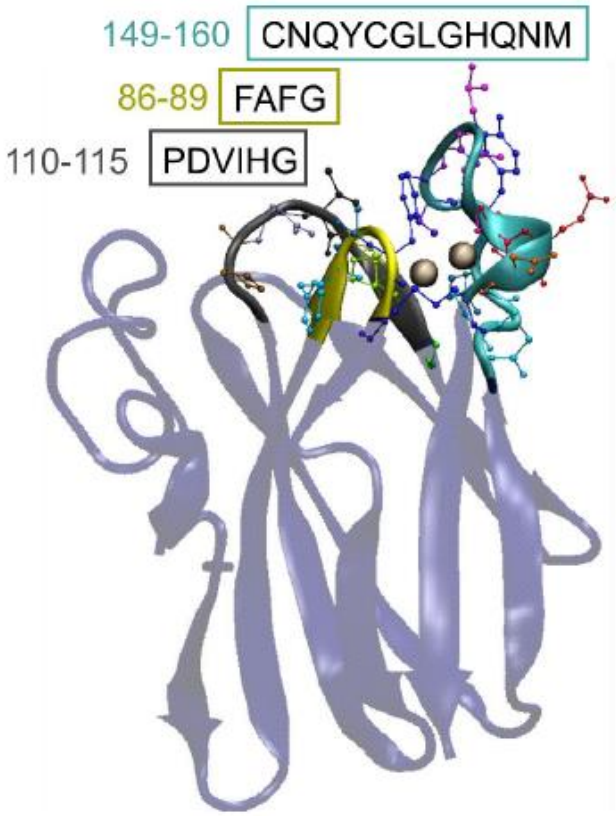


Figura 16: *Representación de la estructura del dominio de Cu_A de Thermus thermophilus (pdb 2CUA). Se indican los tres bucles que conforman el sitio metálico que son reemplazados en la construcción de las diferentes quimeras. Se presenta además las secuencias aminoacidicas.*

4.3- Caracterización espectroscópica: Obtención de valores de la diferencia energética entre estados σ_u^*/π_u ($\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$)

Se adquirieron espectros de absorción electrónica para todas las quimeras a dos valores de pH, 7 y 3,5, donde puede verse que todas presentan las características espectrales típica de un sitio de Cu_A, Figura 17. Esto indica que, a pesar de las pequeñas diferencias espectrales, las características electrónicas y estructurales del sitio Cu_A con valencia mixta (VM) $Cu^{+1,5}$-$Cu^{+1,5}$ se preservan en estas nuevas metaloproteínas. Dentro de estas diferencias podemos señalar: (1) cambios en las intensidades relativas de las dos bandas más intensas centradas en 18700 y 21300 cm^{-1}, las que fueron asignadas a TCLM S_{cis} → Cu del estado electrónico fundamental σ_u^*, (2) pequeños corrimientos y cambios de intensidad de la envolvente centrada en 12650 cm^{-1} correspondiente a bandas de transiciones de intervalencia $\Psi \rightarrow \Psi^*$ y (3) distinto grado de intensificación de la banda centrada en 28000 cm^{-1}, que corresponde al solapamiento de dos bandas, asignadas a la TCLM N_{His} → Cu (contribución minoritaria) y S_{cis} → Cu del estado electrónico fundamental π_u (contribución mayoritaria) [92]. Una observación interesante es que la intensidad de la banda S_{cis} → Cu del estado electrónico fundamental π_u en la quimera *Tt*-3L-*At* es mayor que aquella de las quimeras *Tt*-1L-E y *Tt*-1L-L, y a su vez, es comparable a

aquella presente en la quimera previamente reportada *Tt*-3L-*Hs*[35]. Por otro lado, las quimeras *Tt*-1L-E y *Tt*-1L-L presentan una intensidad ligeramente mayor que en la Cu_A silvestre en esa banda. Estas observaciones indican que el intercambio de los bucles que conforman el sitio metálico genera distorsiones locales debido a la interacción de las cadenas laterales de estos bucles, entre sí y con la matriz que los alberga, tal como ocurre en los sitios T1 tratados en el Capítulo 3.

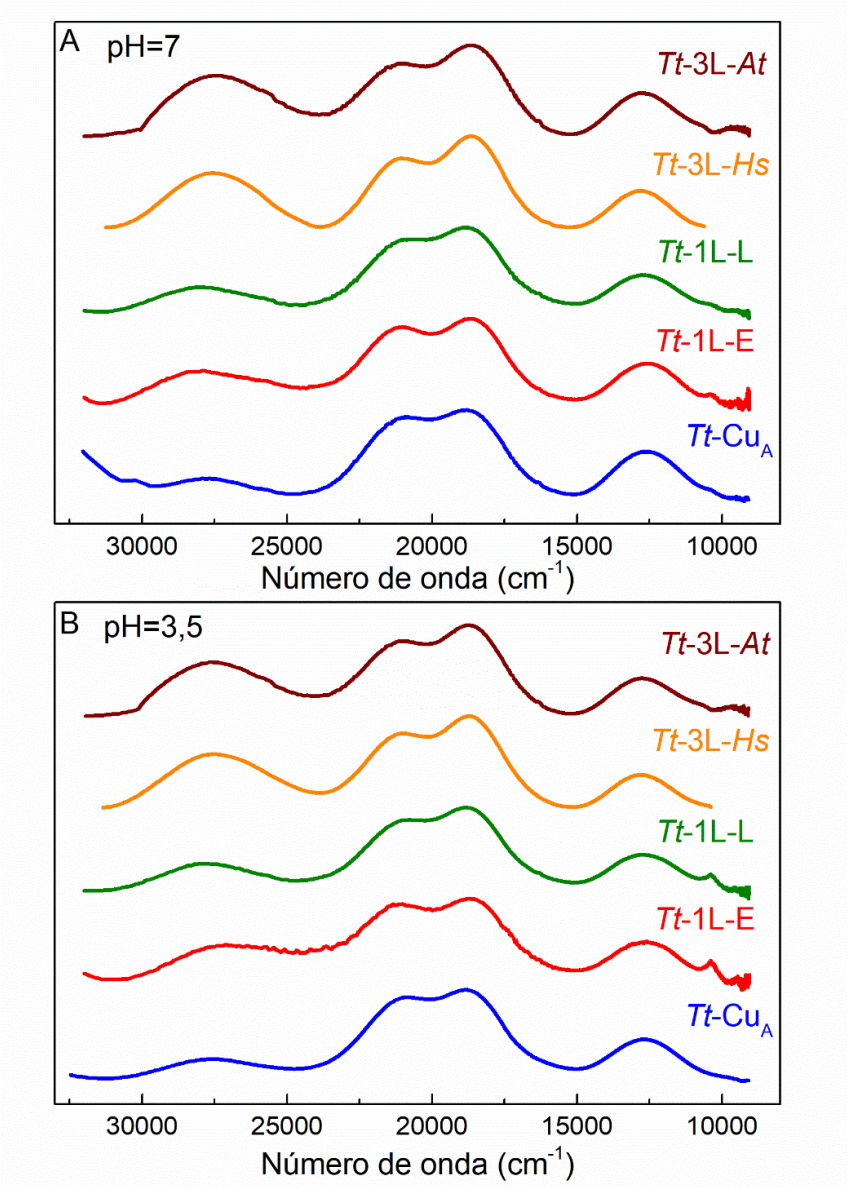


Figura 17: *Espectros de absorción electrónica para las quimeras Cu_A.* ***A.*** *Espectros obtenidos en buffer fosfato 10mM, pH 7, 500mM KNO_3 a 298K,* ***B.*** *espectros obtenidos en buffer acetato 10mM, pH 3,5, 500mM KNO_3 a 298K. Se incluyeron los espectros de la quimera Tt-3L-Hs y la proteína nativa Tt-Cu_A para facilitar la comparación.*

Para profundizar este aspecto se adquirieron espectros Raman resonante (Rr) utilizando una longitud de onda de excitación de 514 nm en condiciones criogénicas, a una temperatura de 77 K. Las pequeñas distorsiones geométricas inevitablemente llevaran a cambios en las distancias y fuerzas de enlace en el sitio de Cu_A, lo cual se traduce en pequeños corrimientos en las bandas Raman correspondientes a modos vibracionales que involucren esos enlaces. La longitud de onda empleada es próxima al máximo asociado con la TCLM S_{cis} → Cu (540 nm), por lo que se verán intensificados los modos en los que participa el motivo Cu_2S_2. Un aspecto no menor de estas medidas es que a la longitud de onda de excitación utilizada sólo el estado fundamental σ_u^* será intensificada, ya que la TCLM S_{cis} → Cu (540nm) corresponde a este estado, recordemos que en el estado fundamental π_u esa banda sufre un fuerte corrimiento al violeta, posicionándola en 357 nm. Por otro lado, dado que el estado π_u es térmicamente accesible, dado que en las condiciones de trabajo se emplean temperaturas muy bajas, se adelanta que la población en el estado π_u es muy baja en todas las quimeras. En la Figura 18 se representan los modos vibracionales dela unidad estructural Cu_2S_2 cuya asignación fue realizada para el sitio de Cu_A de *Pseudomonas denitrificans* [113]. En la Figura 19 se presentan los espectros Rr de las quimeras de Cu_A, y en la Tabla 3 se presentan los valores de las posiciones de las bandas más pronunciadas.

Hay dos modos vibracionales principales que son comunes a todos los sitios de Cu_A, y son debidos a estiramientos Cu-S, que se observan a 263 cm^{-1} (ν_2) y 338 cm^{-1} (ν_3). La banda ν_2 se compone de una combinación de movimientos de estiramientos Cu-N_{His} y Cu-S_{Cis}, mientras que ν_3 resulta del estiramiento simétrico del rombo Cu_2S_2. La banda a 216 cm^{-1} (ν_1) corresponde a una combinación asimétrica de los estiramientos Cu-N y Cu-S, y la banda en 366 cm^{-1} (ν_5) a una compresión asimétrica del rombo Cu_2S_2. Las bandas ν_4 y ν_6 no estaban presentes en el sitio Cu_A de *P. denitrificans* de modo que no fueron asignadas. Más aún, las señales ν_2 y ν_3 son anchas e incluso parecen estar compuesta por dos bandas. La superposición de bandas sumado a corrimientos de energía puede explicar la falta de identificación de estas señales lo que llevó a que no sean asignadas. Al introducir perturbaciones geométricas, cambios en las fuerzas de enlaces lleva a corrimientos en estas señales y permite ponerlas en evidencia.

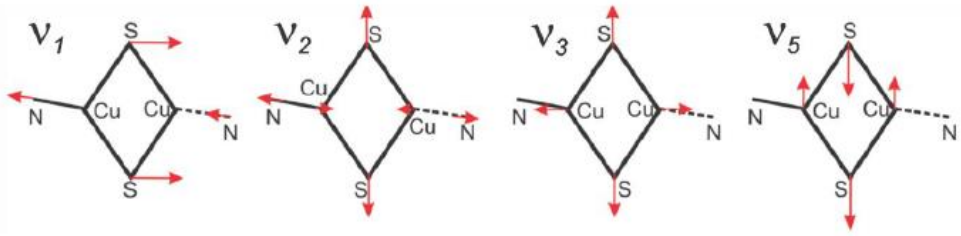


Figura 18: *Representación de los modos normales activos visibles por Rr empleando una longitud de onda de excitación de 514 nm, asignados en el sitio de Cu_A de P. denitrificans.*

Tabla 3: *Posición de las señales Rr obtenida a 77 K y utilizando una longitud de onda de excitación.*

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})				
	WT *Tt*-Cu_A	*Tt*-1L-E	*Tt*-1L-L	*Tt*-3L-*At*	*Tt*-3L-*Hs*
ν_1	218,8	219,9	221,0	220,4	222,3
ν_2	265,8	264,4	262,4	262,3	261,6
ν_3	333,8	332,7	337,4	335,9	338,2
ν_4	343,8	343,0	348,2	346,0	347,9
ν_5	366,6	367,5	371,4	371,4	370,6
ν_6	380,1	380,3	380,3	379,2	---

Los espectros Rr son cualitativamente similares entre si presentando diferencias menores en intensidad y posición de solo algunas bandas, a ambos pH evaluados. Estas diferencias se deben a una redistribución de la composición de los modos normales debido a distorsiones del diamante Cu_2S_2. Globalmente se observan corrimientos de algunos pocos cm^{-1} en todas las bandas. En particular, un cambio sutil pero evidente es el de la banda ν_2, la que se corre hacia frecuencias mayores al movernos desde la Cu_A silvestres pasando por las *Tt*-1L y las *Tt*-3L. También se observan cambios en las intensidades relativas de las de bandas ν_3 y ν_4 al movernos en esa misma dirección a lo largo del conjunto de proteínas. Estas pequeñas diferencias dan cuenta de cambios geométricos a nivel del diamante Cu_2S_2 como consecuencia del cambio de secuencia introducido. Sin embargo, estas diferencias resultan menores frente a los drásticos cambios observados al haber fuertes cambios estructurales que llevan a una valencia localizada Cu^{+2}-Cu^{-1} [84], con lo cual, se puede concluir que los espectros Rr son consistentes con la preservación de la MV completamente deslocalizada entre ambos átomos de cobre en los sitios de Cu_A.

Por las características de los espectros de absorción en el UV-visible y Rr el conjunto de quimeras de Cu_A presenta distorsiones geométricas pequeñas que afectan el sitio de Cu_A llevando a cambios en las constantes de fuerza de los enlaces y, probablemente, en ángulos y ángulos diedros tanto del sitio metálico, así como de las vecindades del sitio. Esto es producto del ajuste no optimizado de los bucles con secuencias eucariotas en la cavidad que deja la matriz de *Tt*-Cu_A, la que pertenece a un organismo procariota. Esto demuestra que la estrategia de intercambio de bucles es una excelente manera de perturbar sutilmente el sitio sin la necesidad de introducir mutaciones puntuales de primera esfera como se hizo en el pasado, las que, si bien permitieron entender muchas características espectrales y funcionales del sitio, no dejan de ser perturbaciones groseras del entorno de los átomos de cobre.

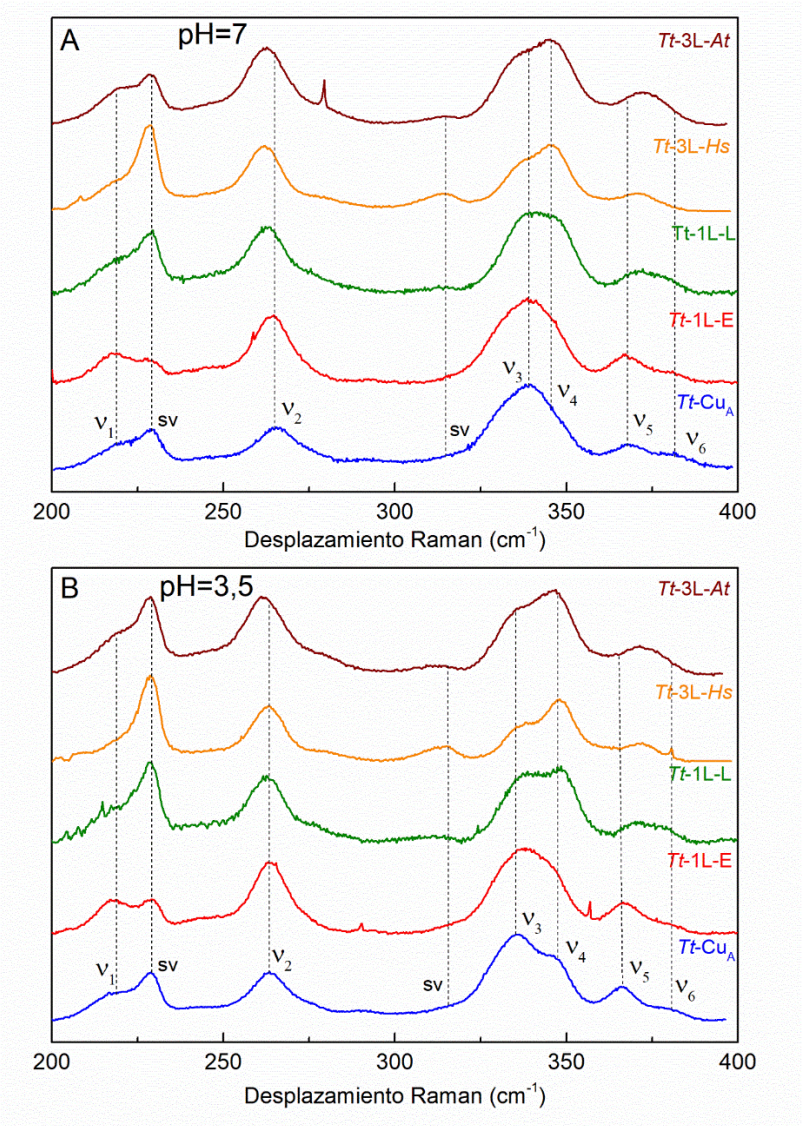


Figura 19: *Espectros Raman resonante para las quimeras Cu_A obtenidos a una longitud de onda de excitación de 514 nm y 77 K.* ***A.*** *Espectros obtenidos en buffer fosfato 10 mM, pH 7, 500 mM KNO_3* ***B.*** *Espectros obtenidos en buffer acetato 10 mM, pH 3,5, 500 mM KNO_3. Se señalan los modos de vibración principales que involucran al diamante Cu_2S_2 y señales de solvente congelado (sv). Se incluyeron los espectros de la quimera Tt-3L-Hs y la proteína nativa Tt-Cu_A para facilitar la comparación.*

Según la hipótesis de trabajo, distorsiones geométricas causadas por la interacción entre la CcO y el citocromo *c*, permitirían modular el pasaje del estado fundamental σ_u^* al estado π_u, modulando así el acoplamiento electrónico y facilitando la TE entre ambos centros metálicos, y la direccionalidad del flujo electrónico. Las perturbaciones estructurales generadas con nuestra estrategia permitirían emular aquellas generadas por la interacción proteína-proteína. Según indican estudios computacionales diferentes distorsiones geométricas del centro metálico diferentes de la distancia Cu-Cu permiten el pasaje $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$. Con el conjunto actual de quimeras podremos indagar las contribuciones puntuales de cada bucle a la modulación de la

accesibilidad del estado π_u, y evaluar si existe aditividad de efectos al comparar estos resultados con la variante *Tt*-3L-*Hs*. Por otra parte, la nueva quimera *Tt*-Cu_A-*At* parece validar las observaciones previas de la variante *Tt*-3L-*Hs*. En este sentido, el siguiente paso es cuantificar el efecto que causan las distorsiones presentes en estas quimeras sobre el valor del $\Delta E_{\sigma/\pi}$. El valor de este parámetro puede obtenerse a partir de la intensidad de las bandas situadas en 18700cm^{-1} y 28000 cm^{-1} empleando las ecuaciones 1 y 2, ya que permiten cuantificar la población de ambos estados electrónicos fundamentales, σ_u^* y π_u. Esta ecuación, como ya se comentó previamente, contempla y corrige el solapamiento entre la señal de TCLM N_{His} → Cu y la señal S_{cis} → Cu del estado electrónico fundamental π_u. Los resultados para ambos valores de pH se presentan en la Tabla 4, junto a los valores reportados previamente para *Tt*-Cu_A y *Tt*-3L-*Hs*.

Tabla 4: *Diferencia de energía, $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, y poblaciones en ambos estados electrónicos fundamentales, , σ_u^* y π_u, a 298K.*

Quimera	$\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ (cm^{-1})	Población σ_u^* (%)	Población π_u(%)
	pH 7		
WT *Tt*-Cu_A	600	95	5
Tt-1L-E	441	90	10
Tt-1L-L	485	91	9
Tt-3L-*At*	256	77	23
Tt-3L-*Hs*	240	76	24
	$\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$($cm^{-1}$)	Población σ_u^*(%)	Población π_u(%)
	pH 3,5		
WT *Tt*-Cu_A	649	96	4
Tt-1L-E	444	90	10
Tt-1L-L	491	91	9
Tt-3L-*At*	287	80	20
Tt-3L-*Hs*	240	76	24

Los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ obtenidos concuerdan con las observaciones previas realizadas a partir de los espectros de absorción UV-visible. Las proteínas *Tt*-1L-E y *Tt*-1L-L poseen valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ menores que *Tt*-Cu_A, lo que lleva a un incremento de la población π_u y a un aumento de la banda en 357nm. Por otro lado, *Tt*-1L-*At* tiene un $\Delta E_{\sigma/\pi}$similar al de *Tt*-1L-*Hs*, tal como indicaba la similitud de sus espectros, con una un intensa banda en 357nm. La similitud en ambas condiciones evaluadas descarta fuertes cambios estructurales dependientes del pH cómo se observó previamente para las mutantes puntuales M160H y *Tt*-3L-M160H[95,107]. A juzgar por los valores de poblamiento π_u y diferencias respecto al $\Delta E_{\sigma/\pi}$ de la WT *Tt*-Cu_A, pareciera existir cierto grado de aditividad en las perturbaciones causadas por el intercambio de bucles en las quimera *Tt*-1L. Sin embargo, el efecto sumado de ambas pareciera no alcanzar los valores de las quimeras *Tt*-3L, explicando el 83% de la población π_u.

Si bien las perturbaciones son menores debido a que solo se intercambió uno de los tres bucles que conforman el sitio, el efecto de cada bucle individual al ser mutados los tres pareciera ser menor, si asumimos que los tres contribuyen por igual. Los tres bucles nativos fueron optimizados para modular las propiedades que controlan el pasaje $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$ en la matriz nativa, mediante las interacciones estéricas entre ellos y con el resto de la proteína. En ese sentido, si bien, al ser implantados en una matriz foránea lleva a que experimenten una inadecuación estructural, aún entre ellos perdura cierto nivel de complementariedad. En las mutantes de un solo bucle, esta complementariedad se pierde por completo debido a que dos de los bucles son procariotas. Esta falta de complementariedad evolutiva entre el bucle exógeno y los dos nativos podría ser la causa de un mayor efecto individual. Por supuesto que esta explicación es solo tentativa al no tener una quimera con la tercera secuencia de bucle o mutante de dos bucles (*Tt*-2L). Sin embargo, los valores de potencial de reducción que se trataran en la sección siguiente parecen respaldar esta propuesta.

4.4- Caracterización electroquímica: obtención de parámetros termodinámicos de la TE

Se empleó voltametría cíclica para evaluar las propiedades funcionales de los centros metálicos de estas quimeras siguiendo los mismos protocolos detallados en las sección-2.2.2 del Capítulo-2, en la Figura 20 se presenta voltagramas representativos. Los resultados se presentan en la Tabla-5. La sustitución de bucles lleva a un incremento en los valores de E°´ de 35 mV (*Tt*-1L-E) o a una disminución de 36 mV (*Tt*-1L-L) o 20 mV (*Tt*-1L-*At*) respecto de la variedad silvestre a pH neutro. Antes que nada, es importante señalar que, estrictamente, solo la quimera *Tt*-1L-E preserva la coordinación de primera esfera intacta, mientras que el resto de las quimeras, *Tt*-1L-L, *Tt*-1L-*Hs* y *Tt*-1L-*At*, retienen todos los residuos coordinantes a excepción del carbonilo amídico de la glutamina-151 que coordina débilmente a uno de los átomos de cobre. Este residuo es reemplazado por un ácido glutámico en las secuencias eucariotas. Considerando el hecho de que este ligando es débil, y que el grupo coordinante no cambio, se puede considerar que la mutación Gln-151-Glu es altamente conservadora, y no debería afectar el valor del potencial redox significativamente. Sin embargo, esta contribución es imposible de cuantificar individualmente en este conjunto de mutantes, dado que existen otras variables cambiando simultáneamente que pueden aportar a las diferencias en los valores de E°´.

Tal como se comentó previamente, si se suman los efectos sobre el $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ y las poblaciones del estado π_u de las quimeras de *Tt*-1L, prácticamente dan cuenta de un gran porcentaje del efecto que presentan las quimeras *Tt*-3L, dejando poco protagonismo al tercer bucle, que no se estudió en este conjunto de quimeras. Se puede observar cierto paralelismo en las diferencias presentes en los potenciales de reducción. Ambas mutantes *Tt*-3L presentan valores de E°´ prácticamente indistinguibles, 20 mV por debajo del Cu_A silvestre, mientras que las *Tt*-1L presentan incrementos o disminuciones de alrededor de 36 mV. Entonces, parece acertada la hipótesis de una preservación de la complementariedad nativa entre los bucles cuando estos son transplantados en forma conjunta, mientras que la falta de esta complementariedad puede observarse cuando se transplantan individualmente. Siguiendo esta propuesta, el transplante de los tres bucles, si bien introducen una perturbación mayor en

el sitio al introducirse en la matriz de *Tt*-Cu_A, individualmente cada bucle en esas quimeras *Tt*-3L contribuye a la perturbación menos que en las quimeras *Tt*-1L, debido a esta complementariedad. Sin embargo, tal como se señaló previamente, la forma de testear esta propuesta sería estudiar la *Tt*-1L faltante e, idealmente, alguna quimera *Tt*-2L.

Dado que el potencial de reducción puede depender de muchas variables, tal como se comentó extensamente para las quimeras con sitios T1 en matriz *Tt*-Cu_A, a veces resulta complicado asignar unívocamente el origen de las diferencias observadas en E°´. Más aún cuando se intentan explicar diferencias pequeñas del orden de las que se observan en este trabajo de tesis, algunas decenas de milivolts. Perturbaciones más robustas, como mutaciones puntuales de primera esfera de coordinación generan cambios mucho más grandes en los valores de E°´, del orden de cientos de milivolts e incluso llegando a 1 volt, que logran opacar completamente el aporte de pequeñas distorsiones, y permiten identificar una clara tendencia. Un caso que ejemplifica muy bien este hecho es la mutación sistemática del ligando axial metionina con residuos tanto naturales como artificiales con distinto grado de hidrofobicidad[114,115], donde a mayor hidrofobicidad mayor resulta el E°´ registrado debido a argumentos puramente electrostáticos de desestabilización del estado oxidado respecto del reducido. Sin embargo, claramente la introducción de residuos en la posición axial, con distintas cadenas laterales, de distintos volúmenes, estructura y densidad electrónica generara perturbaciones geométricas en los sitios. Entonces, en nuestro caso en particular más de una variable puede presentar correlaciones con los valores de E°´.

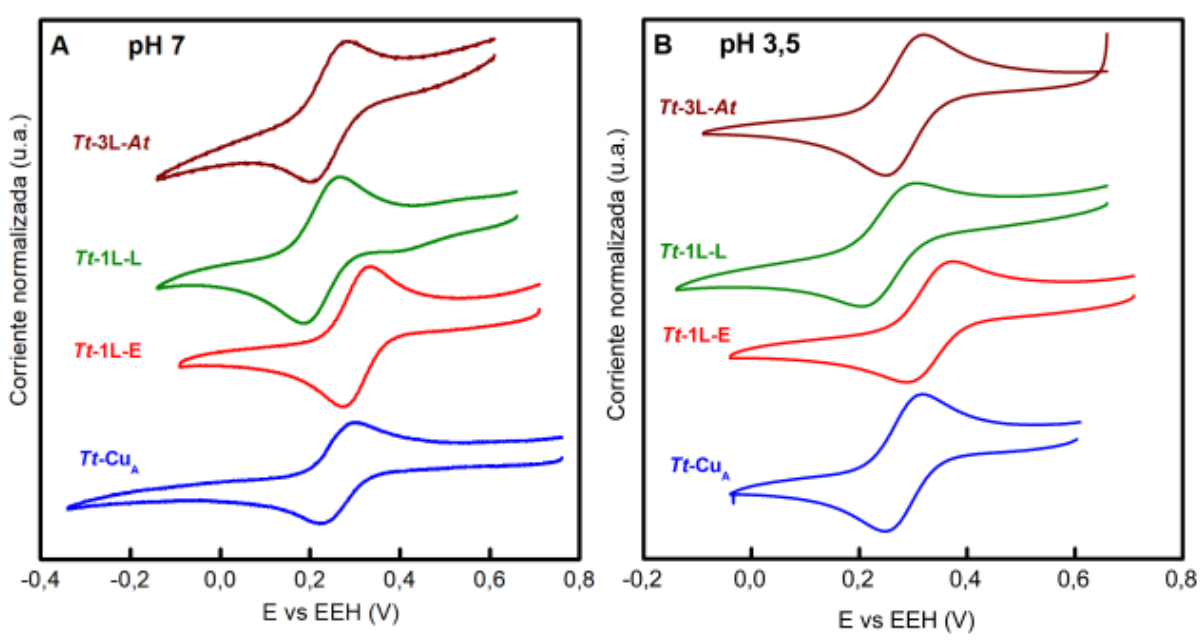


Figura 20: *Voltagramas de soluciones proteicas registrados a 100mV.s^{-1}.* ***A.*** *Espectros obtenidos en buffer fosfato 10 mM, pH 7, 500 mM KNO_3* ***B.*** *Espectros obtenidos en buffer acetato 10 mM, pH 3,5, 500 mM KNO_3.*

Tabla 5: *Valores de potencial de reducción y su contribución entrópica y entálpica obtenidas a partir de experimentos en función de la temperatura Entre paréntesis se indican los desvíos estándar de los parámetros termodinámicos. Los valores de la Tt-Cu$_A$ y Tt-3L-Hs fueron tomados de la referencia* [35,107].

Quimera	E°´ (mV vs EEH)	ΔS_{Red} (J.K^{-1}.mol^{-1})	ΔH_{Red} (kJ.mol^{-1})	$T.\Delta S_{Red}.F^{-1}$ (mV)	$-\Delta H_{Red}.F^{-1}$ (mV)
	pH 7				
WT *Tt*-Cu$_A$	261 (±5)	-42 (±5)	-38 (±2)	-129 (±15)	394 (±20)
Tt-1L-E	297 (±1)	-44 (±7)	-42 (±2)	-136 (±20)	435 (±20)
Tt-1L-L	226 (±4)	-32 (±1)	-31 (±1)	-99 (±3)	321 (±10)
Tt-3L-*At*	241 (±3)	-37 (±6)	-34 (±2)	-114 (±18)	352 (±20)
Tt-3L-*Hs*	242 (±5)	-39 (±5)	-35 (±2)	-120 (±15)	363 (±20)
	pH 3,5				
WT *Tt*-Cu$_A$	273 (±5)	-27 (±4)	-34 (±1)	-83 (±12)	352 (±10)
Tt-1L-E	328 (±2)	-38 (±4)	-43 (±1)	-117 (±12)	446 (±10)
Tt-1L-L	254 (±2)	-11 (±5)	-28 (±1)	-34 (±15)	290 (±10)
Tt-3L-*At*	281 (±4)	-28 (±3)	-35 (±1)	-86 (±9)	363 (±10)
Tt-3L-*Hs*	296 (±5)	-35 (±8)	-39 (±2)	-108 (±25)	404 (±21)

Al evaluar el posible efecto de la hidrofobicidad del entorno del sitio de Cu$_A$, calculando la hidrofobicidad acumulada de los bucles en todas las quimeras, se puede observar una tendencia débil entre el E°´ y el valor de hidrofobicidad, calculado empleando los índices de Kyte y Doolittle[116]. En la Tabla 6 se presentan los valores de hidrofobicidad acumulada, los que se obtienen sumando la hidrofobicidad de los tres bucles. Estos a su vez se obtienen por la suma directa de la hidrofobicidad de todos los residuos de los bucles. En la Figura 21 se presenta esta correlación. La explicación se basa en des/estabilización diferencial entre ambos estados redox.

Tabla 6: *Valores de hidrofobicidad de los bucles para todas las quimeras, calculados empleando la escala de Kyte y Doolittle*[116].

Quimera	Hidrofobicidad de los bucles			Hidrofobicidad total
	Bucle-Entrada	Bucle-Histidina	Bucle-Ligando	
WT *Tt*-Cu$_A$	7	0	-8,6	-1,6
Tt-1L-E	-8,9	0	-8,6	-17,5
Tt-1L-L	7	0	-2,5	4,5
Tt-3L-*At*	-8,9	2,7	3,9	-2,3
Tt-3L-*Hs*	-8,9	-2,7	-2,5	-14

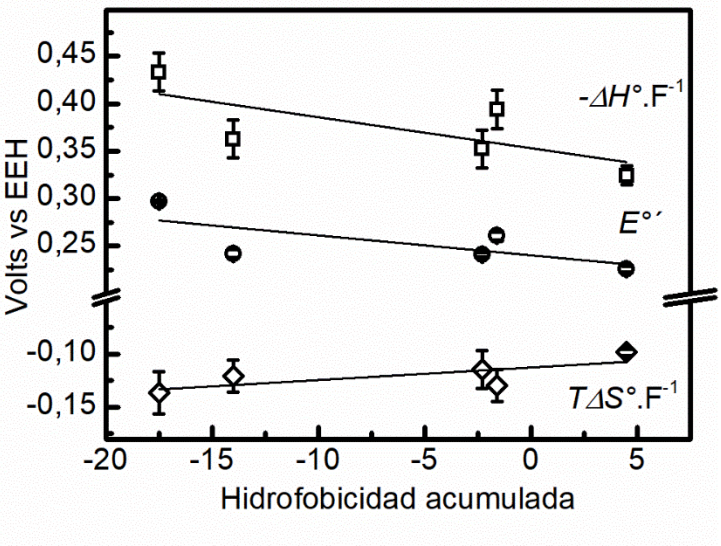


Figura 21: *Valores de potencial de reducción (círculos negros) y sus componentes entálpica (cuadrados vacíos) y entrópica (rombos vacíos) en función de la hidrofobicidad acumulada de los tres bucles que conforman el sitio de* Cu_A.

Por otro lado, como ya se adelantó, las contribuciones entálpicas y entrópicas no se compensan como ocurre en los sitios T1 del Capítulo 3. De modo que existe una contribución neta al potencial redox. Se realizaron experimentos de voltametría cíclica en función de la temperatura con el fin de determinar estas contribuciones. Los resultados para ambos pH se presentan en la Tabla 5 y Figuras 21 y 22. En las Figura 23 se presentan los voltagramas a distintas temperaturas para todas las quimeras en ambas condiciones, a fin de mostrar la bondad de la señal y del comportamiento con la temperatura. En la Figura 24 se presentan los distintos ajustes a las ecuaciones 3 y 4.

$$\Delta S_{Red} = nF\left(\frac{\partial E}{\partial T}\right) \qquad \textbf{Ecuación-3}$$

$$\Delta H_{Red} = -nF\left(\frac{\partial E.T^{-1}}{\partial T^{-1}}\right) \qquad \textbf{Ecuación-4}$$

Si bien las componentes entrópicas y entálpicas no presentaran una compensación total como ocurre en centros de cobre de T1 se puede observar cierto grado de compensación, Figura 22. Además, ambas componentes varían con la hidrofobicidad acumulada de manera opuesta, compensando parcialmente su posible efecto sobre la variación de E°´, Figura 21. Ambas contribuciones presentan valores negativos, ver Tabla 5. Valores negativos de ΔH_{Red} indican que el estado reducido presenta menos energía que el oxidado, y esto da como resultado un valor de E°´ positivo, como se observa para todas las quimeras. Dado el pequeño efecto compensatorio entre ΔS_{Red} y ΔH_{Red}, la contribución ΔH_{Red}^{Solv} es minoritaria en el ΔH_{Red} global, siendo la componente mayoritaria la contribución proteica, ΔH_{Red}^{Prot}. Sin embargo, la pequeña variación con la hidrofobicidad de los bucles, *a priori*, puede dar cuenta de dos procesos: 1) una des/estabilización del estado oxidado frente le reducido, es decir, un efecto electrostático directo sobre el sitio metálico, y 2) diferencias energéticas en la contribución de solvente

debido a diferencias en la estructura de los dipolos en la región de influencia cercana a los bucles. En este caso en puntual parece, que el efecto es sobre la estructura del solvente, ya que aumentar la polaridad, o reducir la hidrofobicidad, del ambiente del sitio metálico lleva a valores de ΔH_{Red} más negativos, de modo que si estos efectos estuvieran operando directamente sobre el sitio metálico implicaría una estabilización relativa del Cu^{+}-Cu^{+} frente al $Cu^{+1,5}$-$Cu^{+1,5}$, lo cual resulta anti intuitivo empleando simples argumentos electrostáticos. En cambio, el efecto sobre la estructura de solvente es menos obvio, y dependerá no solo de la hidrofobicidad de la superficie, sino también de su topología. Por lo tanto, pequeñas diferencias de los arreglos de las moléculas de solvente al ocurrir la reacción de TE pueden dar cuenta de esta pequeña variación. Por otra parte, como ya discutimos anteriormente, la falta de complementariedad entre bucles permite entender los cambios en los valores de E°´, así como también la magnitud de los con cambios en los valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, desde un punto de vista estructural.

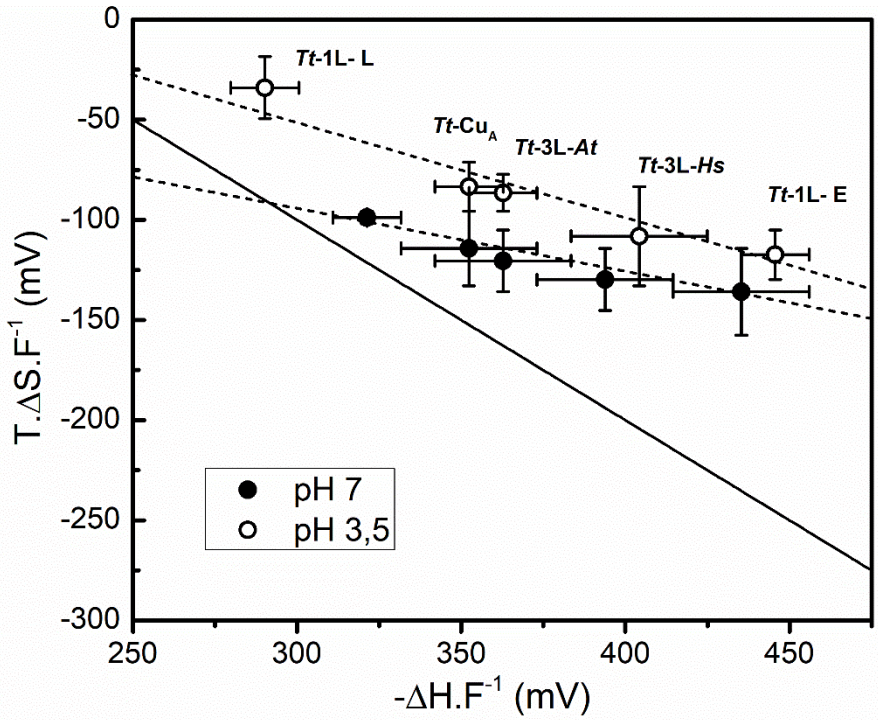


Figura 22: *Grafico de compensación entrópico/entálpica. La línea llena corresponde a una situación de compensación entrópico/entálpica total. Las líneas punteadas corresponden a ajustes lineales de los datos a ambas condiciones testeadas e indican una situación de compensación parcial de ambas componentes.*

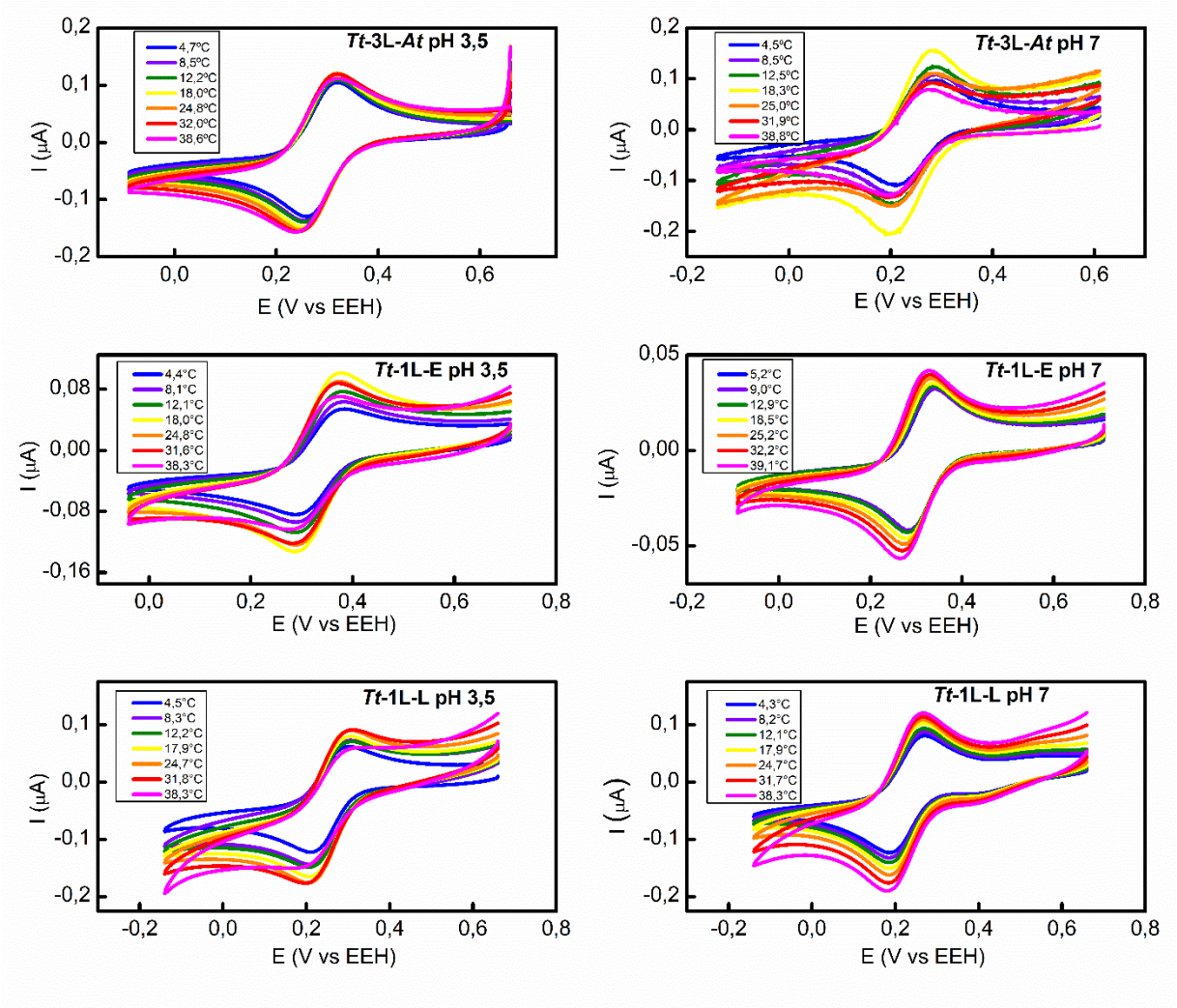


Figura 23: *Voltagramas obtenidos a partir de soluciones proteicas a pH 3,5, izquierda, y pH 7, derecha, en función de la temperatura, en el rango de 4-40°C, registrados a 100 mV.s^{-1}. En ambos casos el buffer se empleó en una concentración 10 mM con 500 mM KNO_3 como electrolito soporte.*

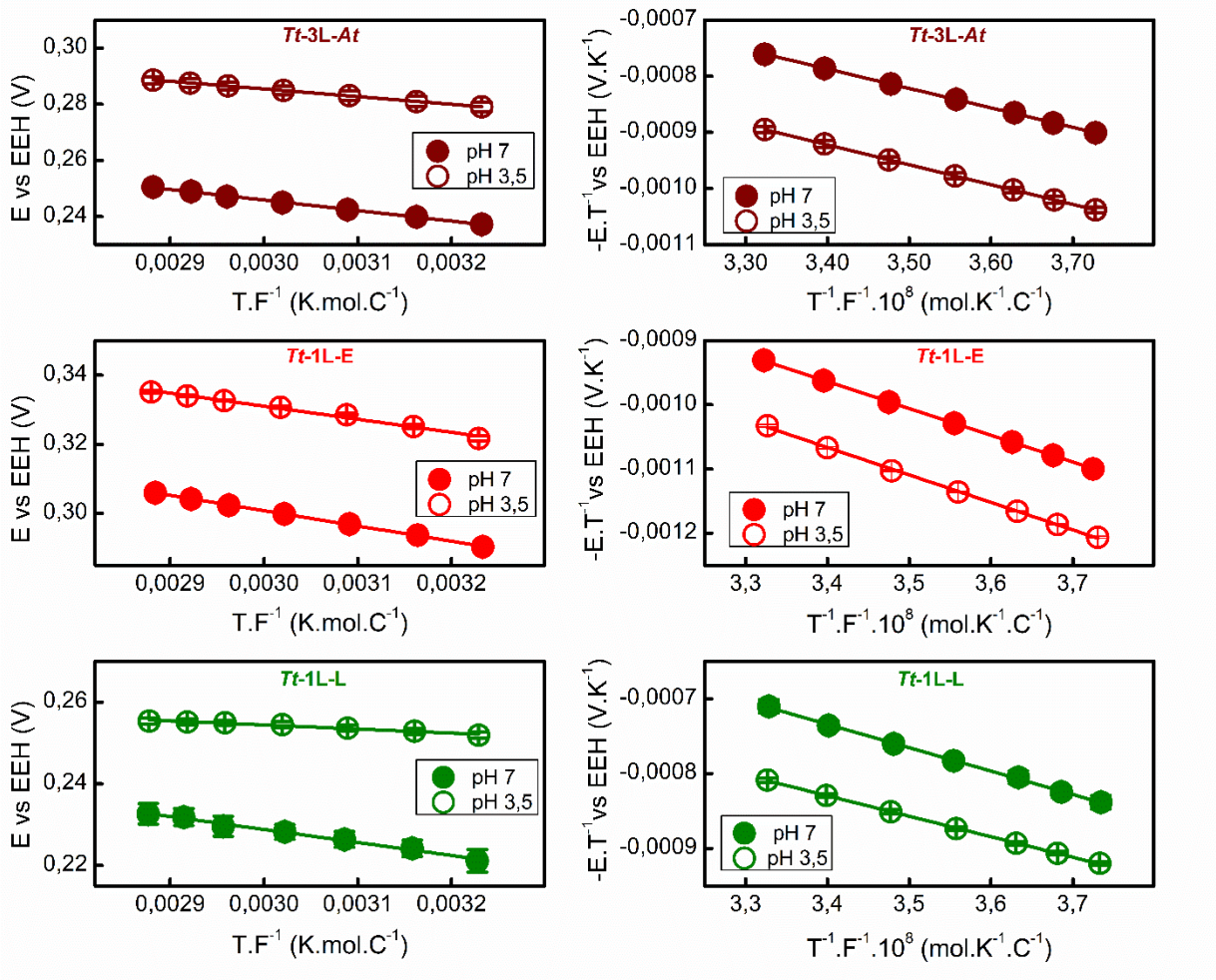


Figura 24: *Distintas representaciones de la dependencia del potencial de reducción con la temperatura que permiten la obtención de las componentes entrópicas y entálpicas. Las barras representan el desvío estándar del valor medio. Las rectas representan un ajuste lineal de las ecuaciones 3 y 4. Los círculos llenos representan valores obtenidos a pH 7 y los círculos vacíos a pH 3,5.*

El hecho de que estos sistemas no presenten compensación completa sugieren otro tipo de contribuciones a los valores de los parámetros termodinámicos, específicamente a la componente entrópica. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron, empleando mutantes puntuales del residuo coordinante metionina-160, que la componente entálpica correlacionaba perfectamente con la hidrofobicidad de este residuo y sus cambios podían ser racionalizados en términos de des/estabilización relativa entre ambos estados redox, mientras que la entropía no presentaba ningún tipo de correlación.[107] Por el contrario, se demostró que los valores de ΔS_{Red} dependían de las características estructurales y electrónicas de los sitios de Cu_A, puntualmente de las diferencias en la degeneración electrónica entre ambos estados redox, ver texto más adelante, y ecuación 12. El estado reducido Cu^+-Cu^+ es un singlete y presenta una superficie de energía potencial con un único mínimo que corresponde a un estado σ_u^* y por lo tanto es un estado no degenerado. En contraposición el estado oxidado de

VM $Cu^{+1,5}$-$Cu^{+1,5}$ es un doblete para ambos mínimos locales en la superficie de energía potencial, los estados σ_u^* y π_u. De este modo, la degeneración es de dos en ambos estados electrónicos del centro $Cu^{+1,5}$-$Cu^{+1,5}$ y el peso estadístico del estado de mayor energía π_u queda determinado por su accesibilidad térmica, es decir, por el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. De esta manera a juzgar únicamente por el número de estados electrónicos accesibles en ambos estados redox el valor de ΔS_{Red} debe ser negativo y aumentar en modulo al disminuir el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. Esta tendencia fue verificada recientemente por nuestro laboratorio para un conjunto de mutantes de Cu_A.[107] Las quimeras estudiadas en este trabajo de tesis muestran la misma tendencia, Figura 25-A.

La energía libre de Helmholtz, A, de reducción (que se puede aproximar a la energía libre de Gibbs para sistemas en fase condensada) se compone de un término entrópico y uno energético, y a su vez se encuentra relacionada con la función de partición del sistema según las siguientes ecuaciones:

$$A = -k_B T \ln Q \qquad \textbf{Ecuación-5}$$

$$\Delta \mathrm{A} = -k_B T \ln\left(\frac{Q_{Red}}{Q_{Ox}}\right) \qquad \textbf{Ecuación-6}$$

$$\Delta A = \Delta \mathrm{U} - \mathrm{T}\Delta \mathrm{S} \qquad \textbf{Ecuación-7}$$

Combinando las ecuaciones anteriores se tiene que:

$$\Delta \mathrm{S} = k_B \ln\left(\frac{Q_{Red}}{Q_{Ox}}\right) + \frac{\Delta U}{T} \qquad \textbf{Ecuación-8}$$

La función de partición típicamente puede factorizarse en sus distintas contribuciones, electrónica, vibracional, rotacional y conformacional, como sigue:

$$Q = Q_{El} Q_{Vib} Q_{Rot} Q_{Conf} \qquad \textbf{Ecuación-9}$$

Si bien, esto no aplica estrictamente para el caso puntual del sitio de Cu_A, dado que existe acoplamiento conformacional entre los estados σ_u^* y π_u, se puede emplear como una aproximación de primer orden al problema. Por otro lado, se espera que al comparar proteínas en entornos proteicos similares permita cancelar, al menos parcialmente, parte del efecto del acoplamiento. Es importante señalar en este punto que no se ha reportado ningún análisis cuantitativo ni semi-cuantitativo para racionalizar las entropías de reducción en ningún sistema del que tenemos conocimiento. De este modo la entropía queda:

$$\Delta \mathrm{S} = k_B \ln\left(\frac{Q_{Red}^{El} Q_{Red}^{Vib} Q_{Red}^{Rot} Q_{Red}^{Conf}}{Q_{Ox}^{El} Q_{Ox}^{Vib} Q_{Ox}^{Rot} Q_{Ox}^{Conf}}\right) + \frac{\Delta U}{T} \qquad \textbf{Ecuación-10}$$

Tomando en consideración las diferencias en multiplicidad de ambos estados redox y su relación con la accesibilidad al estado fundamental alternativo $\pi_u$en el estado oxidado, se

puede reescribir la componente electrónica de la función de partición valiéndonos de las diferencias de energía entre ambos estados en cada caso, oxidado/reducido y σ_u^*/π_u, para dar:

$$\Delta S = k_B \ln\left(\frac{e^{-\Delta U/k_B T}}{2 + 2e^{-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T}} \frac{Q_{Red}{}'}{Q_{Ox}{}'}\right) + \frac{\Delta U}{T} \qquad \textbf{Ecuación-11}$$

Reordenando se obtiene la siguiente expresión, donde $Q_{Red}{}'$ y $Q_{Ox}{}'$ corresponden a las contribuciones no electrónicas a la función de partición en ambos estados redox.

$$\Delta S = -k_B \ln\left(2 + 2e^{-\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}/k_B T}\right) + k_B \ln\left(\frac{Q_{Red}{}'}{Q_{Ox}{}'}\right) \qquad \textbf{Ecuación-12}$$

En esta expresión final queda claro que al disminuir el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ el primer término crece y la entropía de reducción aumenta en módulo, volviéndose cada vez más negativa. Esto se verifica experimentalmente para todas las proteínas de Cu_A estudiadas, Figura 25-A.

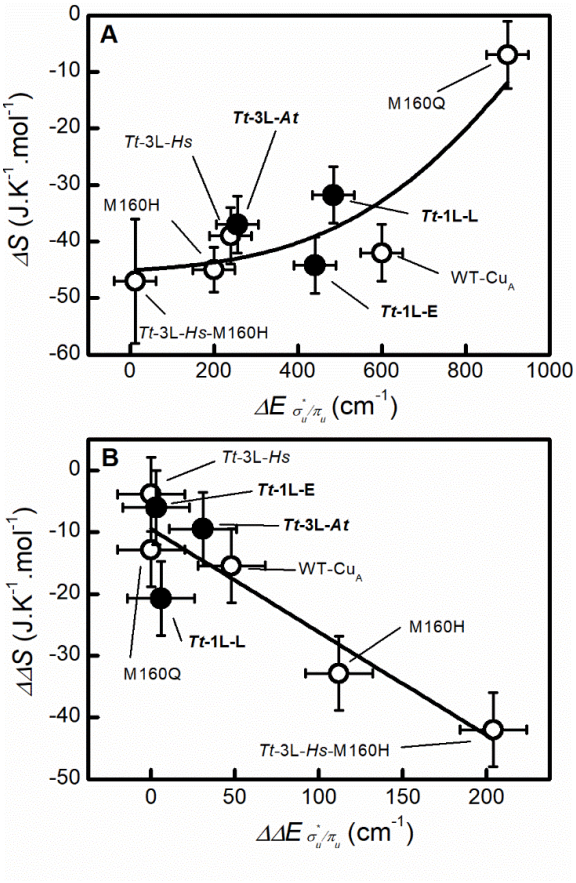


Figura 25: A. *Valores de ΔS_{Red} en función del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ medidos a pH 7.* ***B.*** *Diferencias de valores de ΔS_{Red} a pH 7 menos obtenidos pH 3,5 en función de la misma diferencia para los valores de $\Delta E_{\sigma/\pi}$. Los símbolos llenos representan las quimeras estudiadas, los símbolos vacíos representan otras variantes estudiadas previamente en nuestro laboratorio.*[95,107,108]

Se espera que las modificaciones introducidas en el sitio de Cu_A en estas quimeras afecten todas las contribuciones a la función de partición, no solo la electrónica. Y dado que todas las contribuciones determinan el valor de ΔS_{Red} se determinó ese valor en dos condiciones distintas, pH 7 y pH 3,5, de modo de poder cancelar al menos parcialmente, todas las contribuciones que fuesen no electrónicas simplemente restando los valores en ambas condiciones. Lo mismo se hizo con el valor del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. El grafico de las dobles diferencias muestra una tendencia lineal para todas las proteínas evaluadas, tanto mutantes puntuales como quimeras, como combinación de ambos tipos de perturbaciones, Figura 25-B. La mutación del residuo axial metionina-160-histidina, tanto sobre la proteína silvestre, *Tt*-M160H, como en la quimera Tt-3L-M160H llevan a una modulación del $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ a través del pH. Es por ello que estas dos presentan grandes valores tanto para $\Delta\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ como para $\Delta\Delta S_{Red}$. Esto no se observa para ninguna otra variante.

En resumen, la componente entrópica del potencial de reducción es ampliamente determinada por la función de partición electrónica, la cual a su vez es modulada por la accesibilidad al estado fundamental alternativo π_u, o sea por el valor de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$. La contribución entálpica, por otro lado, refleja la estabilidad relativa de los dos estados redox del sitio de Cu_A. Esta diferencia depende principalmente de cambios sutiles en la estructura del sitio metálico. En menor medida, presenta contribuciones relacionadas con cambios en el rearreglo del solvente al ocurrir la TE, que a su vez varían con la hidrofobicidad acumulada por los tres bucles, sin embargo, esta contribución tendrá una contraparte entrópica de signo opuesto que lo cancelará.

El hecho de que los parámetros termodinámicos de las quimeras *Tt*-3L-*Hs* y *Tt*-3L-*At* sean prácticamente idénticos, y que sus características espectrales sean parecidas, sugieren que los efectos del residuo 110, el primero del bucle de histidinas, y aquellos que rodean al residuo coordinante histidina-157, que difieren en ambos organismos no presentan una influencia apreciable. Probablemente, estos residuos compensen entre si cualquier perturbación causada por los demás, dado que esas secuencias son altamente conservadas y fueron seleccionadas a lo largo de la historia evolutivo de los organismos, aportando la complementariedad necesaria para mantener el funcionamiento correcto del sitio de Cu_A en organismos eucariotas. En el caso de las quimeras *Tt*-1L, si bien los cambios a nivel de secuencias son menores que en las quimeras *Tt*-3L, los efectos sobre los parámetros termodinámicos parecen ser intermedios entre estas últimas y la proteína silvestre. Sin embargo, la aditividad de sus efectos es parcial, dado que la suma de sus efectos da cuenta de un 83% del efecto de las *Tt*-3L. Si bien no es posible realizar una disección completa de las contribuciones al no contar con la mutante del tercer bucle, ni tampoco mutantes *Tt*-2L, la hipótesis de falta de complementariedad natural entre las secuencias procariotas y eucariotas permite dar una explicación de estos efectos.

4.5- Caracterización electroquímica en la interfaz electrodo-solución: obtención de parámetros cinéticos de la TE

Los parámetros cinéticos asociados a la TE fueron obtenidos para el conjunto de quimeras de Cu_A empleando voltametría cíclica de proteínas adsorbidas sobre electrodos recubiertos con SAMs. Al igual que con las quimeras con sitios T1 comentados en el capítulo previo, se utilizaron monocapas mixtas empleando una mezcla de alcanotioles-ω-sustituidos SH-$(CH_2)_n$-OH y SH-$(CH_2)_n$-CH_3 en una relación 3:2. Para asegurar un régimen de TE no adiabático se empleó un largo de cadena de 15 metilenos (n = 15) para ambos alcanotioles. También se realizaron experimentos con SAMs de menor largo de cadena, en particular con 5 metilenos (n = 5) para estudiar el efecto de estas perturbaciones sobre los mecanismos de TE en un régimen de control friccional[109,117,118]. En la Figura 26, se presentan voltagramas típicos para todas las variantes estudiadas obtenidos a diferentes velocidades de barrido en el rango 50-500 $mV.s^{-1}$, para SAMs largas, panel izquierdo, y en el rango de 1-60 $mV.s^{-1}$, para SAMs cortas, panel derecho. En la Figura 27, se presentan los mismos voltagramas donde se sustrajo la corriente capacitiva para mayor claridad. En todos los casos se observan señales reversibles, simétricas con los parámetros típicos de especies confinadas a la superficie del electrodo, ver Tabla 7. La semejanza entre los valores de E°´ obtenido para películas y soluciones proteicas confirma la integridad del centro metálico, tal como se observó para las quimeras de sitios T1, y otras variantes de Cu_A estudiadas en nuestro laboratorio.

Tabla 7: *Parámetros electroquímicos de proteínas adsorbidas sobre electrodos de oro funcionalizados con SAMs, a pH 4,6 y 298K. Los valores correspondientes a Tt-Cu_A y Tt-3L-Hs se incluyen aquí por completitud, pero su obtención es presentada en el Capítulo 5.*

	Tt-Cu_A	*Tt*-1L-E	*Tt*-1L-L	*Tt*-3L-*At*	*Tt*-3L-*Hs*
E°´solucion (mV vs EEH)	273 (±5)	328(±2)	254(±2)	281(±4)	296(±5)
SAMs con n = 15					
E°´adsorbido (mV vs EEH)	268 (±5)	334 (±5)	254 (±5)	309 (±5)	319 (±5)
Ic/Ia	1,01	1,02	0,77	0,77	0,82
ΔEp (mV)*[1]	49	53	66	49	98
FWHM (mV)*[1]	122	134	151	144	147
k_{TE}^o(Hz)	1,9 (±0,1)	1,6 (±0,1)	2,1 (±0,2)	2,4 (±0,2)	2,0 (±0,1)
SAMs con n = 5					
E°´adsorbido (mV vs EEH)	241 (±5)	318 (±5)	245 (±5)	284 (±5)	289 (±5)
Ic/Ia	1,04	1,18	1,13	0,92	0,94
ΔEp (mV)*[2]	15	26	32	52	15
FWHM (mV)*[2]	135	141	140	157	128
k_{TE}^o (Hz)	6600 (±1300)	3800 (±400)	7300 (±400)	6300 (±500)	8000 (±400)

*[1]para velocidades de barrido de 50 $mV.s^{-1}$; *[2]para velocidades de barrido de 1000 $mV.s^{-1}$

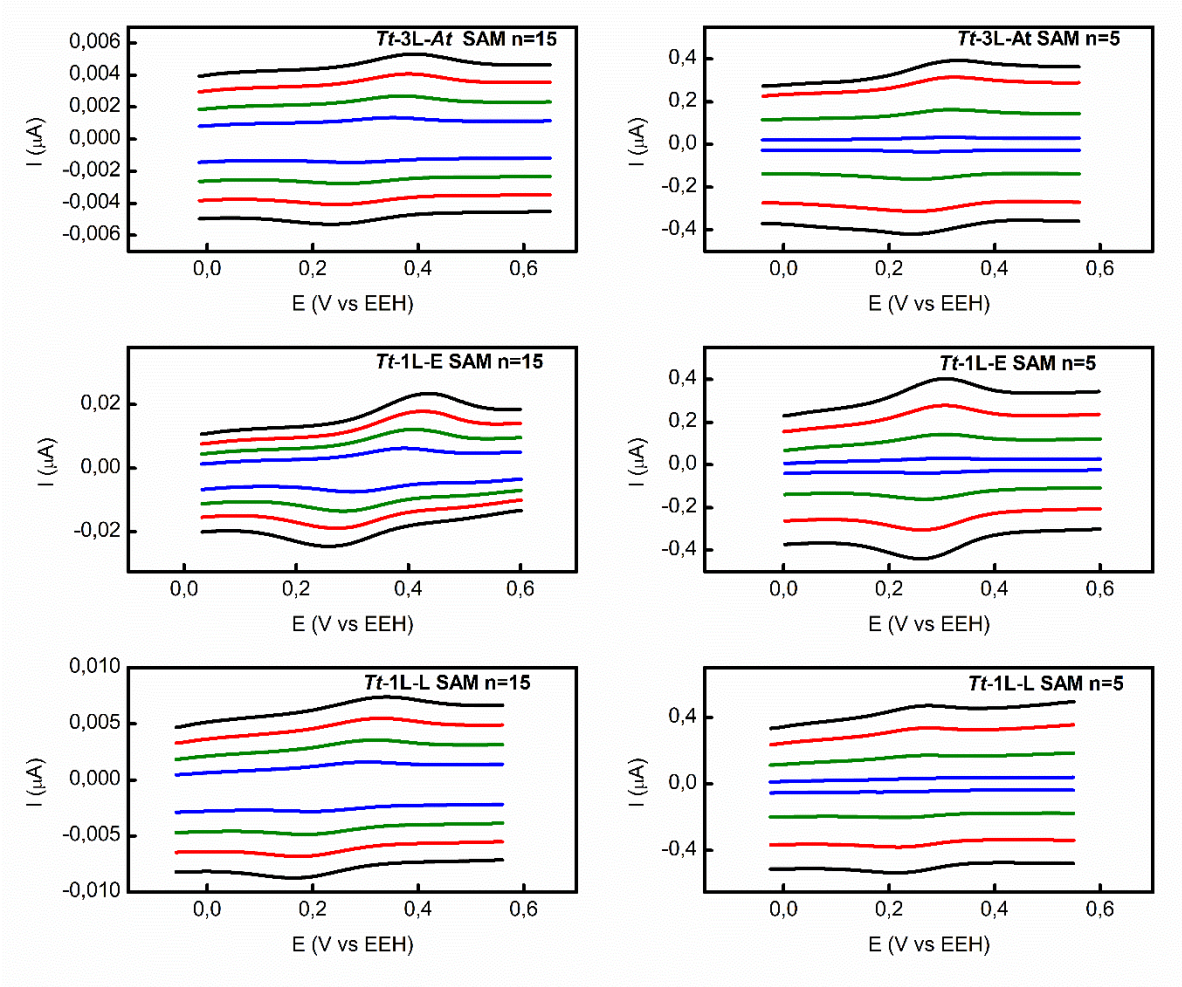


Figura 26: *Voltagramas de proteínas adsorbidas sobre SAMs mixtas SH-$(CH_2)_n$-OH y SH-$(CH_2)_n$-CH_3 en proporción 3:2, con n = 15 en el panel izquierdo, registrados empleando velocidades de barrido entre 50-500 $mV.s^{-1}$, y n = 5 en el panel derecho , registrados empleando velocidades de barrido entre 1-60 $V.s^{-1}$, a 298 K en buffer acetato 10 mM, pH 4,6, KNO_3 250 mM.*

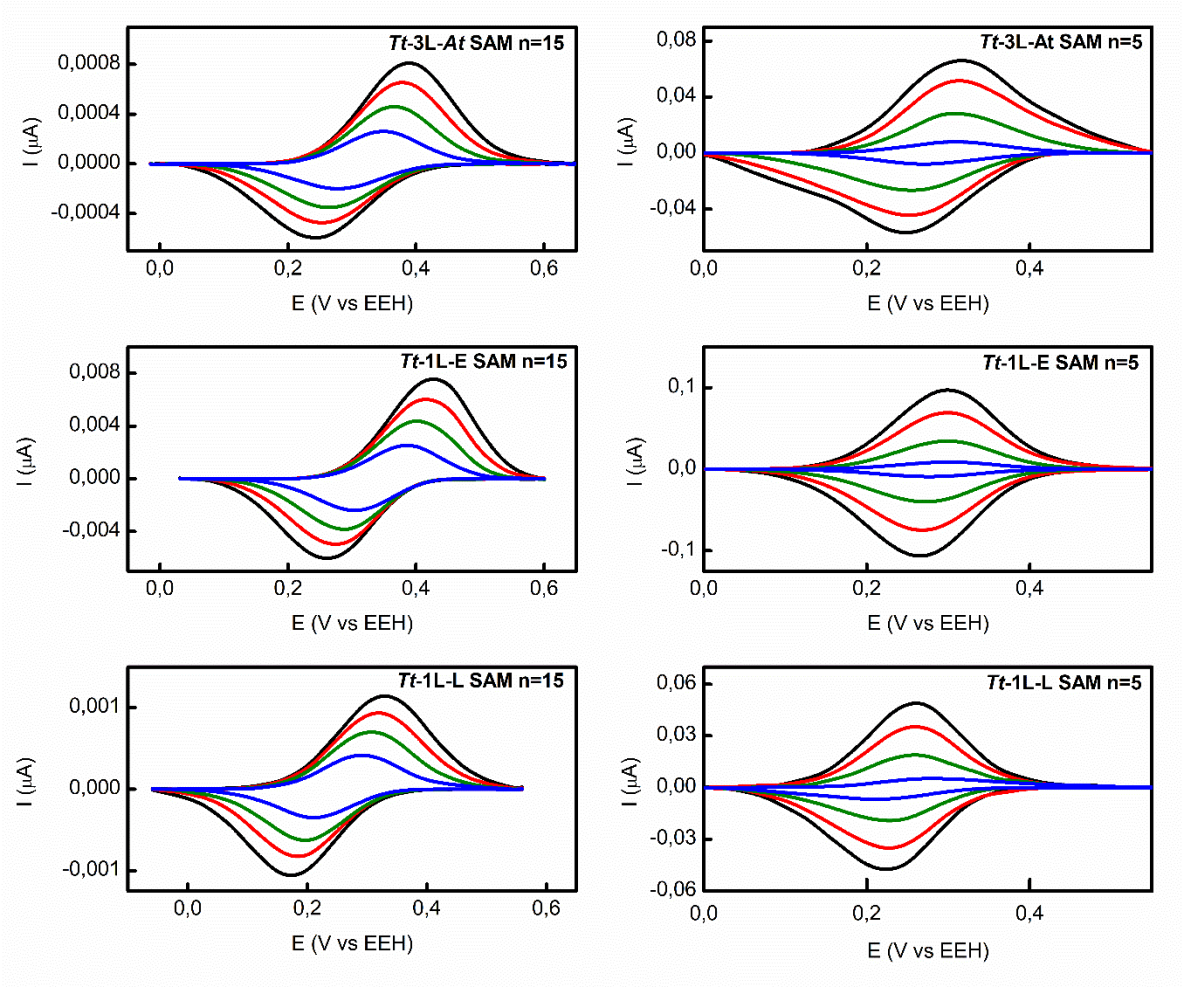


Figura 27: *Voltagramas de proteínas adsorbidas donde se sustrajo la corriente capacitiva dejando únicamente la corriente debido a la reacción de TE con la película proteica. Panel izquierdo empleando SAMs con n = 15, y panel derecho SAMs son n = 5.*

Las constantes de TE a sobrepotencial cero, k_{TE}^{o} fueron obtenidas a partir de la separación de picos anódico y catódico en función de la velocidad de barrido empleando el método de Laviron. Las curvas de Laviron determinadas a 298 K para las tres quimeras nuevas se presentan en la Figura 28 y las k_{TE}^{o} en la Tabla 7. Una observación que surge al comparar el comportamiento entre ambos largos de SAMs es notar que la separación de picos anódico y catódico es muy diferente. En SAMs largas la separación de picos es mayor que en SAMs cortas. Esto se debe a que la velocidad de la reacción de TE incrementa al aumentar el acoplamiento electrónico entre dador y receptor del electrón, en este caso la superficie del electrodo y el sitio metálico. Esto se ve reflejado en mayores valores en las k_{TE}^{o} , incluso de varios ordenes de magnitud. A partir de experimentos en función de la temperatura, en el rango 4-40°C, se determinaron las energías de activación a partir de un ajuste de Arrhenius, Figura 29. Bajo el supuesto de que en estas metaloproteínas la $\Delta S_{TE}^{\#}$ es un término pequeño, que fue verificado previamente[118], y dado que se está trabajando con sistemas en fase condensada pueden considerarse las siguientes aproximaciones, $\Delta E_{TE}^{\#} \cong \Delta H_{TE}^{\#} \cong \Delta G_{TE}^{\#} = \lambda/4$, de modo que a partir de estos experimentos se puede estimar la energía de reorganización, λ, de la teoría de

TE de Marcus. Como comentaremos hacia final de este capítulo, y extensamente en el capítulo siguiente, la energía de reorganización solo puede estimarse en condiciones de trabajo que garanticen un régimen de TE no adiabático, el cual solo se verifica para SAMs donde las distancias entre la superficie del electrodo y el sitio metálico son grandes (> 20 Å). Para el caso de SAMs con n = 5 solo puede estimarse una energía libre de activación *aparente*, $\Delta G^{\#}_{App}$, cuya interpretación será tratada en profundidad más adelante en este trabajo de tesis. En la Tabla 8 se presentan los valores obtenidos de ambos parámetros.

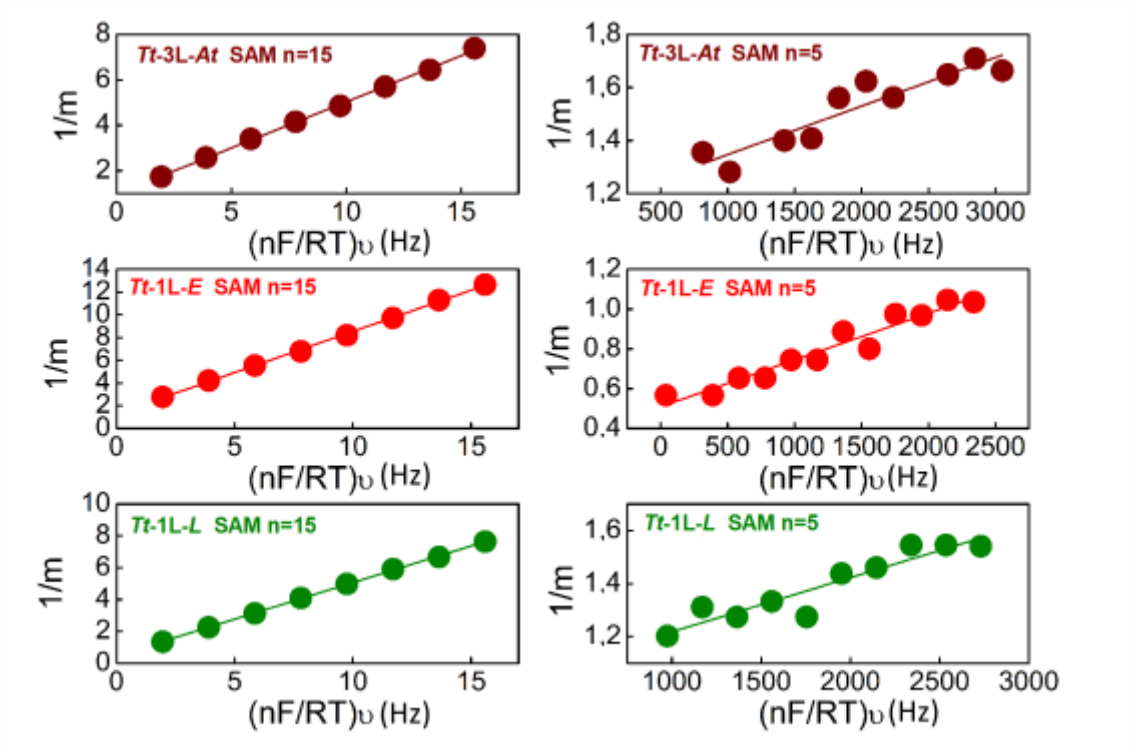


Figura 28: *Ajuste de Laviron a partir de los voltagramas presentados en las Figuras 26 y 27, a una temperatura de 298 K. A partir de las inversas de sus pendientes se obtienen los valores de k^{o}_{TE}, ver Tabla 7.*

Tabla 8: *Parámetros cinéticos de proteínas adsorbidas sobre electrodos de oro funcionalizados con SAMs con n = 15 y n = 5. Los valores correspondientes a Tt-Cu$_A$ y Tt-3L-Hs se incluyen aquí por completitud, pero su obtención es presentada en el Capítulo 5.*

	Tt-Cu$_A$	*Tt*-1L-E	*Tt*-1L-L	*Tt*-3L-*At*	*Tt*-3L-*Hs*
SAMs con n = 15					
$\Delta G^{\#}_{TE}$ (eV)	0,067 (±0,003)	0,074 (±0,007)	0,056 (±0,004)	0,128 (±0,003)	0,13 (±0,02)
λ (eV)	0,27 (±0,01)	0,30 (±0,03)	0,22 (±0,02)	0,51 (±0,01)	0,54 (±0,04)
SAMs con n = 5					
$\Delta G^{\#}_{App}$	0,08 (±0,01)	0,090 (±0,009)	0,067 (±0,006)	0,146 (±0,009)	0,15 (±0,01)
$\Delta G^{\#}_{F}$	0,013 (±0,013)	0,016 (±0,016)	0,011 (±0,010)	0,018 (±0,012)	0,02 (±0,03)

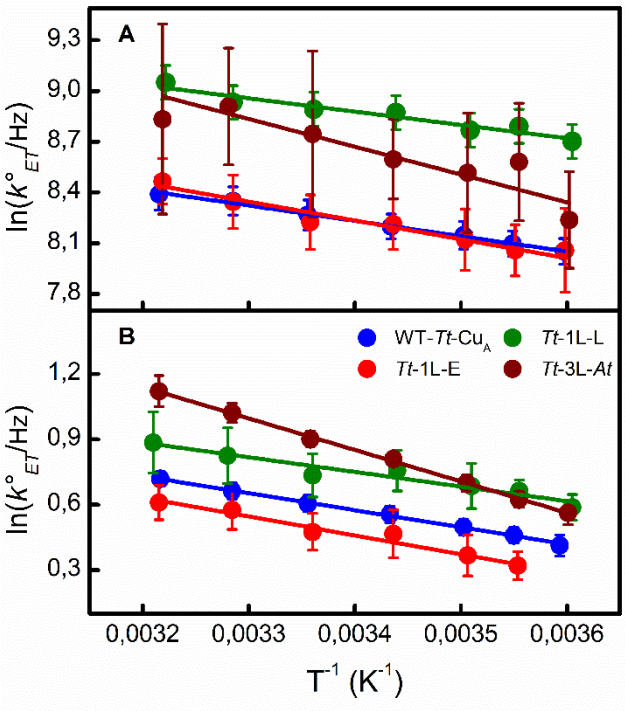


Figura 29: *Gráfico del logaritmo natural de la k^{o}_{TE} en función de la inversa de la temperatura, y sus respectivos ajustes de Arrhenius.* ***A.*** *Para SAMS con n = 5,* ***B.*** *para SAMs con n = 15.*

Este tratamiento da como resultado valores de λ de entre 0,2 y 0,3 eV para las dos quimeras *Tt*-1L y valores más altos de alrededor de 0,5 eV para la quimera *Tt*-3L-*At*. Una comparación con los valores obtenidos previamente para distintas variantes de *Tt*-Cu$_A$ revelan una distribución bimodal para este parámetro, ver Figura 30. El grupo con energías de reorganización bajas incluyen a *Tt*-Cu$_A$ silvestre, las mutantes puntuales M160Q y M160H (a pH bajo), y las dos mutantes *Tt*-1L, con un valor promedio de λ de 0,27 (±0,05) eV. Este grupo presenta valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de entre 440-900 cm^{-1}. En el grupo de altas energías de reorganización se encuentra la mutante puntual M160H (pH altos), las dos quimeras *Tt*-3L, con bucles de humano y planta, y la variante *Tt*-3L-*Hs*-M160H. Este grupo presenta un valor promedio de λ de 0,53 (±0,05) eV y valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ de entre 12-256 cm^{-1}. Es interesante que la mutante M160H presente un valor bajo de λ al presentar un valor alto de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ a pH 3,5 y un valor alto de λ al presentar un valor bajo de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, a pH 7[95]. Por otra parte, como se señaló anteriormente, cálculos QM del sitio de Cu$_A$ predicen valores de λ de 0,3 y 0,6 eV para cuando la reacción de TE ocurre desde los estado fundamentales alternativos σ_u^* o π_u, respectivamente[92]. Estos valores se parecen a los que se observan en ambos grupos descriptos, sugiriendo que los experimentos electroquímicos sensan únicamente uno solo de ambos estados fundamentales, siendo el σ_u^* el estado redox activo en el primer grupo (λ bajos) y el π_u en el segundo grupo (λ altos).

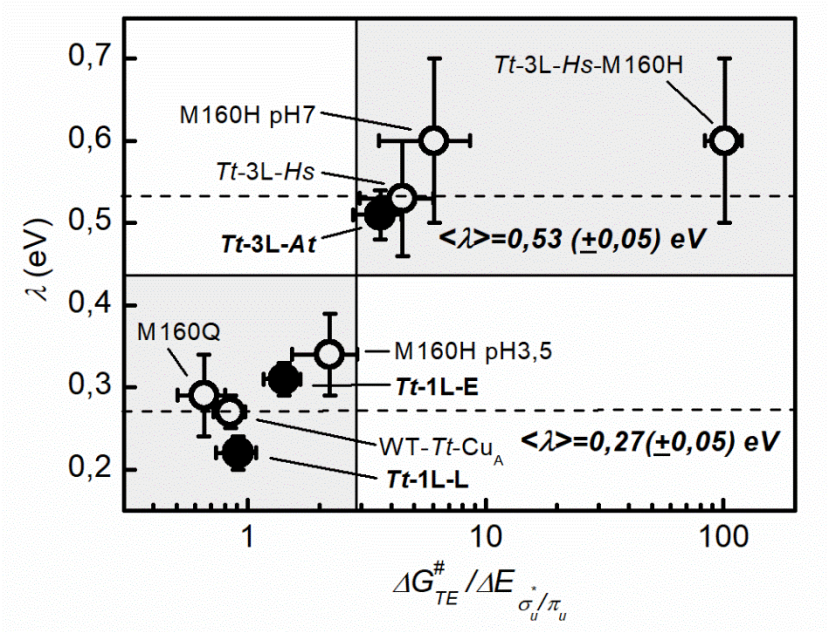


Figura 30: *Gráfico de las energías de reorganización de diferentes variantes en función del cociente entre la energía de activación, $\Delta G^{\#}_{TE}$, y el energy gap entre los estados fundamentales σ^*_u y π_u, $\Delta E_{\sigma^*_u/\pi_u}$. Todos los valores corresponden a pH 4,6, salvo para la variante M160H que se informa a dos pH diferentes, y la variante Tt-3L-Hs-M160H que se informa únicamente a pH 7. Los símbolos llenos corresponden a las quimeras nuevas y los símbolos vacíos a datos de estudios previos de nuestro laboratorio, tomados de la referencia*[107].

Esta selectividad del estado redox activo puede ser racionalizado en términos de la accesibilidad térmica del estado alternativo π_u y el fuerte acoplamiento de las coordenadas de reacción la TE y la interconversión $\sigma^*_u \rightarrow \pi_u$. Existe evidencia espectroscópica indirecta que sugiere fuertemente que estos dos procesos están efectivamente acoplados. Por un lado, estudios de EXAFS sobre *Tt*-Cu$_A$ y las mutantes puntuales M160Q y M160H muestran pequeñas variaciones en la distancia Cu-Cu en ambos estados redox que indican que esta reorganización nuclear puede estar relacionada con la reacción de TE[92]. Por otro lado, experimentos recientes demostraron que la distancia Cu-Cu determina indefectiblemente las poblaciones relativas σ^*_u/π_u.[96]

Tal como se comentó en la introducción, bajo la hipótesis de que la reacción de TE y la interconversión $\sigma^*_u \rightarrow \pi_u$ se encuentran fuertemente acopladas, se pueden visualizar dos escenarios dependiendo de las magnitudes relativas entre los dos parámetros clave: $\Delta G^{\#}_{TE}$ y $\Delta E_{\sigma^*_u/\pi_u}$. Para aquellas variantes que cumplen la condición de que $\Delta E_{\sigma^*_u/\pi_u} > \Delta G^{\#}_{TE}$ la reacción de TE ocurrirá exclusivamente a partir del estado fundamental σ^*_u, Figura 14-A. Por otro lado, si la diferencia de energía entre estados es mucho menor que la barrera de activación, $\Delta E_{\sigma^*_u/\pi_u} < \Delta G^{\#}_{TE}$, entonces la reacción ocurrirá exclusivamente a partir del estado π_u, Figura-14-B. Esto último es consistente con el hecho de que, a pesar de que inicialmente la población σ^*_u es mayoritaria a las temperaturas de trabajo empleadas para casi todas las variantes, en los experimentos de VC solo se observa una única cupla redox, es decir, no se observa actividad

de dos poblaciones con cinéticas diferentes. Esto quiere decir que el hecho de poder acceder más fácilmente al estado alternativo π_u, permite que durante la reacción de TE *todas* las proteínas accedan a este estado antes de llevarse a cabo la TE, deshabilitando esta reacción desde el estado fundamental σ_u^*. Este hecho es una de las observaciones más fuertes en favor de esta hipótesis de acoplamiento de coordenadas de reacción. Es importante señalar también que en el rango de temperaturas utilizado para obtener los parámetros de activación las poblaciones relativas σ_u^*/π_u no varían significativamente por efecto del incremento en la temperatura, Figura 31. Si esto no fuera así los gráficos de Arrhenius se desviarían de la linealidad debido a diferencias en los valores de k_{TE}^o por su obvia diferente dependencia térmica. En todos los casos se obtuvieron dependencias lineales de k_{TE}^o vs T, Figura 29, confirmando que solo uno de ambos estados fundamentales es redox activo.

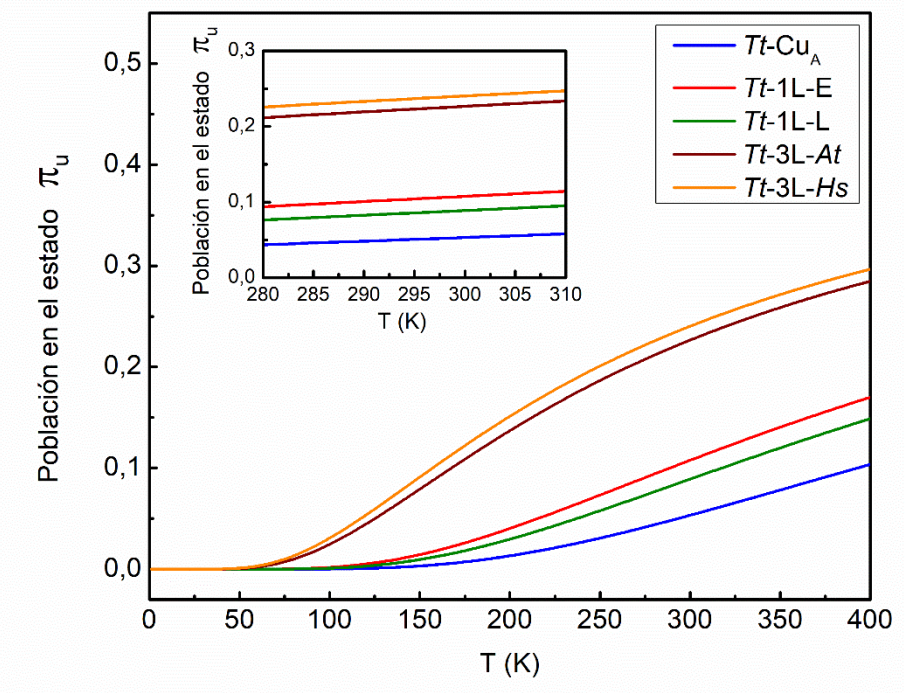


Figura 31: *Población del estado fundamental alternativo π_u para todas las variantes de Cu$_A$ en el rango de 0-400 K, estimados utilizando la ecuación de Boltzmann empleando los valores de $\Delta E_{\sigma/\pi}$ a pH 7 presentados en la Tabla 4. El gráfico insertado presenta la población del estado π_u en el rango de temperaturas empleado en las determinaciones electroquímicas, donde puede observarse que no hay grandes cambios en el valor de las poblaciones π_u.*

Los resultados obtenidos para las nuevas quimeras son consistentes con esta hipótesis de manera cualitativa. Tal como puede observarse en la Figura 30 tanto la mutante puntual M160H a pH bajo como la quimera *Tt*-1L-E presentan cocientes $\Delta G_{TE}^{\#}/\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ ligeramente mayores que 1. Esto parecería contradecir el requerimiento asumido por la hipótesis de trabajo necesario para que la reacción de TE transcurra por el estado fundamental σ_u^*, es decir, que $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u} > \Delta G_{TE}^{\#}$. Sin embargo, se deben tener en cuenta todas las posibles contribuciones a la energía de reorganización, tanto las internas, λ^{int}, debidas a cambios en la estructura nuclear

y electrónica del sitio de Cu_A, como a las externas, λ^{ext}, aportadas principalmente por reordenamiento de moléculas de solvente. Un análisis basado en pequeñas diferencias en ambas componentes permite reconciliar este resultado con la hipótesis de trabajo. Todas las variantes de Cu_A estudiadas presentan inevitablemente estas dos contribuciones a la energía de reorganización. Más aún, el hecho de que experimentalmente exista heterogeneidad en los valores de λ dentro de cada grupo, es decir, aquellas que transfieren desde el estado σ_u^* o las que transfieren desde el estado π_u, indica que existen diferencias en estas componentes internas y externas. Y muy probablemente diferencias en la componente λ^{ext} sea la razón de esta discrepancia en estas dos variantes en particular. Por un lado, M160H presentan una fuerte dependencia con el pH, que es causada por la protonación del ligando axial histidina, y su posible descoordinación del átomo de Cu, lo que sugiere que la exposición a solvente se ve incrementada para estos valores de pH, lo que inevitablemente aumentará la componente λ^{ext}. Del mismo modo, en la quimera *Tt*-1L-E el bucle intercambiado se encuentra en las vecindades de sitio metálico, sin embargo, no involucra residuos coordinantes, y su movilidad podría ser mayor que la se aquellos bucles que si llevan residuos coordinantes. Salvando las diferencias, este concepto es análogo a la movilidad incrementada en apoproteínas respecto a la holoproteínas, donde hay formación de nuevos enlaces que anclan los bucles[119]. De esta manera, el bucle al presentar una menor complementariedad con el resto de los bucles, y no presentar enlaces directos con ninguno de los dos átomos de cobre permitiría al solvente acceder a las vecindades del sitio metálico más fácilmente, incrementando la componente λ^{ext}.

El hecho de que dentro de cada grupo los valores de λ obtenidos experimentalmente sean muy próximos a los calculados de forma teórica para uno u otro estado fundaméntela alternativo, indica que la componente λ^{int} es la dominante en estas metaloproteínas, en claro contraste con las quimeras con sitios T1 dentro de esta misma matriz proteica. Esto no es una sorpresa ya que, como comentamos exhaustivamente, tal matriz fue moldeada a lo largo de la historia evolutiva para albergar un sitio binuclear conformado por tres bucles, con un bucle de ligandos con 12 residuos de longitud con un motivo conservado. De este modo, todas las variantes de Cu_A estudiadas presentan perturbaciones estructurales mucho menores que las quimeras de T1 presentadas en el capítulo anterior, y por ende el sitio de Cu_A se encuentra más ocluido por la segunda esfera de coordinación. Por este motivo se espera que la accesibilidad al solvente sea mucho menor en los centros de Cu_A, y que $\lambda^{ext} \ll \lambda^{int}$ para este conjunto de quimeras.

Recapitulando, lo que determina la posibilidad del acceso al estado alternativo π_u es la magnitud de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, que queda determinada por múltiples distorsiones geométricas del sitio metálico. Al estar acopladas las coordenadas de reacción de la TE y de la interconversión $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$ ambas ocurren simultáneamente. Ahora bien, en este modelo los valores de lambda, obtenidos por cálculos, que se corresponden de manera razonable con los experimentales, solo involucran cambios estructurales del centro metálico, de modo que las condiciones requeridas según esta hipótesis deberían ser, estrictamente, las siguientes: Si $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u} > \Delta G_{TE}^{\#\,Interna}$ entonces la reacción de TE procede desde el estado fundamental σ_u^*, y si $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u} < \Delta G_{TE}^{\#\,Interna}$ entonces la reacción de TE procede desde el estado alternativo π_u. Al aumentar la exposición

del metal al solvente aumentará la energía de activación global de la TE pero no tendría influencia alguna sobre su componente interna, que es la que determinaría la accesibilidad al estado fundamental determinando desde donde tiene lugar la reacción. Así las dos variantes M160H (pH 3,5) y *Tt*-1L-E transfieren desde el estado σ_u^* , consistentemente con sus valores de $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, pero poseen cocientes $\Delta G_{TE}^{\#}/\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$ ligeramente mayores que 1, debido a que se tiene que $\Delta G_{TE}^{\#} > \Delta G_{TE}^{\#\,Interna}$, cuando para el resto de las variantes del primer grupo se verifica que $\Delta G_{TE}^{\#} \approx \Delta G_{TE}^{\#\,Interna}$.

La caracterización cinética descripta en secciones anteriores mediante técnicas electroquímicas se extendió a SAMs mixtas de SH-$(CH_2)_n$-OH y SH-$(CH_2)_n$-CH_3 en una relación 3:2 con n = 5. Voltagramas representativos, con y sin corriente capacitiva, y curvas de Laviron a 298 K se presentan en los paneles derechos las Figuras 26, 27 y 28. Los ajustes de Arrhenius se presentan en la Figura 29-A. A partir de esos ajustes se obtuvo el valor de la energía de activación de TE aparente, $\Delta G_{App}^{\#}$, Tabla 8. Los valores obtenidos representan incrementos de alrededor de 11 y 23% con respecto a los valores de energías de activación obtenidos en SAMs más largas, demostrando la existencia de cierta dependencia con el largo de la SAM, y por ende, con el acoplamiento electrónico entre el centro metálico y la superficie del electrodo. Este comportamiento no es compatible con una explicación de la reacción de TE bajo el modelo de Marcus, y ha sido interpretada por nosotros[109,120], y otros[117,118,121], en términos de un mecanismo de TE de control friccional. Si bien este tema será tratado en el capítulo siguiente en detalle, podemos adelantar ciertas observaciones relevantes para la discusión actual. La teoría de Marcus no predice aumento alguno de la energía de activación al cambiar el acoplamiento electrónico, sin embargo, experimentalmente, esto es lo que se observa. Este incremento ha sido tratado directamente como un término energético extra $\Delta G_F^{\#}$, , que se suma a la energía activación de Marcus, $\Delta G_{TE}^{\#}$, cuya suma da la energía de activación observada, $\Delta G_{App}^{\#} = \Delta G_{TE}^{\#} + \Delta G_F^{\#}$. Este término, llamado también término friccional, ha sido relacionado con una mayor influencia de la dinámica proteica/solvente sobre el paso determinante de la velocidad de la reacción de TE. Esto último debido a que bajo estas mismas condiciones es decir, a SAMs cortas, la k_{TE} presenta una dependencia hiperbólica descendente con el aumento de la viscosidad del medio, lo que se espera que afecte la facilidad con que la proteína pueda explorar el espacio conformacional. El primer término se corresponde con la energía activación de Marcus y es el valor obtenido en SAMs largas, n = 15, mientras que la $\Delta G_{App}^{\#}$ corresponde al valor experimental obtenido a SAMs cortas, n = 5, de modo que el término friccional, $\Delta G_F^{\#}$, puede obtenerse por diferencia. Si bien, este tratamiento es aproximado, como veremos más adelante, nos permite extraer conclusiones cualitativas parciales. El término $\Delta G_F^{\#}$ resulta muy similar entre todas las variantes de Cu_A estudiadas, y curiosamente difiere de aquel determinado para otras metaloproteínas mediante técnicas comparables a las empleadas aquí. Mientras que el conjunto de variantes de Cu_A comparten un valor promedio de $\Delta G_F^{\#}$ de 0,015 (±0,003)eV, las proteínas azurina, que contiene un sitio de cobre de T1, y citocromo *c* que contiene un grupo hemo, presentan valores de 0,071 eV y 0,13 eV respectivamente[117,118,122]. Entonces, en vista de estos resultados se pueden enunciar dos corolarios, el primero es que este incremento de la energía de activación depende de la metaloproteína en cuestión, ya que su valor no es constante a lo largo de las tres

metaloproteínas estudiadas. Por otro lado, no hay una correlación clara entre el valor de este término y el estado fundamental alternativo, σ_u^* o π_u, desde el que tiene lugar la TE, dado que las quimeras *Tt*-1L-E y *Tt*-3L-*At* poseen exactamente el mismo valor de $\Delta G_F^{\#}$, 0,018eV, pero transfieren desde estado electrónicos distintos. Entonces este incremento no parece verse afectado por los cambios estructurales entre estado oxidado y reducido, que es lo que determina el valor de la energía de activación interna, $\Delta G_{TE}^{\# Interna}$, sugiriendo un origen diferente para esta nueva contribución de activación.

4.6- Conclusiones

Los resultados tratados en esta sección demuestran que la diferencia de energía entre los dos estados alternativos, σ_u^* y π_u, pueden ser sistemáticamente modulados no solo por mutaciones puntuales de la esfera de coordinación primaria, altamente conservada en estos sitios metálicos, sino también mediante el intercambio de bucles que conforman la segunda esfera de coordinación del centro de Cu_A, preservando los ligandos del átomo de cobre. Este estudio de ingeniería de bucles nos permitió evaluar los efectos que poseen pequeñas perturbaciones introducidas en el sitio de Cu_A sobre los parámetros termodinámicos, cinéticos y dinámicos de la reacción redox, responsables de su modulación fina. Los parámetros termodinámicos exhiben una compensación entrópico/entálpica parcial que es compatible con el hecho de que la componente entrópica del E°´ presenta una buena correlación con la accesibilidad del estado alternativo π_u. Esta accesibilidad, regulada por el valor de la diferencia energética entre estados, $\Delta E_{\sigma/\pi}$, modula la magnitud de la función de partición electrónica en el estado oxidado determinando así el número de micro estados posibles, lo que en última instancia define de forma robusta los valores de entropía. Por otro lado, los resultados expuestos aquí validan la hipótesis de un acoplamiento de las coordenadas de reacción de la TE y la interconversión $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$, demostrando que ambos estados fundamentales pueden ser redox activos dependiendo de la magnitud relativa de los valores de $\Delta G_{TE}^{\# Interna}$ y $\Delta E_{\sigma_u^*/\pi_u}$, que a su vez, son modulados por residuos de primera y segunda esfera de coordinación, cuyo reemplazo genera cambios geométricos y electrónicos dependientes del estado redox. Por último, se mostró que bajo condiciones de un elevado acoplamiento electrónico entre el sitio redox de la proteína y la superficie del electrodo, el incremento experimental que sufre la energía de activación, es decir, el término $\Delta G_F^{\#}$, es similar en todas las variantes, reflejando efectos de la dinámica proteica del plegamiento de *Tt*-Cu_A sobre la TE más que efectos de cambios en la geometría del sitio Cu_A.

4.7- Referencias

[1] G.T. Babcock, M. Wikström, Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, Nature. 356 (1992) 301–309. https://doi.org/10.1038/356301a0.

[2] P. MITCHELL, Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by Proticity, Biochemical Society Transactions. 4 (1976) 399–430. https://doi.org/10.1042/bst0040399.

[3] P.R. Rich, A perspective on Peter Mitchell and the chemiosmotic theory, J Bioenerg Biomembr. 40 (2008) 407–410. https://doi.org/10.1007/s10863-008-9173-7.

[4] A.M. Morelli, S. Ravera, D. Calzia, I. Panfoli, An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane, Open Biology. 9 (n.d.) 180221. https://doi.org/10.1098/rsob.180221.

[5] J. Hemp, R.B. Gennis, Diversity of the Heme–Copper Superfamily in Archaea: Insights from Genomicsand Structural Modeling, in: G. Schäfer, H.S. Penefsky (Eds.), Bioenergetics: Energy Conservation and Conversion, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008: pp. 1–31. https://doi.org/10.1007/400_2007_046.

[6] C. Brochier-Armanet, E. Talla, S. Gribaldo, The Multiple Evolutionary Histories of Dioxygen Reductases: Implications for the Origin and Evolution of Aerobic Respiration, Molecular Biology and Evolution. 26 (2009) 285–297. https://doi.org/10.1093/molbev/msn246.

[7] M.M. Pereira, M. Santana, M. Teixeira, A novel scenario for the evolution of haem–copper oxygen reductases, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1505 (2001) 185–208. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00169-4.

[8] M.M. Pereira, M. Teixeira, Proton pathways, ligand binding and dynamics of the catalytic site in haem-copper oxygen reductases: a comparison between the three families, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1655 (2004) 340–346. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2003.06.003.

[9] M.M. Pereira, F.L. Sousa, A.F. Veríssimo, M. Teixeira, Looking for the minimum common denominator in haem–copper oxygen reductases: Towards a unified catalytic mechanism, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1777 (2008) 929–934. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2008.05.441.

[10] F.L. Sousa, R.J. Alves, M.A. Ribeiro, J.B. Pereira-Leal, M. Teixeira, M.M. Pereira, The superfamily of heme–copper oxygen reductases: Types and evolutionary considerations, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1817 (2012) 629–637. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.09.020.

[11] F.L. Sousa, R.J. Alves, J.B. Pereira-Leal, M. Teixeira, M.M. Pereira, A Bioinformatics Classifier and Database for Heme-Copper Oxygen Reductases, PLOS ONE. 6 (2011) e19117. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019117.

[12] W.G. Zumft, Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type, Journal of Inorganic Biochemistry. 99 (2005) 194–215. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.024.

[13] M. Radzi Noor, T. Soulimane, Bioenergetics at extreme temperature: Thermus thermophilus ba3- and caa3-type cytochrome c oxidases, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1817 (2012) 638–649. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.08.004.

[14] B.L. Trumpower, R.B. Gennis, Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation, Annual Review of Biochemistry. 63 (1994) 675–716. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.003331.

[15] M. Lübben, K. Morand, Novel prenylated hemes as cofactors of cytochrome oxidases. Archaea have modified hemes A and O., Journal of Biological Chemistry. 269 (1994) 21473–21479. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31828-8.

[16] J.A. Fee, D. Kuila, M.W. Mather, T. Yoshida, Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics. 853 (1986) 153–185. https://doi.org/10.1016/0304-4173(86)90009-1.

[17] M.W. Mather, P. Springer, J.A. Fee, Cytochrome oxidase genes from Thermus thermophilus. Nucleotide sequence and analysis of the deduced primary structure of subunit IIc of cytochrome caa3., Journal of Biological Chemistry. 266 (1991) 5025–5035. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67751-3.

[18] M.W. Mather, P. Springer, S. Hensel, G. Buse, J.A. Fee, Cytochrome oxidase genes from Thermus thermophilus. Nucleotide sequence of the fused gene and analysis of the deduced primary structures for subunits I and III of cytochrome caa3., Journal of Biological Chemistry. 268 (1993) 5395–5408. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53335-4.

[19] G. Buse, S. Hensel, J.A. Fee, Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome c– subunit II fused protein in the cytochrome 'c1aa3' of Thermus thermophilus, European Journal of Biochemistry. 181 (1989) 261–268. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14720.x.

[20] J.A. Lyons, D. Aragão, O. Slattery, A.V. Pisliakov, T. Soulimane, M. Caffrey, Structural insights into electron transfer in caa3-type cytochrome oxidase, Nature. 487 (2012) 514–518. https://doi.org/10.1038/nature11182.

[21] J.A. Keightley, B.H. Zimmermann, M.W. Mather, P. Springer, A. Pastuszyn, D.M. Lawrence, J.A. Fee, Molecular Genetic and Protein Chemical Characterization of the Cytochrome ba3 from Thermus thermophilus HB8 (∗), Journal of Biological Chemistry. 270 (1995) 20345–20358. https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20345.

[22] T. Tiefenbrunn, W. Liu, Y. Chen, V. Katritch, C.D. Stout, J.A. Fee, V. Cherezov, High Resolution Structure of the ba3 Cytochrome c Oxidase from Thermus thermophilus in a Lipidic Environment, PLOS ONE. 6 (2011) e22348. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022348.

[23] Structure and mechanism of the aberrant ba3-cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus, The EMBO Journal. 19 (2000) 1766–1776. https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1766.

[24] P.A. Williams, N.J. Blackburn, D. Sanders, H. Bellamy, E.A. Stura, J.A. Fee, D.E. McRee, The Cu A domain of Thermus thermophilus ba 3 -type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution, Nat Struct Mol Biol. 6 (1999) 509–516. https://doi.org/10.1038/9274.

[25] T. Soulimane, G. Buse, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, M.E. Than, Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from thermus thermophilus, EMBO J. 19 (2000) 1766–1776. https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1766.

[26] L. Muresanu, P. Pristovsek, F. Löhr, O. Maneg, M.D. Mukrasch, H. Rüterjans, B. Ludwig, C. Lücke, The Electron Transfer Complex between Cytochrome c552 and the CuA Domain of the Thermus thermophilus ba3 Oxidase: A COMBINED NMR AND COMPUTATIONAL APPROACH * ♦, Journal of Biological Chemistry. 281 (2006) 14503–14513. https://doi.org/10.1074/jbc.M601108200.

[27] V. Drosou, B. Reincke, M. Schneider, B. Ludwig, Specificity of the Interaction between the Paracoccus denitrificans Oxidase and Its Substrate Cytochrome c: Comparing the Mitochondrial to the Homologous Bacterial Cytochrome c552, and Its Truncated and Site-Directed Mutants, Biochemistry. 41 (2002) 10629–10634. https://doi.org/10.1021/bi020094k.

[28] V. Drosou, F. Malatesta, B. Ludwig, Mutations in the docking site for cytochrome c on the Paracoccus heme aa3 oxidase, European Journal of Biochemistry. 269 (2002) 2980–2988. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02979.x.

[29] H. Witt, F. Malatesta, F. Nicoletti, M. Brunori, B. Ludwig, 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 *, Journal of Biological Chemistry. 273 (1998) 5132–5136. https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5132.

[30] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans, Nature. 376 (1995) 660–669. https://doi.org/10.1038/376660a0.

[31] E.T. Adman, Copper Protein Structures, in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, D.S. Eisenberg (Eds.), Advances in Protein Chemistry, Academic Press, 1991: pp. 145–197. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60536-7.

[32] H. Beinert, Copper A of Cytochrome c Oxidase, A Novel, Long-Embattled, Biological Electron-Transfer Site, European Journal of Biochemistry. 245 (1997) 521–532. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00521.x.
[33] C. Dennison, Investigating the structure and function of cupredoxins, Coordination Chemistry Reviews. 249 (2005) 3025–3054. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.021.
[34] C. Dennison, The role of ligand-containing loops at copper sites in proteins, Natural Product Reports. 25 (2008) 15–24. https://doi.org/10.1039/B707987G.
[35] M.N. Morgada, L.A. Abriata, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, D.H. Murgida, A.J. Vila, Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations, Angewandte Chemie International Edition. 53 (2014) 6188–6192. https://doi.org/10.1002/anie.201402083.
[36] W.E. Antholine, D.H.W. Kastrau, G.C.M. Steffens, G. Buse, W.G. Zumft, P.M.H. Kroneck, A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome c oxidase, European Journal of Biochemistry. 209 (1992) 875–881. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17360.x.
[37] P.M.H. Kroneck, W.A. Antholine, J. Riester, W.G. Zumft, The cupric site in nitrous oxide reductase contains a mixed-valence [Cu(II),Cu(I)] binuclear center: A multifrequency electron paramagnetic resonance investigation, FEBS Letters. 242 (1988) 70–74. https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80987-6.
[38] B.C. Berks, S.J. Ferguson, J.W.B. Moir, D.J. Richardson, Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1232 (1995) 97–173. https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00092-5.
[39] K. Brown, M. Tegoni, M. Prudêncio, A.S. Pereira, S. Besson, J.J. Moura, I. Moura, C. Cambillau, A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase, Nat Struct Mol Biol. 7 (2000) 191–195. https://doi.org/10.1038/73288.
[40] T. Rasmussen, B.C. Berks, J. Sanders-Loehr, D.M. Dooley, W.G. Zumft, A.J. Thomson, The Catalytic Center in Nitrous Oxide Reductase, CuZ, Is a Copper−Sulfide Cluster, Biochemistry. 39 (2000) 12753–12756. https://doi.org/10.1021/bi001811i.
[41] T. HALTIA, K. BROWN, M. TEGONI, C. CAMBILLAU, M. SARASTE, K. MATTILA, K. DJINOVIC-CARUGO, Crystal structure of nitrous oxide reductase from Paracoccus denitrificans at 1.6 A resolution, Biochemical Journal. 369 (2003) 77–88. https://doi.org/10.1042/bj20020782.
[42] K. Paraskevopoulos, S.V. Antonyuk, R.G. Sawers, R.R. Eady, S.S. Hasnain, Insight into Catalysis of Nitrous Oxide Reductase from High-resolution Structures of Resting and Inhibitor-bound Enzyme from Achromobacter cycloclastes, Journal of Molecular Biology. 362 (2006) 55–65. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.064.
[43] A. Pomowski, W.G. Zumft, P.M.H. Kroneck, O. Einsle, N2O binding at a [4Cu:2S] copper–sulphur cluster in nitrous oxide reductase, Nature. 477 (2011) 234–237. https://doi.org/10.1038/nature10332.
[44] S.I. Gorelsky, S. Ghosh, E.I. Solomon, Mechanism of N2O Reduction by the μ4-S Tetranuclear CuZ Cluster of Nitrous Oxide Reductase, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 278–290. https://doi.org/10.1021/ja055856o.
[45] C. Zhang, T.C. Hollocher, The reaction of reduced cytochromes c with nitrous oxide reductase of Wolinella succinogenes, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1142 (1993) 253–261. https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90153-7.
[46] M. Koutný, I. Kučera, R. Tesařík, J. Turánek, R.J.M. Van Spanning, Pseudoazurin mediates periplasmic electron flow in a mutant strain of Paracoccus denitrificans lacking cytochrome c550, FEBS Letters. 448 (1999) 157–159. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00345-2.
[47] J.W.B. Moir, S.J.Y. 1994 Ferguson, Properties of a Paracoccus denitrificans mutant deleted in cytochrome c550 indicate that a copper protein can substitute for this cytochrome in electron

transport to nitrite, nitric oxide and nitrous oxide, Microbiology. 140 (n.d.) 389–397. https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-389.

[48] T. Rasmussen, T. Brittain, B. C. Berks, N. J. Watmough, A. J. Thomson, Formation of a cytochrome c – nitrous oxide reductase complex is obligatory for N 2 O reduction by Paracoccus pantotrophus, Dalton Transactions. 0 (2005) 3501–3506. https://doi.org/10.1039/B501846C.

[49] M.O. Ross, O.S. Fisher, M.N. Morgada, M.D. Krzyaniak, M.R. Wasielewski, A.J. Vila, B.M. Hoffman, A.C. Rosenzweig, Formation and electronic structure of an atypical CuA site, J. Am. Chem. Soc. (2019). https://doi.org/10.1021/jacs.8b13610.

[50] A.E. Osbourn, B. Field, Operons, Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 3755–3775. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0114-3.

[51] P.M. Li, B.G. Malmström, S.I. Chan, The nature of CuA in cytochrome c oxidase, FEBS Letters. 248 (1989) 210–211. https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80463-6.

[52] J. Peisach, W.E. Blumberg, Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins, Archives of Biochemistry and Biophysics. 165 (1974) 691–708. https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90298-7.

[53] W.B. Mims, J. Peisach, R.W. Shaw, H. Beinert, Electron spin echo studies of cytochrome c oxidase., Journal of Biological Chemistry. 255 (1980) 6843–6846. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43650-2.

[54] H. Beinert, D.E. Griffiths, D.C. Wharton, R.H. Sands, Properties of the Copper Associated with Cytochrome Oxidase as Studied by Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Journal of Biological Chemistry. 237 (1962) 2337–2346. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)63443-5.

[55] J.A. Farrar, P. Lappalainen, W.G. Zumft, M. Saraste, A.J. Thomson, Spectroscopic and Mutagenesis Studies on the CuA Centre from The Cytochrome-c Oxidase Complex of Paracoccus Denitrificans, European Journal of Biochemistry. 232 (1995) 294–303. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20811.x.

[56] C. von Wachenfeldt, S. de Vries, J. van der Oost, The CuAsite of the caa3-type oxidase of Bacillus subtilis is a mixed-valence binuclear copper centre, FEBS Letters. 340 (1994) 109–113. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80182-7.

[57] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å, Science. 269 (1995) 1069–1074. https://doi.org/10.1126/science.7652554.

[58] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å, Science. 272 (1996) 1136–1144. https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136.

[59] M. Wilmanns, P. Lappalainen, M. Kelly, E. Sauer-Eriksson, M. Saraste, Crystal structure of the membrane-exposed domain from a respiratory quinol oxidase complex with an engineered dinuclear copper center, PNAS. 92 (1995) 11955–11959. https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.11955.

[60] S. Larsson, B. Källebring, P. Wittung, B.G. Malmström, The CuA center of cytochrome-c oxidase: electronic structure and spectra of models compared to the properties of CuA domains, PNAS. 92 (1995) 7167–7171. https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7167.

[61] N.J. Blackburn, M.E. Barr, W.H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 A copper-copper bond in the CuA center of cytochrome oxidase, Biochemistry. 33 (1994) 10401–10407. https://doi.org/10.1021/bi00200a022.

[62] C.E. Slutter, D. Sanders, P. Wittung, B.G. Malmström, R. Aasa, J.H. Richards, H.B. Gray, J.A. Fee, Water-Soluble, Recombinant CuA-Domain of the Cytochrome ba3 Subunit II from Thermus thermophilus, Biochemistry. 35 (1996) 3387–3395. https://doi.org/10.1021/bi9525839.

[63] Y. Lu, Biosynthetic Inorganic Chemistry, Angewandte Chemie International Edition. 45 (2006) 5588–5601. https://doi.org/10.1002/anie.200600168.

[64] M.G. Savelieff, Y. Lu, CuA centers and their biosynthetic models in azurin, J Biol Inorg Chem. 15 (2010) 461–483. https://doi.org/10.1007/s00775-010-0625-2.

[65] M. Gennari, J. Pécaut, S. DeBeer, F. Neese, M.-N. Collomb, C. Duboc, A Fully Delocalized Mixed-Valence Bis-μ(Thiolato) Dicopper Complex: A Structural and Functional Model of the Biological CuA Center, Angewandte Chemie. 123 (2011) 5780–5784. https://doi.org/10.1002/ange.201100605.
[66] R.P. Houser, V.G. Young, W.B. Tolman, A Thiolate-Bridged, Fully Delocalized Mixed-Valence Dicopper(I,II) Complex That Models the CuA Biological Electron-Transfer Site, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 2101–2102. https://doi.org/10.1021/ja953776m.
[67] R.P. Houser, J.A. Halfen, V.G. Young, N.J. Blackburn, W.B. Tolman, Structural Characterization of the First Example of a Bis(.mu.-thiolato)dicopper(II) Complex. Relevance to Proposals for the Electron Transfer Sites in Cytochrome c Oxidase and Nitrous Oxide Reductase, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 10745–10746. https://doi.org/10.1021/ja00148a018.
[68] S.B. Harkins, J.C. Peters, Amido-Bridged Cu2N2 Diamond Cores that Minimize Structural Reorganization and Facilitate Reversible Redox Behavior between a Cu1Cu1 and a Class III Delocalized Cu1.5Cu1.5 Species, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 2885–2893. https://doi.org/10.1021/ja037364m.
[69] C. Sigwart, P. Hemmerich, J.T. Spence, Binuclear mixed-valence copper acetate complex as a model for copper-copper interaction in enzymes, Inorg. Chem. 7 (1968) 2545–2548. https://doi.org/10.1021/ic50070a015.
[70] C. Harding, V. McKee, J. Nelson, Highly delocalized Cu(I)/Cu(II); a copper-copper bond?, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 9684–9685. https://doi.org/10.1021/ja00025a050.
[71] N.P. Mankad, E. Rivard, S.B. Harkins, J.C. Peters, Structural Snapshots of a Flexible Cu2P2 Core that Accommodates the Oxidation States CuICuI, Cu1.5Cu1.5, and CuIICuII, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 16032–16033. https://doi.org/10.1021/ja056071l.
[72] R. Gupta, Z.H. Zhang, D. Powell, M.P. Hendrich, A.S. Borovik, Synthesis and Characterization of Completely Delocalized Mixed-Valent Dicopper Complexes, Inorg. Chem. 41 (2002) 5100–5106. https://doi.org/10.1021/ic0202918.
[73] M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center, Journal of Biological Chemistry. 268 (1993) 16781–16787. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85484-4.
[74] J. van der Oost, P. Lappalainen, A. Musacchio, A. Warne, L. Lemieux, J. Rumbley, R. b. Gennis, R. Aasa, T. Pascher, B. g. Malmström, 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., The EMBO Journal. 11 (1992) 3209–3217. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05398.x.
[75] M. Hay, J.H. Richards, Y. Lu, Construction and characterization of an azurin analog for the purple copper site in cytochrome c oxidase, PNAS. 93 (1996) 461–464. https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.461.
[76] M.T. Hay, M.C. Ang, D.R. Gamelin, E.I. Solomon, W.E. Antholine, M. Ralle, N.J. Blackburn, P.D. Massey, X. Wang, A.H. Kwon, Y. Lu, Spectroscopic Characterization of an Engineered Purple CuA Center in Azurin, Inorg. Chem. 37 (1998) 191–198. https://doi.org/10.1021/ic971232a.
[77] C. Dennison, E. Vijgenboom, S. de Vries, J. van der Oost, G.W. Canters, Introduction of a CuA site into the blue copper protein amicyanin from Thiobacillus versutus, FEBS Letters. 365 (1995) 92–94. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00429-D.
[78] E.N. Mirts, S.A. Dikanov, A. Jose, E.I. Solomon, Y. Lu, A Binuclear CuA Center Designed in an All α-Helical Protein Scaffold, J. Am. Chem. Soc. 142 (2020) 13779–13794. https://doi.org/10.1021/jacs.0c04226.
[79] D. Shiga, Y. Funahashi, H. Masuda, A. Kikuchi, M. Noda, S. Uchiyama, K. Fukui, K. Kanaori, K. Tajima, Y. Takano, H. Nakamura, M. Kamei, T. Tanaka, Creation of a Binuclear Purple Copper Site within a de Novo Coiled-Coil Protein, Biochemistry. 51 (2012) 7901–7907. https://doi.org/10.1021/bi3007884.
[80] D.R. Gamelin, D.W. Randall, M.T. Hay, R.P. Houser, T.C. Mulder, G.W. Canters, S. de Vries, W.B. Tolman, Y. Lu, E.I. Solomon, Spectroscopy of Mixed-Valence CuA-Type Centers: Ligand-Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 5246–5263. https://doi.org/10.1021/ja973161k.

[81] M.B. Robin, P. Day, Mixed Valence Chemistry-A Survey and Classification, in: H.J. Emeléus, A.G. Sharpe (Eds.), Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry, Academic Press, 1968: pp. 247–422. https://doi.org/10.1016/S0065-2792(08)60179-X.
[82] E.I. Solomon, X. Xie, A. Dey, Mixed valent sites in biological electron transfer, Chem. Soc. Rev. 37 (2008) 623–638. https://doi.org/10.1039/B714577M.
[83] S.I. Gorelsky, X. Xie, Y. Chen, J.A. Fee, E.I. Solomon, The Two-State Issue in the Mixed-Valence Binuclear CuA Center in Cytochrome c Oxidase and N2O Reductase, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 16452–16453. https://doi.org/10.1021/ja067583i.
[84] X. Xie, S.I. Gorelsky, R. Sarangi, D.K. Garner, H.J. Hwang, K.O. Hodgson, B. Hedman, Y. Lu, E.I. Solomon, Perturbations to the Geometric and Electronic Structure of the CuA Site: Factors that Influence Delocalization and Their Contributions to Electron Transfer, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 5194–5205. https://doi.org/10.1021/ja7102668.
[85] F. Neese, R. Kappl, J. Hüttermann, W.G. Zumft, P.M.H. Kroneck, Probing the ground state of the purple mixed valence CuA 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, JBIC. 3 (1998) 53–67. https://doi.org/10.1007/PL00010649.
[86] N.J. Blackburn, S. de Vries, M.E. Barr, R.P. Houser, W.B. Tolman, D. Sanders, J.A. Fee, X-ray Absorption Studies on the Mixed-Valence and Fully Reduced Forms of the Soluble CuA Domains of Cytochrome c Oxidase, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 6135–6143. https://doi.org/10.1021/ja970513e.
[87] M.H.M. Olsson, U. Ryde, Geometry, Reduction Potential, and Reorganization Energy of the Binuclear CuA Site, Studied by Density Functional Theory, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 7866–7876. https://doi.org/10.1021/ja010315u.
[88] F. Neese, W.G. Zumft, W.E. Antholine, P.M.H. Kroneck, The Purple Mixed-Valence CuA 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. 118 (1996) 8692–8699. https://doi.org/10.1021/ja960125x.
[89] J. Salgado, G. Warmerdam, L. Bubacco, G.W. Canters, Understanding the Electronic Properties of the CuA Site from the Soluble Domain of Cytochrome c Oxidase through Paramagnetic 1H NMR, Biochemistry. 37 (1998) 7378–7389. https://doi.org/10.1021/bi9728598.
[90] L.A. Abriata, G.N. Ledesma, R. Pierattelli, A.J. Vila, Electronic Structure of the Ground and Excited States of the CuA Site by NMR Spectroscopy, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 1939–1946. https://doi.org/10.1021/ja8079669.
[91] D. Alvarez-Paggi, U. Zitare, D.H. Murgida, The role of protein dynamics and thermal fluctuations in regulating cytochrome c/cytochrome c oxidase electron transfer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1837 (2014) 1196–1207. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.01.019.
[92] L.A. Abriata, D. Álvarez-Paggi, G.N. Ledesma, N.J. Blackburn, A.J. Vila, D.H. Murgida, Alternative ground states enable pathway switching in biological electron transfer, PNAS. 109 (2012) 17348–17353. https://doi.org/10.1073/pnas.1204251109.
[93] G.N. Ledesma, D.H. Murgida, H.K. Ly, H. Wackerbarth, J. Ulstrup, A.J. Costa-Filho, A.J. Vila, The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in CuA Sites, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 11884–11885. https://doi.org/10.1021/ja0731221.
[94] M.N. Morgada, F. Emiliani, K.N. Chacón, D. Álvarez-Paggi, D.H. Murgida, N.J. Blackburn, L.A. Abriata, A.J. Vila, pH-Induced Binding of the Axial Ligand in an Engineered CuA Site Favors the πu State, Inorg. Chem. (2019). https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01868.
[95] U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, M.N. Morgada, L.A. Abriata, A.J. Vila, D.H. Murgida, Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in CuA Sites of Cytochrome c Oxidase, Angewandte Chemie International Edition. 54 (2015) 9555–9559. https://doi.org/10.1002/anie.201504188.
[96] A.J. Leguto, M.A. Smith, M.N. Morgada, U.A. Zitare, D.H. Murgida, K.M. Lancaster, A.J. Vila, Dramatic Electronic Perturbations of CuA Centers via Subtle Geometric Changes, J. Am. Chem. Soc. 141 (2019) 1373–1381. https://doi.org/10.1021/jacs.8b12335.

[97] V. Zickermann, M. Verkhovsky, J. Morgan, M. Wikström, S. Anemüller, E. Bill, G.C.M. Steffens, B. Ludwig, Perturbation of the CuA Site in Cytochrome-c Oxidase of Paracoccus denitrificans by Replacement of Met227 with Isoleucine, European Journal of Biochemistry. 234 (1995) 686–693. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.686_b.x.

[98] K. Wang, L. Geren, Y. Zhen, L. Ma, S. Ferguson-Miller, B. Durham, F. Millett, Mutants of the CuA Site in Cytochrome c Oxidase of Rhodobacter sphaeroides: II. Rapid Kinetic Analysis of Electron Transfer, Biochemistry. 41 (2002) 2298–2304. https://doi.org/10.1021/bi0114630.

[99] C. Immoos, M.G. Hill, D. Sanders, J.A. Fee, C.E. Slutter, J.H. Richards, H.B. Gray, Electrochemistry of the CuA domain of Thermus thermophilus cytochrome ba3, JBIC. 1 (1996) 529–531. https://doi.org/10.1007/s007750050088.

[100] K. Wang, Y. Zhen, R. Sadoski, S. Grinnell, L. Geren, S. Ferguson-Miller, B. Durham, F. Millett, Definition of the Interaction Domain for Cytochrome con Cytochrome c Oxidase: II. RAPID KINETIC ANALYSIS OF ELECTRON TRANSFER FROM CYTOCHROMEc TO RHODOBACTER SPHAEROIDES CYTOCHROME OXIDASE SURFACE MUTANTS *, Journal of Biological Chemistry. 274 (1999) 38042–38050. https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38042.

[101] M.-L. Tsai, R.G. Hadt, N.M. Marshall, T.D. Wilson, Y. Lu, E.I. Solomon, Axial interactions in the mixed-valent CuA active site and role of the axial methionine in electron transfer, Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (2013) 14658–14663. https://doi.org/10.1073/pnas.1314242110.

[102] H.J. Hwang, S.M. Berry, M.J. Nilges, Y. Lu, Axial Methionine Has Much Less Influence on Reduction Potentials in a CuA Center than in a Blue Copper Center, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 7274–7275. https://doi.org/10.1021/ja0501114.

[103] J.J. Regan, B.E. Ramirez, J.R. Winkler, H.B. Gray, B.G. Malmström, Pathways for Electron Tunneling in Cytochrome c Oxidase, J Bioenerg Biomembr. 30 (1998) 35–39. https://doi.org/10.1023/A:1020551326307.

[104] H. Robinson, M.C. Ang, Y.-G. Gao, M.T. Hay, Y. Lu, A.H.-J. Wang, Structural Basis of Electron Transfer Modulation in the Purple CuA Center, Biochemistry. 38 (1999) 5677–5683. https://doi.org/10.1021/bi9901634.

[105] D. Alvarez-Paggi, D.F. Martín, P.M. DeBiase, P. Hildebrandt, M.A. Martí, D.H. Murgida, Molecular Basis of Coupled Protein and Electron Transfer Dynamics of Cytochrome c in Biomimetic Complexes, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 5769–5778. https://doi.org/10.1021/ja910707r.

[106] D. Alvarez-Paggi, L.A. Abriata, D.H. Murgida, A.J. Vila, Native CuA redox sites are largely resilient to pH variations within a physiological range, Chem. Commun. 49 (2013) 5381–5383. https://doi.org/10.1039/C3CC40457A.

[107] D. Alvarez-Paggi, U.A. Zitare, J. Szuster, M.N. Morgada, A.J. Leguto, A.J. Vila, D.H. Murgida, Tuning of Enthalpic/Entropic Parameters of a Protein Redox Center through Manipulation of the Electronic Partition Function, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 9803–9806. https://doi.org/10.1021/jacs.7b05199.

[108] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.E. Llases, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Fine Tuning of Functional Features of the CuA Site by Loop-Directed Mutagenesis, Inorg. Chem. 58 (2019) 2149–2157. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03244.

[109] U.A. Zitare, J. Szuster, M.F. Scocozza, A. Espinoza-Cara, A.J. Leguto, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, The role of molecular crowding in long-range metalloprotein electron transfer: Dissection into site- and scaffold-specific contributions, Electrochimica Acta. 294 (2019) 117–125. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.069.

[110] M.N. Morgada, M.-E. Llases, E. Giannini, M.-A. Castro, P.M. Alzari, D.H. Murgida, M.-N. Lisa, A.J. Vila, Unexpected electron spin density on the axial methionine ligand in CuA suggests its involvement in electron pathways, Chem. Commun. 56 (2020) 1223–1226. https://doi.org/10.1039/C9CC08883K.

[111] R. Bisson, G.C.M. Steffens, R.A. Capaldi, G. Buse, Mapping of the cytochrome c binding site on cytochrome c oxidase, FEBS Letters. 144 (1982) 359–363. https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80672-8.

[112] H. Speno, M.R. Taheri, D. Sieburth, C.T. Martin, Identification of Essential Amino Acids within the Proposed CuA Binding Site in Subunit II of Cytochrome c Oxidase (∗), Journal of Biological Chemistry. 270 (1995) 25363–25369. https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25363.
[113] C.R. Andrew, R. Fraczkiewicz, R.S. Czernuszewicz, P. Lappalainen, M. Saraste, J. Sanders-Loehr, Identification and Description of Copper-Thiolate Vibrations in the Dinuclear CuA Site of Cytochrome c Oxidase, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 10436–10445. https://doi.org/10.1021/ja960969g.
[114] S.M. Berry, M. Ralle, D.W. Low, N.J. Blackburn, Y. Lu, Probing the Role of Axial Methionine in the Blue Copper Center of Azurin with Unnatural Amino Acids, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 8760–8768. https://doi.org/10.1021/ja029699u.
[115] D.K. Garner, M.D. Vaughan, H.J. Hwang, M.G. Savelieff, S.M. Berry, J.F. Honek, Y. Lu, 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. 128 (2006) 15608–15617. https://doi.org/10.1021/ja062732i.
[116] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, Journal of Molecular Biology. 157 (1982) 105–132. https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0.
[117] H. Yue, D. Khoshtariya, D.H. Waldeck, J. Grochol, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, On the Electron Transfer Mechanism Between Cytochrome c and Metal Electrodes. Evidence for Dynamic Control at Short Distances, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 19906–19913. https://doi.org/10.1021/jp0620670.
[118] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, M. Shushanyan, K.L. Davis, D.H. Waldeck, R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, PNAS. 107 (2010) 2757–2762. https://doi.org/10.1073/pnas.0910837107.
[119] M.-E. Zaballa, L.A. Abriata, A. Donaire, A.J. Vila, Flexibility of the metal-binding region in apo-cupredoxins, Proceedings of the National Academy of Sciences. 109 (2012) 9254–9259. https://doi.org/10.1073/pnas.1119460109.
[120] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Dynamical effects in metalloprotein heterogeneous electron transfer, Electrochimica Acta. 342 (2020) 136095. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136095.
[121] T.D. Dolidze, D.E. Khoshtariya, D.H. Waldeck, J. Macyk, R. van Eldik, Positive Activation Volume for a Cytochrome C Electrode Process: Evidence for a “Protein Friction” Mechanism from High-Pressure Studies, J. Phys. Chem. B. 107 (2003) 7172–7179. https://doi.org/10.1021/jp035184t.
[122] D.E. Khoshtariya, J. Wei, H. Liu, H. Yue, D.H. Waldeck, Charge-Transfer Mechanism for Cytochrome c Adsorbed on Nanometer Thick Films. Distinguishing Frictional Control from Conformational Gating, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 7704–7714. https://doi.org/10.1021/ja034719t.

Capítulo 5

Mecanismos de transferencia electrónica en metaloproteínas de cobre en medios viscosos.

5.1-Introducción

5.1.1-Dinámica proteica: complejidad y rol en la reacción de TE

Las proteínas son entidades químicas altamente dinámicas y fuertemente acopladas al medio, y por lo tanto capaces de muestrear un amplio espacio conformacional alrededor de una, o varias, estructuras promedio como resultado de la energía térmica. La caracterización de la dinámica proteica requiere establecer tanto la escala temporal de las fluctuaciones como su amplitud y direccionalidad. Para describir este comportamiento es necesario recurrir a superficies de energía potencial multidimensionales de tipo jerárquico, tal como la representación simplificada que se muestra en la Figura 1, que define las poblaciones de los distintos estados conformacionales posibles (termodinámica) así como también, la magnitud de las barreras energéticas que deben sortearse para pasar de uno a otro (cinética).[1,2] Estas hipersuperficies de energía potencial pueden ser moduladas por factores externos tales como la temperatura, presión, viscosidad, constante dieléctrica del medio, interacciones específicas e inespecíficas, campos eléctricos locales, cambios conformacionales, etc. Una visión particularmente interesante propuesta originalmente por Frauenfelder y colaboradores es la de considerar a las proteínas como fluidos con viscosidad interna similar a la del agua y que pueden tratarse teórica y experimentalmente con métodos análogos a los empleados para líquidos vítreos[3–5]. En el marco de esos formalismos se estableció claramente que las fluctuaciones de las moléculas en el seno del solvente energizan y controlan los movimientos proteicos de gran amplitud, mientras que el solvente de la esfera de hidratación controla movimientos proteicos internos de menor amplitud. Estas fluctuaciones fueron comparadas a las llamadas relajaciones de tipo α y β de la teoría de vidrios, respectivamente.[6–10]

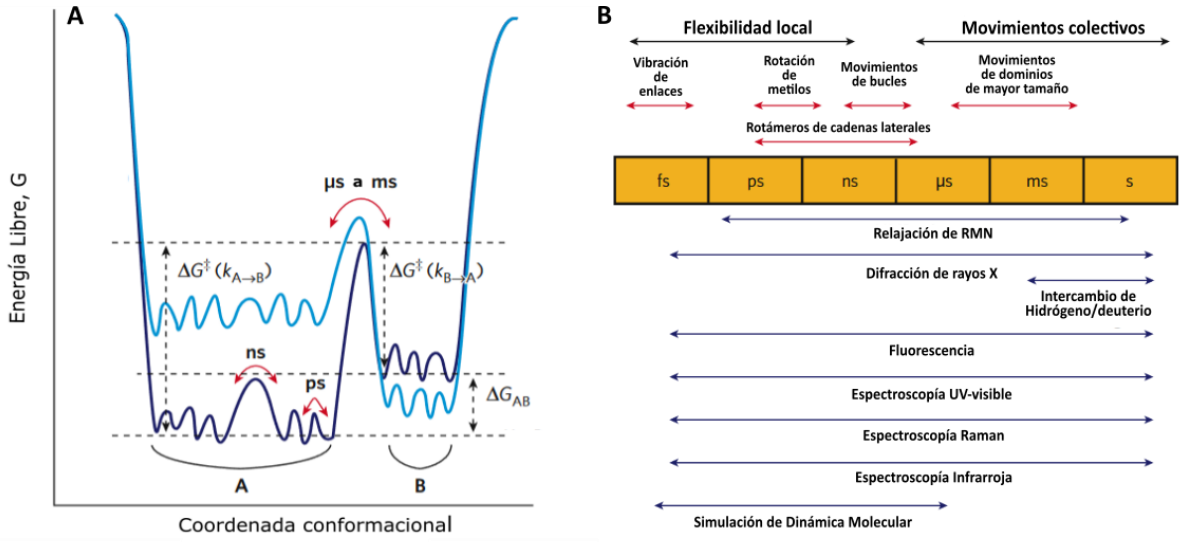


Figura 1: *(Figura adaptada de Henzler-Wildman et al. 2007* [2]*)* ***A.*** *Esquema de una superficie de energía potencial (SEP) unidimensional de una proteína mostrando la jerarquía de la dinámica proteica y las barreras de energía características. En esta representación, un "estado" está definido como un mínimo en la SEP, mientras que los estados de transición quedan definidos en los máximos de esta. Las poblaciones de los estados A y B quedan definidas como distribuciones de Boltzmann basadas en la diferencia de energía libre entre ambos estados,* ΔG_{AB}*. Las barreras entre estos estados,* $\Delta G^{\#}$*, determinan la velocidad de interconversión,* $k_{A \rightleftharpoons B}$*. Los distintos subestados quedan definidos como mínimos locales de la SEP que se interconvierten a través de fluctuaciones rápidas. Un cambio en el sistema podría dar lugar a un cambio en la arquitectura de la SEP, cambiando de la SEP celeste a la azul.* ***B.*** *Escala temporal de los diferentes procesos dinámicos en proteínas y los métodos experimentales que pueden emplearse para detectar fluctuaciones en cada escala.*

En este contexto es importante señalar que el medio intracelular dista significativamente de las condiciones típicas de tubo de ensayo, Figura 2, es decir una proteína diluida (típicamente rango μM o inferior) en un buffer apropiado. Por un lado, el medio intracelular (por ejemplo, el citosol) presenta concentraciones tan extremas de macromoléculas complejas que los volúmenes excluidos pueden alcanzar valores del orden del 40%, lo que naturalmente influenciará fuertemente todos los parámetros fisicoquímicos del medio tales como constante dieléctrica, viscosidad, coeficientes de difusión, coeficientes de actividad, etc. Esto a su vez puede tener un gran impacto en la estructura, dinámica y termodinámica de las proteínas presentes.[11] Este tipo de efectos pueden resultar incluso más extremos si se tiene en cuenta que muchas macromoléculas distribuyen sus poblaciones de manera altamente anisotrópica pudiendo coexistir en solución, adsorbidas a membranas [12] (u otras estructuras celulares) y/o formando parte de complejos o incluso super- y mega-complejos proteicos, como en el caso de las proteínas transportadoras de electrones en las cadenas respiratorias,[13,14] y que bajo estas condiciones

los parámetros termodinámicos y cinéticos de transferencia electrónica pueden ser muy diferentes a los habitualmente medidos en soluciones cuasi ideales.[15–20]

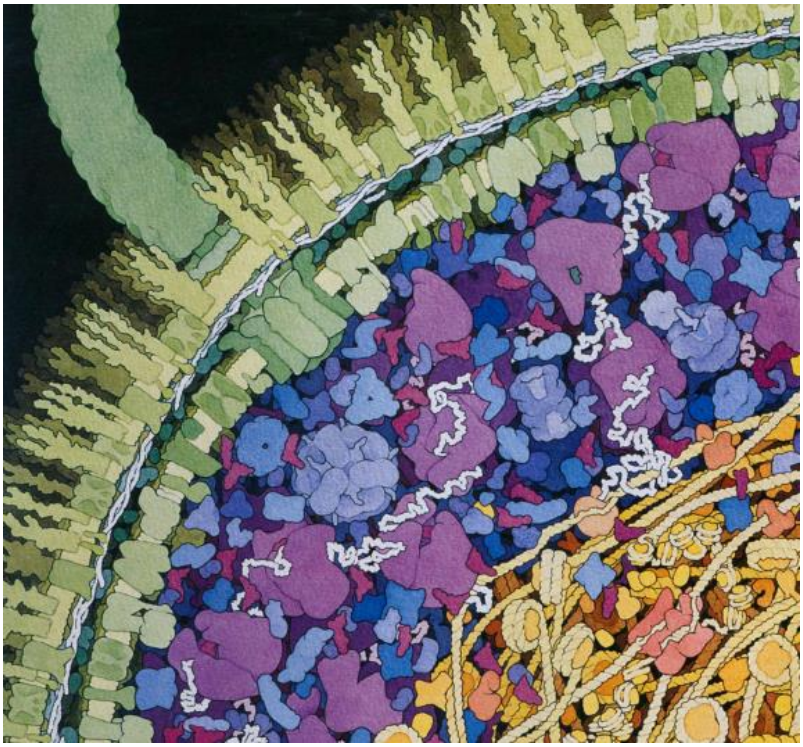


Figura 2: *(Figura adaptada de Hopper y Mayer* [21]*) Representación pictórica del complejo ambiente intracelular bacteriano poniendo de manifiesto el alto grado de organización y compartimentalización, incluso sin la presencia de un extenso sistema de endomembranas como aquel característico de células eucariotas.*

Si bien el ensamble de estados muestreado por las metaloproteínas redox es enorme, la mayoría de los estudios de TE proteica asume una aproximación "estática" con una única descripción electrónica del centro redox en el marco de la aproximación de Born-Oppenheimer. Si bien existen trabajos teóricos y experimentales que toman en cuenta algunos aspectos dinámicos de la TE, fundamentalmente para reacciones en la escala de los fs-ps en centros fotosintéticos,[22,23] estos estudios no focalizan suficientemente en ninguno de los aspectos asociados con el *crowding* molecular sobre los aspectos estructurales, entálpicos, entrópicos y/o cinéticos de TE.[24–26] Más aún, la gran mayoría de los estudios de TE proteica asumen un mecanismo no adiabático de TE a larga distancia.[27–32] En este régimen la velocidad de TE queda bien descripta por la ecuación semiclásica de Marcus[33,34] o su equivalente Marcus-DOS para sistemas electroquímicos donde la ecuación de Marcus se integra de modo de considerar la densidad de estados del electrodo metálico.[35,36] Este modelo, sin embargo, deja de ser válido cuando las condiciones experimentales se apartan de la situación de solución cuasi ideal típica de

los estudios fisicoquímicos y, en cambio, las características del medio se aproximan paulatinamente a una descripción más realista del medio intracelular. Las desviaciones de la idealidad pueden tener múltiples orígenes no completamente establecidos y cuya identificación experimental dista mucho de ser trivial.[37–39] Uno de los fenómenos esperables es que la asunción de linealidad en el acoplamiento soluto-solvente deje de ser válida, resultando en deformaciones de los perfiles de energía libre de reactivos y productos, con la consecuente pérdida de la usual forma parabólica. Este tipo de comportamiento no ergódico puede ocurrir cuando las escalas temporales de tuneleo electrónico y de relajación de los modos del sistema dejan de ser separables y, por lo tanto, las suposiciones del modelo de Marcus y sus subsecuentes extensiones dejan de ser válidas.[40–43]

5.1.2-Modelo de TE bajo un régimen de control friccional de Waldeck-Zusman.

Dado que las distancias dador-aceptor, R_{DA}, en sistemas proteicos típicamente se encuentran dentro del rango de 5-25 Å, las reacciones de TE inter- e intra-proteica en soluciones diluidas se tratan como procesos no adiabáticos. Sin embargo, existe evidencia creciente de que el límite entre los regímenes adiabático y no adiabático en TE proteica es relativamente difuso y que esta transición puede ocurrir a distancias mucho mayores que las esperadas, particularmente cuando las proteínas redox actúan en interfaces biomiméticas cargadas y en medios de viscosidad o *crowding* creciente. En este sentido resultan particularmente reveladores una serie de estudios experimentales y teóricos de TE heterogénea de diversas proteínas inmovilizadas sobre superficies biomiméticas. Experimentos de este tipo reportados por numerosos grupos de investigación,[37,44–48] incluyendo el nuestro,[49–54]muestran consistentemente que la velocidad de TE tiene una dependencia exponencial con la distancia para distancias de tuneleo relativamente largas (aproximadamente $R_{DA} \geq 18\,\text{Å}$), pero es relativamente constante a distancias menores, Figura 3.

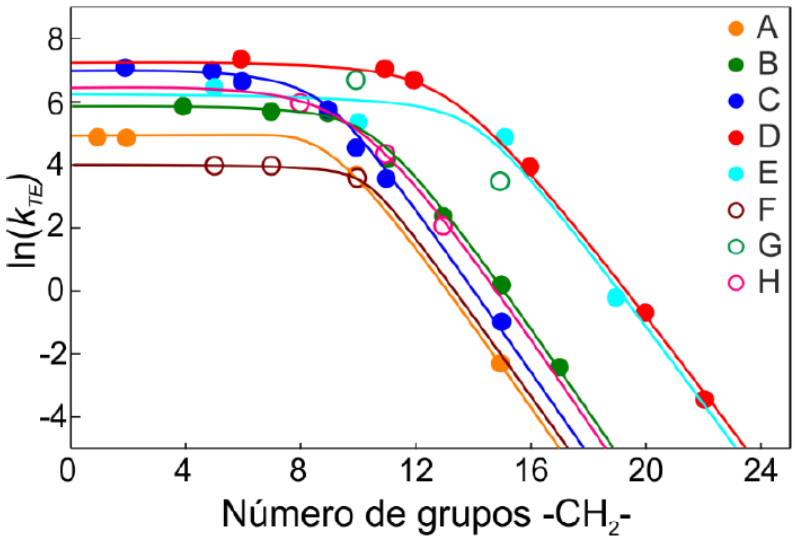


Figura 3: *(Adaptada de Alvarez-Paggi et al*[18]*) Dependencia de la k_{TE} con la distancia entre la proteína y la superficie metálica del electrodo medida en número de metilenos presentes en la monocapa (SAM, de sus siglas en inglés "self-assembled monolayers") empleada para biocompatibilizar y mediar la adsorción proteica de distintos sitios redox estudiados principalmente mediante métodos electroquímicos.* ***A****: Citocromo c (Cyt c) adsorbido sobre Ag-SAM-COO^-/COOH*[55–57]*.* ***B****: Cyt c adsorbido sobre Au-SAM-COO^-/COOH*[44,58–60]*.* ***C****: Azurina adsorbida sobre Au-SAM-CH_3*[45]*.* ***D****: Cyt c adsorbido sobre Ag-SAM-piridina*[48,61]*.* ***E****: Dominio de la Citocromo c oxidasa adsorbido sobre Ag-SAM(CH_3-OH)*[62]*.* ***F****: Cyt b_{562} adsorbido sobre Ag-SAM-NH_3/NH_2*[63]*.* ***G****: Cyt-C_6 adsorbido sobre Ag-SAM(CH_3-OH)*[64]*.* ***H****: Tt-Cu_A adsorbido sobre Au-SAM(CH_3-OH)*[46]

En algunos casos esto ha sido interpretado en términos de un cambio de mecanismo que sería no adiabático a largas distancias pero entraría en un régimen friccional o cuasi-adiabático para $R_{DA} \leq 18$ Å. La huella digital del régimen friccional de TE, y que permite distinguirlo de otro proceso acoplado limitante de la velocidad, llamado *mecanismo de compuerta* ("*gated mechanism*" en inglés)[44,65–68], es que la cinética de TE muestra fuerte dependencia con la viscosidad del medio y con la presión, pero también con el sobrepotencial aplicado (es decir con la fuerza impulsora de la TE). Este último aspecto es esencial ya que, de existir un paso previo limitante de la velocidad del proceso, como puede ser una reorientación de la proteína sobre la superficie, o un cambio conformacional de gran amplitud, este anularía la sensibilidad de la velocidad de la reacción de TE al empleo de un sobrepotencial. Una serie de experimentos en los que las moléculas de citocromo *c* de corazón de caballo fueron "cableadas" directamente a la superficie metálica, Figura 4, permitieron desestimar la hipótesis del mecanismo de compuerta como el origen de los desvíos observados.[49,61] Mediante el empleo de grupos piridina en las colas expuestas al solvente de los alcanotioles que forman las monocapas se logra coordinar directamente el átomo de hierro del grupo hemo, desplazando de esta manera al ligando lábil axial metionina. De este modo, se limita en gran medida la capacidad de la molécula de rotar sobre la

superficie y alcanzar una orientación que garantice un acoplamiento óptimo para la TE, proceso que se presume que es limitante de la reacción según esta propuesta. Más aún, el cableado garantiza un camino directo desde el hierro del grupo protético al electrodo. Aún bajo estas condiciones se observó la presencia de los desvíos de la teoría de Marcus, a saber, un comportamiento bifásico de la k_{TE} con R_{DA}, la dependencia de k_{TE} con la viscosidad del medio y un incremento de la energía de activación, especialmente a monocapas cortas. Incluso se han reportado estudios sobre citocromo *c* unido tanto de forma electrostática como covalente a la superficie de la SAM, donde también se observa un comportamiento bifásico de la k_{TE} con R_{DA}.[69] Estos resultados son consistentes con estudios computacionales que indican que las fluctuaciones térmicas de la proteína y moléculas de solvente interfacial podrían determinar la velocidad de TE mediante la modulación de la probabilidad de tuneleo electrónico[70]**.** Aun así es importante señalar que existen casos en los que efectivamente se determinó la existencia de una reorientación proteica sobre la superficie que sugieren fuertes influencias en mecanismos regulatorios adicionales *in vivo*.[51]

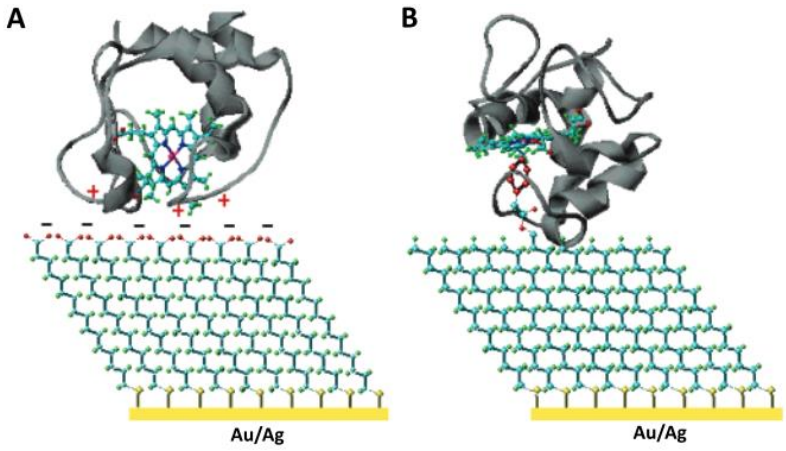


Figura 4: *(Figura adaptada de Yue et al.*[61]*) Representación de citocromo c de corazón de caballo adsorbido electrostáticamente (**A**) y coordinado directamente a la monocapas (**B**) con n de 15 a través de grupos piridina terminales.*

Dado que la gran mayoría de las reacciones de TE proteica ocurren en interfaces cargadas, en medios de alta viscosidad y con distancias de tuneleo menores o cercanas al límite de aproximadamente 18 Å, resulta evidente que el modelo semiclásico de Marcus para reacciones no adiabáticas resulta insuficiente para describir reacciones de TE en condiciones fisiológicas. Zusman desarrollo una teoría de TE en solventes polares basado en una descripción del mismo empleando conceptos de permitividad dieléctrica compleja bajo la aproximación de Debye[71–73]. Para la TE heterogénea sobre electrodos metálicos él llego a la siguiente expresión:

$$k_{red} = \frac{1}{\pi\tau_s}\sqrt{\frac{\lambda}{\pi k_B T}}sin\left(\pi\sqrt{\frac{\Delta G^{\#}}{\lambda}}\right)exp\left(-\frac{\Delta G^{\#}}{k_B T}\right)$$

$$ln\left[1 + \pi\tau_s k_{NA}\sqrt{\frac{\pi k_B T}{\lambda}}\frac{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)}{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)}\right]$$

Ecuación 1

En la que la energía libre de activación es $\Delta G^{\#} = (e\eta^o + \lambda)^2/4\lambda$, donde λ es la energía de reorganización, $\eta^o = (E - E^o)$ es el sobrepontencial estándar, E es el potencial del electrodo y E^oes el potencial de reducción estándar de la cupla redox. Por otra parte, τ_s es el tiempo de relajación característico de la polarización del medio, típicamente el solvente circundante. k_{NA} corresponde a la constante de TE en el límite en el que la interacción entre la molécula redox y electrodo es débil, es decir, el límite no adiabático, y puede ser expresada en términos del límite de altas temperaturas de la ecuación semiclásica de Marcus[33,74,75]. La expresión a la que se llega después de integrar para considerar todos los niveles electrónicos del metal que contribuyen al proceso, ϵ, es:

$$k_{NA} = \frac{\pi}{\hbar}\frac{|V|^2\rho}{\sqrt{\pi\lambda k_B T}}\int_{-\infty}^{+\infty} exp\left[-\left(\frac{(\lambda + (\epsilon_F - \epsilon) + e\eta^o)^2}{4\lambda k_B T}\right)\right]$$

$$\frac{1}{1 + exp[(\epsilon + \epsilon_F)/k_B T]}d\epsilon$$

Ecuación 2

Aquí ρ es la densidad de estados electrónicos en el electrodo, el último término de la integral es la ley de distribución de Fermi-Dirac, $f(\epsilon)$, ϵ_F es la energía del nivel de Fermi y $|V|$ es la magnitud del acoplamiento electrónico. Esta expresión puede, sin embargo, escribirse de manera más compacta aproximando la distribución de Fermi-Dirac como una función escalón ($f(\epsilon) = 0$ para $\epsilon > \epsilon_F$ y $f(\epsilon) = 1$ para $\epsilon < \epsilon_F$), adoptando la siguiente forma:

$$k_{NA} \approx \frac{\pi}{\hbar}|V|^2\rho\ erfc\left(\frac{\lambda + e\eta^o}{\sqrt{4\lambda k_B T}}\right)$$

Ecuación 3

La ecuación 1 es una ecuación maestra, ya que a partir de ella se recuperan las expresiones para ambos casos limite, acoplamiento débil (no adiabático) y acoplamiento fuerte (adiabático).

En el límite en el que vale:

$$k_{NA} \ll \frac{1}{\pi\tau_s}\sqrt{\frac{\lambda}{\pi k_B T}}\frac{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)}{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)}$$

Ecuación 4

Esto implica que el segundo término del argumento del logaritmo, en la ecuación 1, tiende a cero, y, por ende, el logaritmo también lo hace. Si se hace un desarrollo en serie en torno a cero es sencillo demostrar que vale la siguiente aproximación:

$$ln\left[1+\pi\tau_s k_{NA}\sqrt{\frac{\pi k_B T}{\lambda}}\frac{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)}{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)}\right]\approx\ \pi\tau_s k_{NA}\sqrt{\frac{\pi k_B T}{\lambda}}\frac{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)}{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)} \qquad \textbf{Ecuación 5}$$

Si se reemplaza esta expresión en la ecuación maestra de Zusman, ecuación 1, se recupera el resultado para la TE no adiabática, $k_{Red}\ =\ k_{NA}$.

Por otra parte, en el caso opuesto, es decir, el límite donde vale:

$$k_{NA}\gg\frac{1}{\pi\tau_s}\sqrt{\frac{\lambda}{\pi k_B T}}\frac{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)}{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)} \qquad \textbf{Ecuación 6}$$

Se puede despreciar el primer término dentro del logaritmo:

$$k_{red}=\frac{1}{\pi\tau_s}\sqrt{\frac{\lambda}{\pi k_B T}}sin\left(\pi\sqrt{\frac{\Delta G^{\#}}{\lambda}}\right)exp\left(-\frac{\Delta G^{\#}}{k_B T}\right)$$

$$ln\left[\pi\tau_s k_{NA}\sqrt{\frac{\pi k_B T}{\lambda}}\frac{exp(\Delta G^{\#}/k_B T)}{sin\left(\pi\sqrt{\Delta G^{\#}/\lambda}\right)}\right] \qquad \textbf{Ecuación 7}$$

Esta expresión puede simplificarse si se considera el caso de sobrepotencial cero, $\eta^o=0$, lo que hace que el seno en la expresión valga uno, y se llega a una expresión para la k^o_{Red}. Por otro lado, si además se considera una expansión asintótica[76] sobre la función error en la ecuación 3**,** que aproxima la función error complemento por una función gaussiana, se tiene que:

$$k^o_{NA}\approx\frac{\pi}{\hbar}|V|^2\rho\ erfc\left(\sqrt{\frac{\lambda}{4k_B T}}\right)\approx\frac{\pi}{\hbar}|V|^2\rho\sqrt{\frac{4k_B T}{\pi\lambda}}\ exp\left(-\frac{\lambda}{4k_B T}\right) \qquad \textbf{Ecuación 8}$$

Si se reemplaza esta expresión en la ecuación 7 y se opera se obtiene la siguiente expresión:

$$k^o_{Red}=\frac{1}{\pi\tau_s}\sqrt{\frac{\lambda}{\pi k_B T}}exp\left(-\frac{\lambda}{4k_B T}\right)ln\left[\frac{2\pi^2}{\hbar}|V|^2\rho\tau_s\frac{k_B T}{\lambda}\right] \qquad \textbf{Ecuación 9}$$

Esta es la expresión bajo el formalismo de Zusman para el régimen adiabático en solventes polares para reacciones sobre electrodos metálicos. Es interesante notar que en esta expresión el acoplamiento electrónico aparece en el argumento de un logaritmo, lo que contribuye a disminuir su influencia en el valor de k^o_{Red}, cuando, por otro lado el factor preexponencial es inversamente proporcional al tiempo de relajación característico de la polarización del medio. Esta expresión adopta una forma algo distinta para el proceso de oxidación, sin embargo, no se ven alterados los aspectos clave comentados y analizados aquí, a saber, la dependencia con los parámetros τ_s, λ y $|V|^2$.

En una primera aproximación, el τ_s puede aproximarse como el tiempo de relajación longitudinal, τ_L, del modelo de Debye[71–73,77–81] y por ende se puede expresar en función de la viscosidad del medio, η, ecuación 10.

$$\tau_s \cong \tau_L = \frac{\varepsilon_{op}}{\varepsilon_s}\frac{3\eta V_m}{RT} \qquad \textbf{Ecuación 10}$$

Donde ε_{op} y ε_s corresponden a la constante dieléctrica óptica y estática del medio. La ε_{op} también es conocida como constante dieléctrica de altas frecuencias, ε_∞, y V_m es el volumen molar de la solución. Si se combinan las ecuaciones 9 y 10 se llega a una expresión en la que la k^o_{TE} depende inversamente con la viscosidad del medio. Sin embargo, experimentalmente se observó que la dependencia es a través de un exponente fraccionario, $0 < \gamma < 1$, siguiendo la siguiente ley empírica:

$$k^o_{TE}(\eta, R') = k^o_{TE(\eta=1)}(R')\left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación 11}$$

Donde R' representa la distancia electrodo-centro redox. Como se adelantó más arriba, la dependencia de la k^o_{TE} con la viscosidad es evidente al disminuir la distancia entre la superficie del electrodo y el centro redox, volviéndose máxima en las monocapas más cortas, esto se ve reflejado en el valor creciente del factor γ al disminuir R'. De este modo, se puede considerar de manera *ad hock* un exponente fraccionario para la dependencia del τ_L con la viscosidad. Por otro lado, la dependencia de la viscosidad con la temperatura puede expresarse a través de la ecuación empírica de Andrade[82,83]:

$$\eta(T) = A\, exp\left(\frac{\Delta G_s^{\#}}{RT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 12}$$

Donde A representa un parámetro empírico dependiente del solvente, y $\Delta G_s^{\#}$ representa la energía de activación para el flujo viscoso. De modo que combinando las ecuaciones 10, 11 y 12, se llega a la siguiente expresión para τ_S:

$$\tau_s \cong \tau_L = \frac{\varepsilon_{op}}{\varepsilon_s}\frac{3\eta V_m}{RT} \approx \frac{\varepsilon_{op}}{\varepsilon_s}\frac{3\eta^{\gamma} V_m}{RT} \approx \frac{\varepsilon_{op}}{\varepsilon_s}\frac{3\left[A\, exp\left(\frac{\Delta G_s^{\#}}{RT}\right)\right]^{\gamma} V_m}{RT} \qquad \textbf{Ecuación 13}$$

Si se introduce esta expresión en la ecuación 9 y se desprecia el término logarítmico, que se espera que afecte poco el factor pre exponencial, se obtiene la siguiente expresión aproximada para la constante de transferencia electrónica a sobrepotencial cero, k_{TE}^{o}:

$$k_{TE}^{o} \cong \frac{\varepsilon_s}{3A^{\gamma} V_m \varepsilon_{op}}\sqrt{\frac{RT\lambda}{\pi^3}}\, exp\left(-\frac{\Delta G_{TE}^{\#} + \gamma\, \Delta G_s^{\#}}{RT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 14}$$

Esta ecuación predice que para un régimen de control friccional la energía de activación extraída de experimentos en función de la temperatura contiene dos contribuciones: (i) un término originado por la energía de reorganización intrínseca del sistema, $\Delta G_{TE}^{\#} = \lambda/4$, y (ii) un término, $\gamma\, \Delta G_s^{\#}$, que da cuenta de la dependencia con la temperatura de la dinámica de la relajación del medio (que sería una combinación del solvente, matriz proteica y monocapa).

5.1.3- Modelo de TE bajo un régimen de control friccional de Matyushov

En vista de toda la información experimental acumulada queda claro que existe un cambio de régimen de TE con la distancia, es decir, con el grado de acoplamiento electrónico entre el sitio redox y la superficie del electrodo. El consenso actual puede ser expresado en términos de un factor de entrecruzamiento o de adiabaticidad, *g*, que afectaría el factor pre exponencial de la k_{TE}, con la siguiente expresión general:

$$k_{TE} = \frac{k_{NA}}{(1+g)} \qquad \textbf{Ecuación 15}$$

Donde k_{NA} se refiere a la constante en el régimen no adiabático (NA) y cuya expresión se presentó en la sección anterior, ecuación 3. Esta famosa expresión, también conocida como Regla de Oro**,** indica que la k_{NA} es directamente proporcional al acoplamiento electrónico, $\Delta = \pi V^2 \rho$, donde recordemos que V representa el elemento matricial de la interacción entre el estado electrónico localizado en reactivos y los estados electrónicos del metal, y ρ representa la densidad de estados electrónicos en el nivel de Fermi del metal. En esta expresión, el factor Δ decae exponencialmente con la distancia entre reactivos según la siguiente expresión, donde el factor de decaimiento, β, adopta valores típicamente alrededor de 1 $Å^{-1}$[33]:

$$\Delta(R) = \Delta_o\, exp[-\beta(R + R_o)] \qquad \textbf{Ecuación 16}$$

Distintas teorías sobre el efecto del solvente en la reacción de TE predicen que, incluso para reacciones no adiabáticas donde el acoplamiento entre dador y aceptor es mucho menor que $k_B T$,

la dinámica de cruzamiento de la barrera energética se ve afectada por una dinámica difusional de tipo Kramer en la cima de la barrera energética, especialmente si la dinámica del medio es lenta[1,84]. Esto quiere decir que para alcanzar este régimen el tiempo de relajación del medio debe ser mayor que el tiempo de tuneleo electrónica una vez alcanzado el punto de cruce, es decir, la intersección de ambas superficies de energía libre. La condición para alcanzar el régimen de control dinámico queda definida por el factor de entrecruzamiento, g, que para una reacción de TE de una especie sobre la superficie de un electrodo[85] luce de la siguiente manera:

$$g \cong \frac{8\tau_x \Delta k_B T}{\hbar \lambda^r} \qquad \textbf{Ecuación 17}$$

Aquí τ_x es el tiempo de relajación del corrimiento de Stokes, que representa el decaimiento de la función de correlación temporal de la coordenada de reacción, $\mathrm{X}(t)$, que en el marco de este formalismo representa la diferencia de energía electrónica entre la posición de equilibrio de dador y aceptor, ver Figura 5 [43]. Por otra parte, λ^r representa la energía de reorganización efectiva de la reacción, la cual no es necesariamente idéntica a aquella definida en la teoría de Marcus de TE, ya que esta nueva definición puede dar cuenta del muestreo no ergódico del subespacio conformacional proteico, debido al desacople de los tiempos de relajación característicos y el tiempo de reacción. Antes de continuar con el desarrollo del modelo de TE friccional de Matyushov es importante (re)definir ciertos parámetros en el marco del formalismo de su teoría que se construye sobre un modelo previo de TE desarrollado por él basado en la no ergodicidad del componente proteico[5,40,43,86,87].

El proceso de tuneleo electrónico entre dador y aceptor tiene lugar cuando las energías electrónicas entran en resonancia, se ecualizan, mediante fluctuaciones térmicas. Esta diferencia de energía, X en la Figura 5, se define como brecha energética entre dador-aceptor y es la coordenada de reacción natural para monitorear el grado de avance de la reacción de TE, Figura 6. La configuración nuclear en la cual tiene lugar la reacción corresponde a una situación en la que $\mathrm{X} = 0$. Dado que la brecha energética promedio, $\langle \mathrm{X} \rangle$, es distinta de cero, es necesario de las fluctuaciones térmicas para alcanzar esa condición. Las coordenadas nucleares corresponden al medio polarizable, es decir, la componente proteica y el solvente.

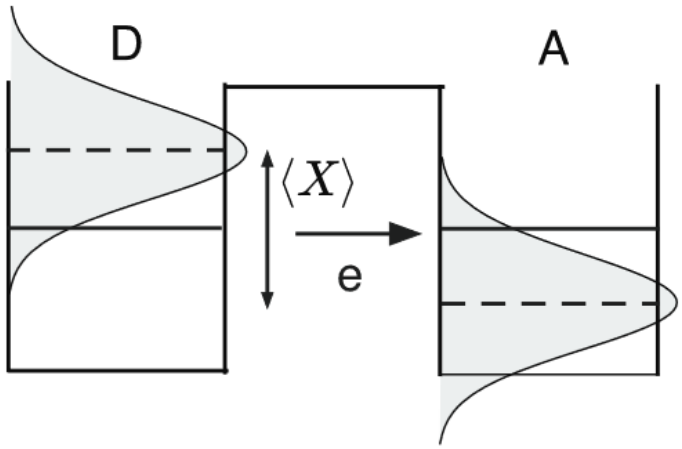


Figura 5: *(Figura adaptada de Matyushov et al* [43]*) Representación esquemática de los niveles de energía de los estados electrónicos localizados en el dador y aceptor. La diferencia entre ellos representa la brecha energética promedio* (en inglés "*Energy-gap*"), $\langle \mathrm{X} \rangle$, diferencia entre los valores correspondientes a las líneas punteadas, que corresponden con los máximos de probabilidad (picos de las campanas gaussianas horizontales). La línea horizontal entera representa la situación en la que las energías electrónicas se ecualizan, donde el valor de $\langle \mathrm{X} \rangle = 0$, condición necesaria para que tenga lugar el tuneleo electrónico.

La varianza de X define la energía de reorganización del medio, o energía de reorganización variacional, λ^v,[43,88,89] a través de la siguiente relación:

$$\sigma_{\mathrm{X}}^2 = \langle \delta \mathrm{X}^2 \rangle = 2 k_B T \lambda^v \qquad \textbf{Ecuación 18}$$

Por otro lado, la separación entre los mínimos de las superficies de energía libre, se relaciona a lo que Matyushov denomino energía de reorganización del corrimiento de Stokes, λ^{St}, en analogía al desplazamiento de Stokes entre los máximos de absorción y emisión en transiciones electrónicas en espectroscopia óptica, y queda determinado según:

$$\lambda^{St} = \frac{|\mathrm{X}_{Ox} - \mathrm{X}_{Red}|}{2} \qquad \textbf{Ecuación 19}$$

La relación entre estas dos energías de reorganización es la siguiente:

$$\lambda^r = \frac{(\lambda^{St})^2}{\lambda^v} \qquad \textbf{Ecuación 20}$$

Donde λ^r, es una nueva energía de reorganización, asimilable a aquella de la teoría de Marcus, que representa el valor obtenido mediante experimentos electroquímicos, y otorga una explicación que permite reconciliar incongruencias entre valores obtenidos experimentalmente y aquellos

obtenidos a partir de simulaciones computacionales. Para el caso particular del citocromo *c* se tiene que $\lambda^{exp} = \lambda^{r} =$ 0,57 eV, donde $\lambda^{St} =$ 1,26 eV y $\lambda^{v} =$ 2,85 eV.[88]

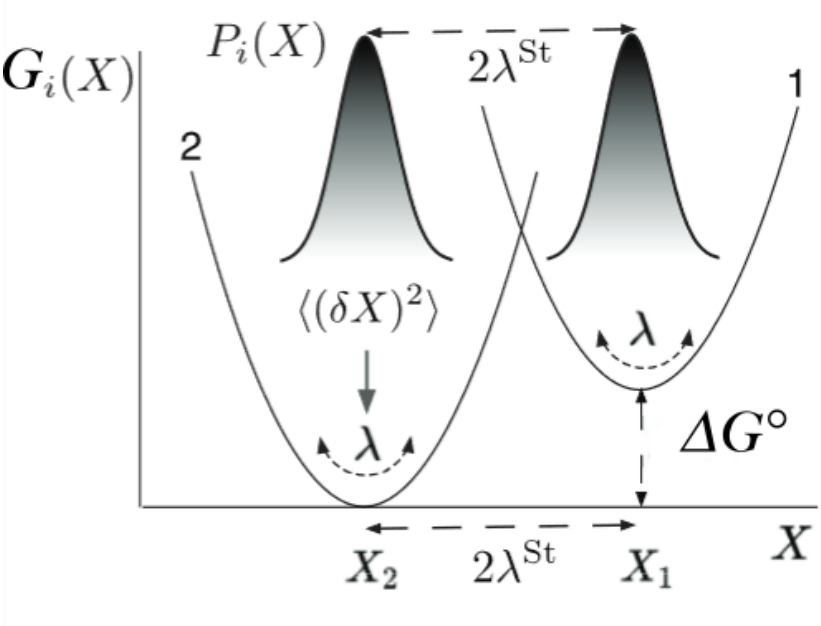


Figura 6: *(Figura adaptada de Matyushov* [43]*) Representación esquemática de perfiles de energía libre de dador y aceptor,* $G_i(\mathrm{X})$*, empleando la brecha energética entre los estados electrónicos del dador y aceptor como coordenada de reacción,* X*. La distancia entre los mínimos de las parábolas es la energía de reorganización del corrimiento de Stokes,* λ^{st}*. La curvatura de las parábolas está relacionada a la energía de reorganización variacional,* $2\lambda^{v} = [\partial^2 G_i(\mathrm{X})/\partial \mathrm{X}^2]^{-1}$*. En espectroscopia óptica,* $2\lambda^{st}$*, es el desplazamiento de Stokes entre los picos de las líneas ópticas representadas por las funciones de probabilidad* $P_i(\mathrm{X} = \hbar\omega)$*. El desplazamiento vertical entre los mínimos de las parábolas representa la energía libre de reacción,* $\Delta G^{o} = G_2^{o} - G_1^{o}$*.*

Esta nueva definición para la energía de reorganización, sin embargo, no afecta la expresión para la energía de activación obtenida inicialmente por Marcus:

$$\Delta G^{\#} = \frac{(\lambda^{r} + \Delta G^{o})^2}{4\lambda^{r}} \qquad \textbf{Ecuación 21}$$

La que para reacciones contra un electrodo adopta la siguiente expresión, Figura 7:

$$\Delta G^{\#} = \frac{(\lambda^{r} + e\eta)^2}{4\lambda^{r}} \qquad \textbf{Ecuación 22}$$

Donde η representa el sobrepotencial y *e* la carga elemental.

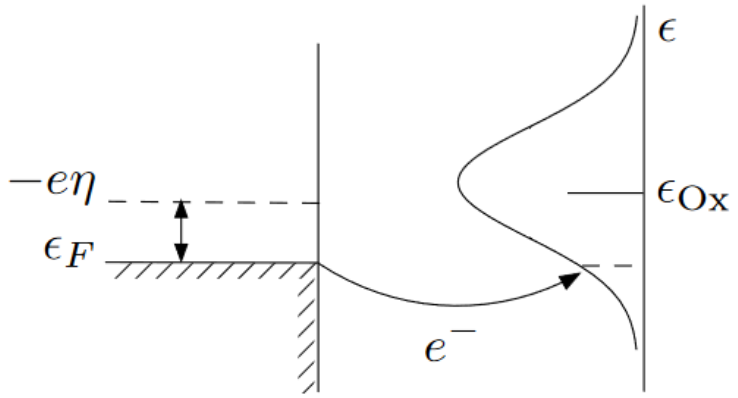


Figura 7: *(Figura adaptada de Seyedi et al*[88]*) Representación esquemática para una reacción de TE catódica, desde el nivel de Fermi, ϵ_F, correspondiente al potencial del electrodo en equilibrio, a un reactivo oxidado con una energía electrónica promedio ϵ_{Ox}. Sin sobrepotencial aplicado, la trasferencia electrónica ocurre desde el ϵ_F a un estado electrónico fuera del equilibrio en el reactivo oxidado con una energía en resonancia con ϵ_F. Al aplicar un sobre potencial, $e\eta$, se incrementa la energía del electrodo en $\epsilon_F - e\eta$, aumentando la probabilidad de tuneleo, dado que se acerca a la energía electrónica promedio de reactivos.*

Volviendo sobre el análisis de las expresiones 15, 16 y 17, se tiene que si $g \gg 1$ entonces el factor que da cuenta del acoplamiento electrónico se cancela y el factor pre exponencial queda dependiendo inversamente del τ_x, es decir, $k_{TE} \propto \tau_x^{-1}$. Por el contrario, si $g \ll 1$ se tiene que la reacción de TE se encuentra definida por la probabilidad de tuneleo electrónico, $k_{TE} = k_{NA} \propto \Delta$. Si bien, esta propuesta sobre un control friccional de la k_{TE} concuerda cualitativamente con la mayoría de los datos experimentales, la aplicación directa de estas ecuaciones enfrenta ciertas dificultades. Para el caso de citocromo *c*, se obtuvieron a partir de simulaciones valores de τ_x en el rango de 300-900 ps para temperaturas entre 280-360 K, los que si bien son mucho más lentos que el tiempo de relajación de la polarización del medio (longitudinal), que se empleó como aproximación para el τ_x en reacciones homogéneas en agua ($\tau_L \cong$ 0,2 ps)[71,79], aún son muy rápidos para dar cuenta del cambio de régimen. El empleo de un valor de $\lambda^r \cong$ 0,57 eV junto con los valores de τ_x comentados más arriba, empleando un valor de $\Delta \sim 10^{-8}$ eV, obtenido a partir de ajustes de las expresiones 15, 16 y 17 de las k_{TE} para el largo de monocapa en la región del cambio de régimen, dan como resultado un valor de $g \cong 2 \times 10^{-2}$, el que no alcanza para explicar un cambio de régimen de TE no adiabática a uno de control friccional. Esto indica una desconexión entre el comportamiento reportado experimentalmente y el marco teórico que se emplea para justificarlo[90].

La propuesta de Matyushov es la considerar explícitamente la dinámica de la proteína sobre la superficie del electrodo, donde se asume que la distancia entre la proteína y la superficie del

electrodo no es fija, sino que puede ser descripta como oscilaciones en un potencial armónico. Estas oscilaciones modulan la magnitud del acoplamiento electrónico, cuyo valor promedio viene dado según:

$$\langle \Delta(R)\rangle = \Delta_o \, exp[-\beta(R+R_o)] \, exp\left[\left({}^{1}/_{2}\,\beta^2\right)\delta R^2\right] \qquad \textbf{Ecuación 23}$$

Donde $\delta R^2 = k_B T/\kappa$ describe la varianza del desplazamiento proteico en el potencial armónico con constante de fuerza κ. En este modelo se redefine el factor de entrecruzamiento como sigue:

$$g = \tau_{ef} \, \frac{\langle \Delta(R)\rangle}{\hbar} \qquad \textbf{Ecuación 24}$$

Donde τ_{ef} corresponde a un tiempo de relajación efectivo, que es una función de dos tiempos de relajación diferentes, el tiempo de relajación del corrimiento de Stokes, τ_x, y el tiempo de relajación difusional de la proteína sobre la superficie, τ_R, y tiene la siguiente expresión:

$$\tau_{ef} = 2\,\tau_R \, exp(\beta^2 \delta R^2)\, h(\tau_x, \tau_R) \qquad \textbf{Ecuación 25}$$

Aquí el τ_R se define en función del coeficiente de difusión efectivo de la proteína sobre la superficie del electrodo, D_R, y representa una nueva escala temporal no considerada en formulaciones previas, y $h(\tau_x, \tau_R)$ es una función que define el peso relativo de ambos tiempos de relajación, según la expresiones:

$$\tau_R = (\beta^2 D_R)^{-1} \qquad \textbf{Ecuación 26}$$

$$h(\tau_x, \tau_R) = \left(1 - \sqrt{\frac{\lambda^r/2k_BT}{\lambda^r/2k_BT + 4\tau_x/\tau_R}}\right) \qquad \textbf{Ecuación 27}$$

Combinando la ecuación 15 con la regla de oro, ecuación 3, se obtiene la siguiente expresión general:

$$k_{TE} = \tau_{ef}^{-1}\left(\frac{g}{1+g}\right) erfc\left(\frac{\lambda^r + e\eta}{\sqrt{4\lambda^r k_B T}}\right) \qquad \textbf{Ecuación 28}$$

Si ahora se reemplaza la nueva definición de g, y la nueva definición de $\langle \Delta(R)\rangle$ y se considera el caso de sobrepotencial cero, y se aproxima la función error complemento por una función gaussiana, se llega a la siguiente expresión para el régimen no adiabático, $g \ll 1$:

$$k_{NA}^{o} = \frac{\Delta}{\hbar}\sqrt{\frac{4k_BT}{\pi\lambda^r}}\, exp\left(\frac{\beta^2 k_B T}{2\kappa} - \frac{\lambda^r}{4k_BT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 29}$$

Es interesante analizar este resultado, que indica que aun en condiciones no adiabáticas la energía de activación posee un término de activación extra, en función de la varianza del desplazamiento proteico, $\delta R^2 = k_B T/\kappa$. En línea con este resultado, se puede ver que si en la expresión de $h(\tau_x, \tau_R)$, ecuación 27, se analiza el límite en que vale $\lambda^r/2k_BT \gg 4\tau_x/\tau_R$, se puede demostrar que la expresión para el τ_{ef} luce de la siguiente manera:

$$\tau_{ef} \cong \tau_x \frac{8k_BT}{\lambda^r} exp(\beta^2 \delta R^2) \qquad \textbf{Ecuación 30}$$

Reemplazando este resultado en la expresión de g se tiene que:

$$g \cong \frac{8\tau_x \Delta k_B T}{\hbar \lambda^r} exp\left({}^3/_2 \beta^2 \delta R^2\right) \qquad \textbf{Ecuación 31}$$

Este resultado amplía el alcance del régimen friccional incluso en el régimen no adiabático típico, aún cuando la frecuencia de tuneleo sea la principal determinante de la velocidad de la TE. Por otro lado, el resultado de teorías previas es rápidamente recuperado cuando se tiene $\delta R^2 \to 0$.

Si ahora se considera el caso en el que el sistema se encontraría bajo un régimen de control friccional puro, $g \gg 1$, bajo las mismos supuestos que para el caso anterior se tiene que:

$$k_{CF}^o = \frac{1}{\tau_{ef}} \sqrt{\frac{4k_BT}{\pi \lambda^r}} exp\left(-\frac{\lambda^r}{4k_BT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 32}$$

Analizando el límite en que vale $\lambda^r/2k_BT \ll 4\tau_x/\tau_R$, ecuación 27, se tiene que $h(\tau_x, \tau_R) \approx 1$, y se puede demostrar que la expresión para el τ_{ef} adopta de la siguiente forma:

$$\tau_{ef} \cong \tau_R \ exp(\beta^2 \delta R^2) \qquad \textbf{Ecuación 33}$$

Si se asume una dependencia de tipo Arrhenius con la temperatura para el tiempo de relajación τ_R:

$$\tau_R(T) = \tau_R^o \ exp\left(\frac{E_s}{k_BT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 34}$$

Combinando las ecuaciones 32, 33 y 34 se llega a una expresión aproximada para el régimen de control friccional puro:

$$k_{CF}^o = \frac{1}{\tau_R^o} \sqrt{\frac{4k_BT}{\pi \lambda^r}} exp\left(-\frac{\beta^2 k_BT}{\kappa} - \frac{\lambda^r}{4k_BT} - \frac{E_s}{k_BT}\right) \qquad \textbf{Ecuación 35}$$

En este capítulo se estudiará el impacto de la fricción molecular sobre la TE proteica que surge como consecuencia del *crowding* molecular. Si bien estas condiciones de alta población molecular traen aparejado diversos efectos sobre los sistemas microscópicos[91–94], en esta tesis en particular, se evaluará el efecto de solo una de sus componentes, la viscosidad. Nuestro sistema de estudio no solo permitió indagar sobre tal efecto, sino que además ofreció la posibilidad de diseccionar las respuestas específicas del sitio metálico, por un lado, y la matriz proteica, por el otro. En esta serie de experimentos se emplearon dos sitios metálicos diferentes, sitios de cobre de Tipo 1 (T1) y sitios de Cu_A. Dentro del grupo conteniendo sitios T1 se estudiaron quimeras tratadas en el capítulo 3 de esta tesis, y la proteína silvestre azurina, que contiene un sitio T1 típico en una matriz proteica de tipo cupredoxina. Dentro del grupo de las Cu_A se estudiaron la *Tt*-Cu_A silvestre y las quimeras *Tt*-1L-E y *Tt*-3L-*Hs*. Esto nos permitió contar con quimeras de ambos sitios metálicos y sus correspondientes variedades silvestres para hacer comparaciones cruzadas. Lamentablemente no contamos con una quimera con sitio de Cu_A en matriz de T1, como aquellas empleadas inicialmente como modelo de Cu_A proteico[95], para completar el esquema. Sin embargo, el conjunto descripto posibilito obtener correlaciones sólidas y lograr cierto grado de disección de las contribuciones del centro metálico y la matriz proteica. Asimismo, se evaluó la bondad de un nuevo modelo de TE propuesto por el Dr. Matyushov, y se logró extenderlo para dar cuenta de los efectos de la viscosidad sobre la k_{TE}^{o}.

5.2- Obtención de k_{TE}^{o} en función del acoplamiento electrónico proteína-electrodo

Uno de los desvíos de la teoría de Marcus es la pérdida de la dependencia exponencial de la constante de TE, k_{TE}^{o}, con la distancia entre el dador y aceptor de electrones, R_{DA}, ecuación 16, por debajo de los 15 Å aproximadamente. Para evaluar el comportamiento de nuestro sistema al reducir el acoplamiento electrónico, se obtuvo la k_{TE}^{o} empleando voltametría cíclica de películas proteicas adsorbidas sobre electrodos recubiertos siguiendo los mismos protocolos comentados en capítulos anteriores. En esta oportunidad también se emplearon SAMs mixtas de SH-$(CH_2)_n$-CH_2-OH y SH-$(CH_2)_n$-CH_3 en proporción 3:2 a fin de garantizar una buena adsorción proteica. Este tipo de recubrimiento permite variar R_{DA} sistemáticamente variando el número de metilenos (*n*) del alcanotiol.[96] Para este estudio se emplearon alcanotioles con *n* de 3, 5, 7, 10 y 15, garantizando distancias dador/aceptor entre 10 y 24 Å.[46,97]

Todas las proteínas medidas presentaron buenas señales voltamétricas cuasi-reversibles. En las Figuras 8 a 11 se muestran voltagramas representativos para SAMs con *n* de 5 y 15, que constituyen las condiciones más extremas evaluadas, para todo el conjunto de proteínas. El análisis a acoplamiento variable se realizó para las dos proteínas silvestres, Azurina y *Tt*-Cu_A, y cinco quimeras, dos de Cu_A (*Tt*-1L-E y *Tt*-3L-*Hs*), y tres con sitios T1 (Az-*Tt*-Cu_A, Am-*Tt*-Cu_A y CBP-*Tt*-Cu_A) Estas condiciones de medida ya fueron testeadas en capítulos anteriores y garantizan que las proteínas adsorbidas no presenten alteraciones en la estructura de su sitio metálico a la vez que presentan respuesta electroquímica reversible. La similitud de los valores de $E°´$ en las diferentes

condiciones analizadas es prueba de que los sitios metálicos no se ven alterados, y debido a que es la matriz proteica quien determina su estructura, esta debe permanecer bien plegada, de lo contrario, las fuerzas que mantienen la geométrica de los ligandos alrededor del metal desaparecerían. La similitud en los valores de *E°´* a lo largo de las distintas condiciones de acoplamiento electrónico en esta serie de experimentos garantiza la integridad del sitio en todos los casos, ver Tabla 1.

Se obtuvieron los valores de k_{TE}^{o} empleando el método de Laviron. En la Figura 12 se presentan curvas de trabajo de Laviron para todos los largos de SAMs empleados, para cuatro proteínas representativas, dos proteínas nativas, Azurina y *Tt*-Cu_A, y dos quimeras, Az-*Tt*-Cu_A y *Tt*-3L-*Hs*. En la Figura 13 se presentan los típicos gráficos de trompeta y gráficos de trompeta normalizados por el valor de k_{TE}^{o}, donde se grafica las posiciones de los picos anódicos y catódicos en función de la velocidad de barrido utilizada en los experimentos voltamétricos. La k_{TE}^{o} incrementa varios ordenes de magnitud al aumentar el acoplamiento electrónico, y esto trae como consecuencia una menor separación de picos a igual velocidad de barrido, de modo que es necesario ir incrementando la velocidad de barrido conforme se acorta la SAM. Es así que para SAMs de n = 15 se emplearon velocidades de entre 50 y 500 mV/s, mientras que, en todos los otros casos, n ≤ 10, velocidades en el rango de 1 a 75 V/s. Inevitablemente esto lleva a que se capture una porción más pequeña de la trompeta y haya mayor dispersión en las curvas de Laviron al emplear SAMs cada vez más cortas. No obstante, en todos los casos se observaron buenos ajustes que permitieron el empleo de este método para determinar los valores de k_{TE}^{o}. Los resultados se resumen en la Figura 14 y en la Tabla 1. Se observa una dependencia exponencial de la k_{TE}^{o} con la distancia para las SAMs más gruesas (n ≥ 10) y una dependencia más sutil para las SAMs más delgadas, tendiendo a una meseta, donde la k_{TE}^{o} parece prácticamente independiente del acoplamiento dador/aceptor de electrones. Resultados similares han sido reportados para las variedades silvestres de azurina y *Tt*-Cu_A, sin embargo, con valores de k_{TE}^{o} mucho menores, lo que puede atribuirse a diferencias en el arreglo experimental dado, como ser distancia entre electrodos de trabajo y referencia, tamaño de electrodo de trabajo, y fuerza iónica empleada, entre otras. A distancias grandes (n > 7) se verifica una dependencia exponencial tal como se anticipa para régimen de TE no adiabático, y se obtienen valores de alrededor de 1 Å para el factor de decaimiento por metileno (β), ver ecuación 16. Por otro lado, la pérdida de este comportamiento, y la presencia de una meseta a distancias cortas sugiere un cambio de mecanismo de TE. El grupo de David Waldeck observó un comportamiento similar frente al acoplamiento variable para azurina adsorbida sobre SAMs hidrofóbicas, y para el citocromo *c* coordinado directamente a la SAM a través de alcanotioles terminados en grupos piridina. A partir de esos estudios se concluyó que a cortas distancias electrodo/proteína operaba un mecanismo de TE de control friccional, es decir, un régimen en el que la dinámica propia de la proteína y el acoplamiento de esta con el medio circundante (fricción) determinan la magnitud de la k_{TE}^{o}.

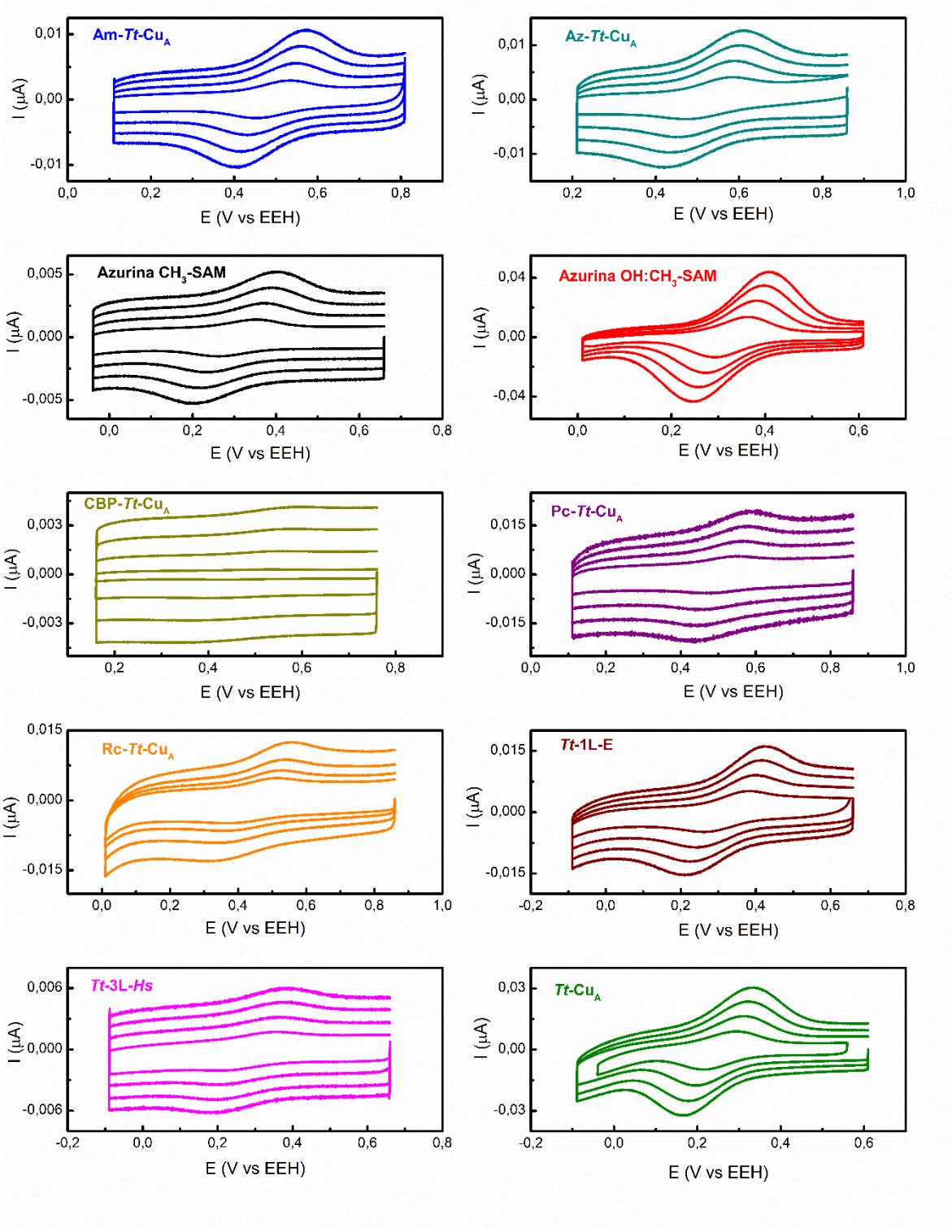


Figura 8: *Voltagramas de proteínas adsorbidas sobre SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=15}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=15}$-CH_3 en proporción 3:2, excepto cuando se indícalo contrario para Azurina, registrados empleando velocidades de barrido entre 50-500 mV.s^{-1}, a 298 K en buffer acético/acetato 10mM, pH 4,6, KNO_3 250 mM.*

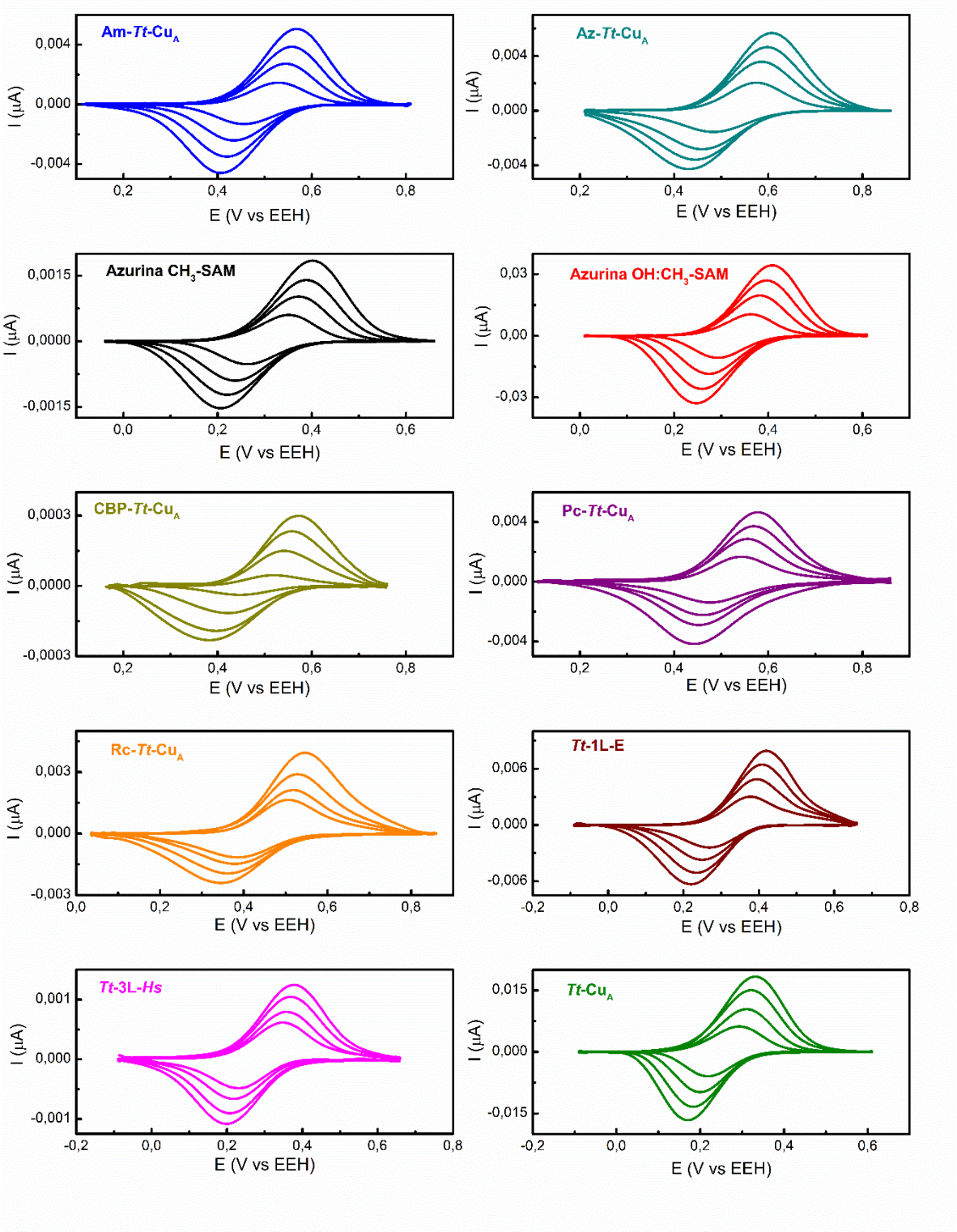


Figura 9: *Voltagramas de proteínas adsorbidas sobre SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=15}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=15}$-CH_3 en proporción 3:2 donde se sustrajo la corriente capacitiva dejando únicamente la corriente debido a la reacción de TE con la película proteica.*

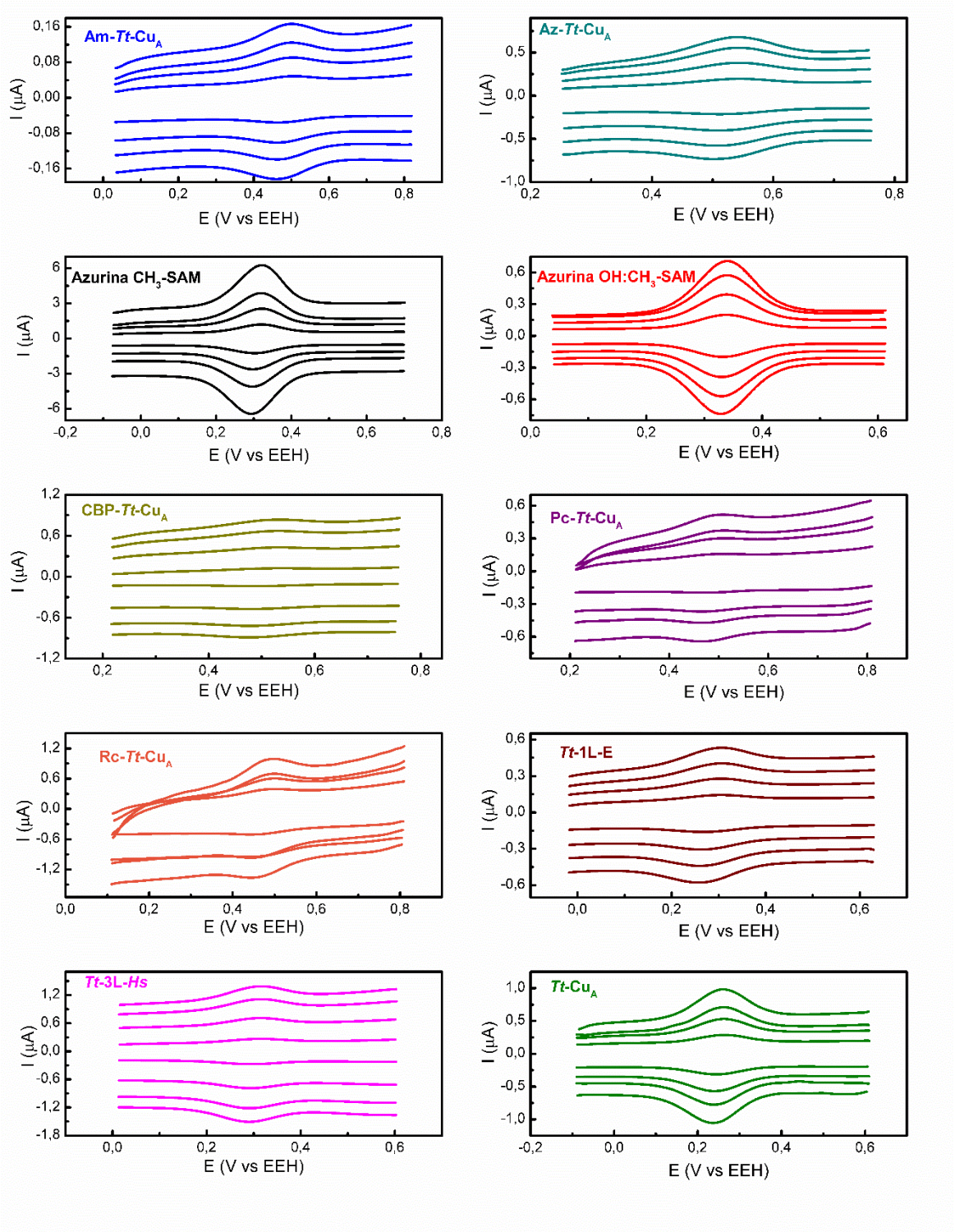


Figura 10: *Voltagramas de proteínas adsorbidas sobre SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=5}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=5}$-CH_3 en proporción 3:2, excepto cuando se indícalo contrario para Azurina, registrados empleando velocidades de barrido entre 5-20 V.s^{-1}, a 298 K en buffer acético/acetato 10mM, pH 4,6, KNO_3 250 mM.*

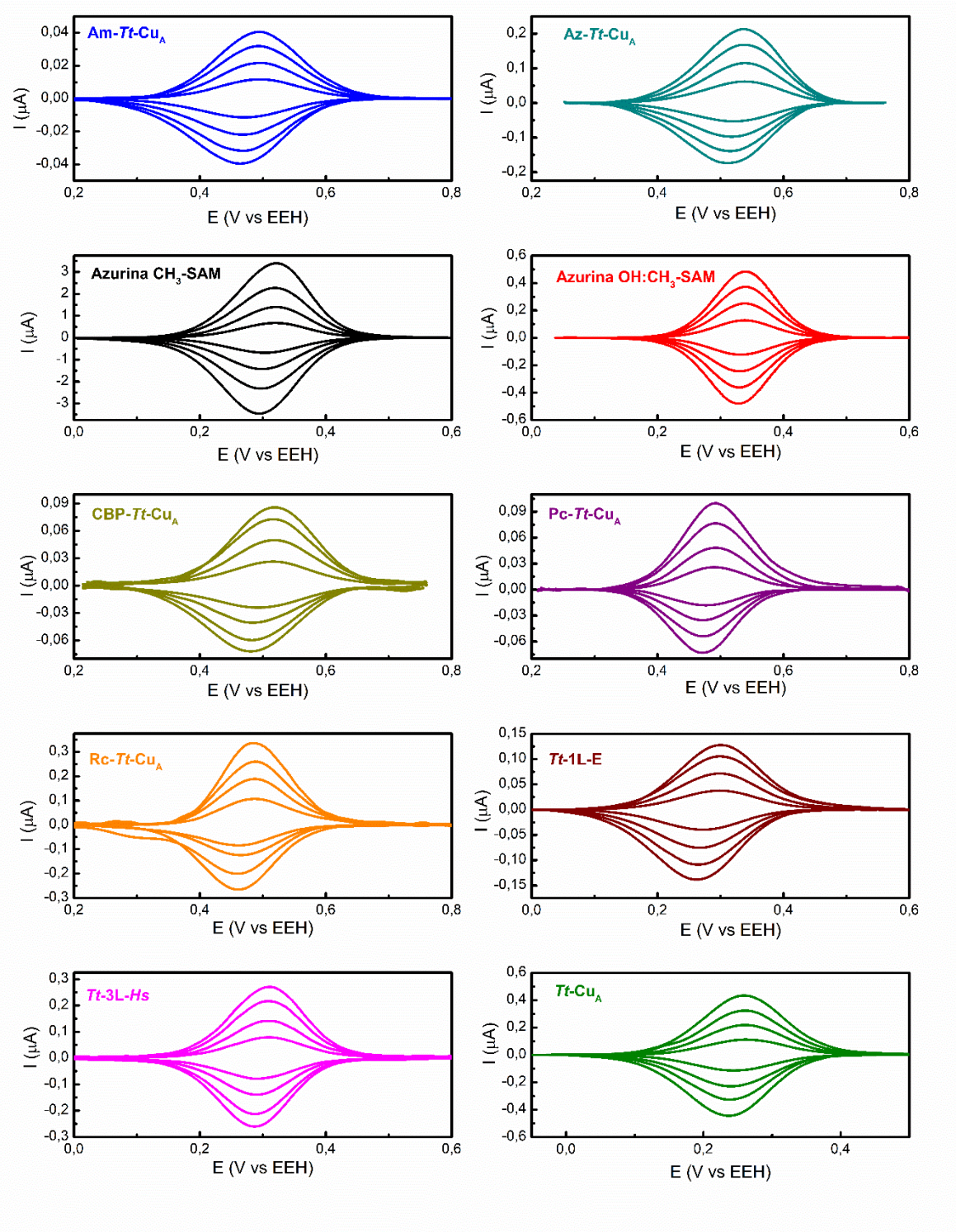


Figura 11: *Voltagramas de proteínas adsorbidas sobre SAMs mixtas SH-$(CH_2)_{n=5}$-OH y SH-$(CH_2)_{n=5}$-CH_3 en proporción 3:2 donde se sustrajo la corriente capacitiva dejando únicamente la corriente debido a la reacción de TE con la película proteica.*

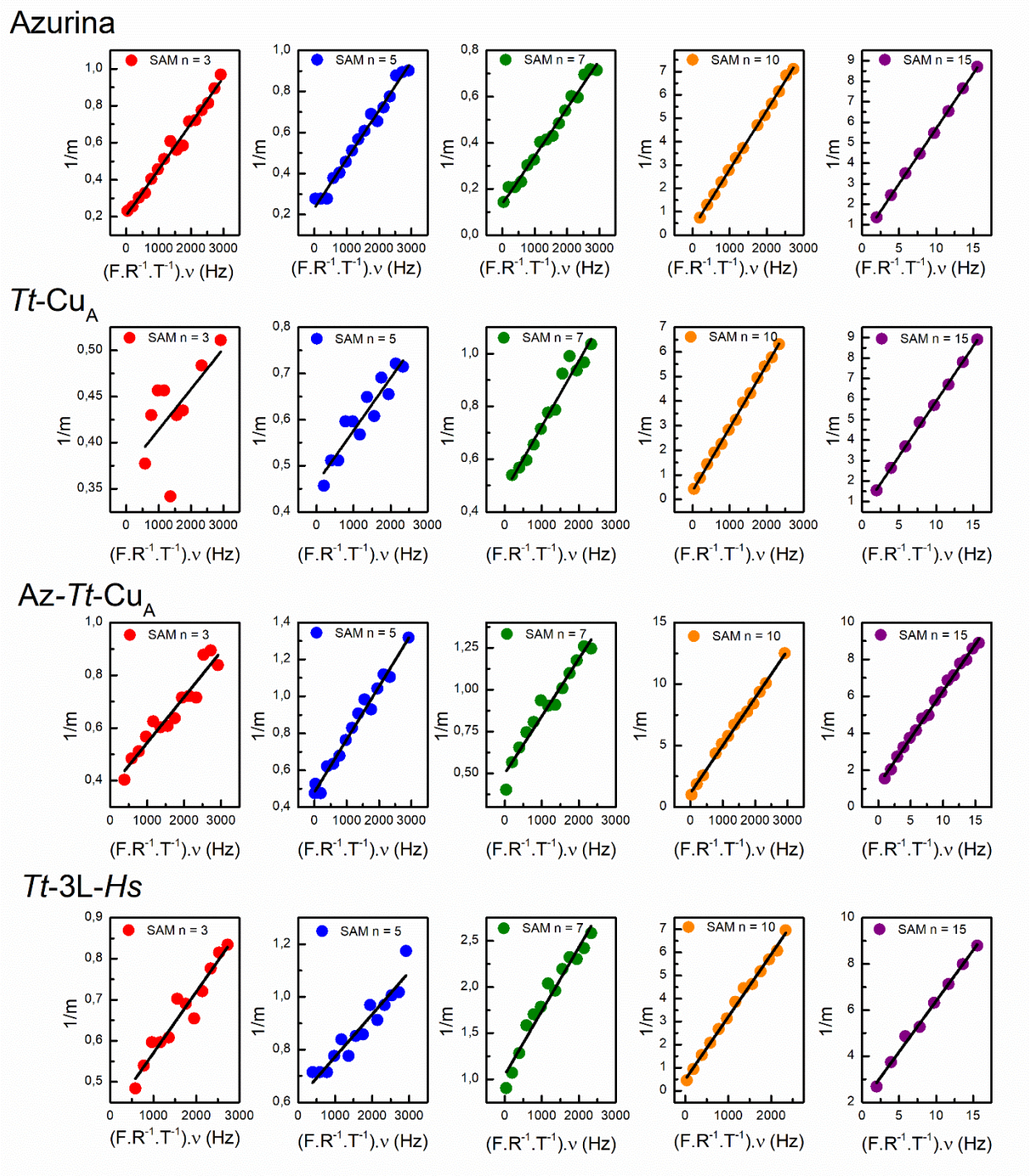


Figura 12: Ajustes de Laviron para todos los largos de SAMs para cuatro proteínas representativas.

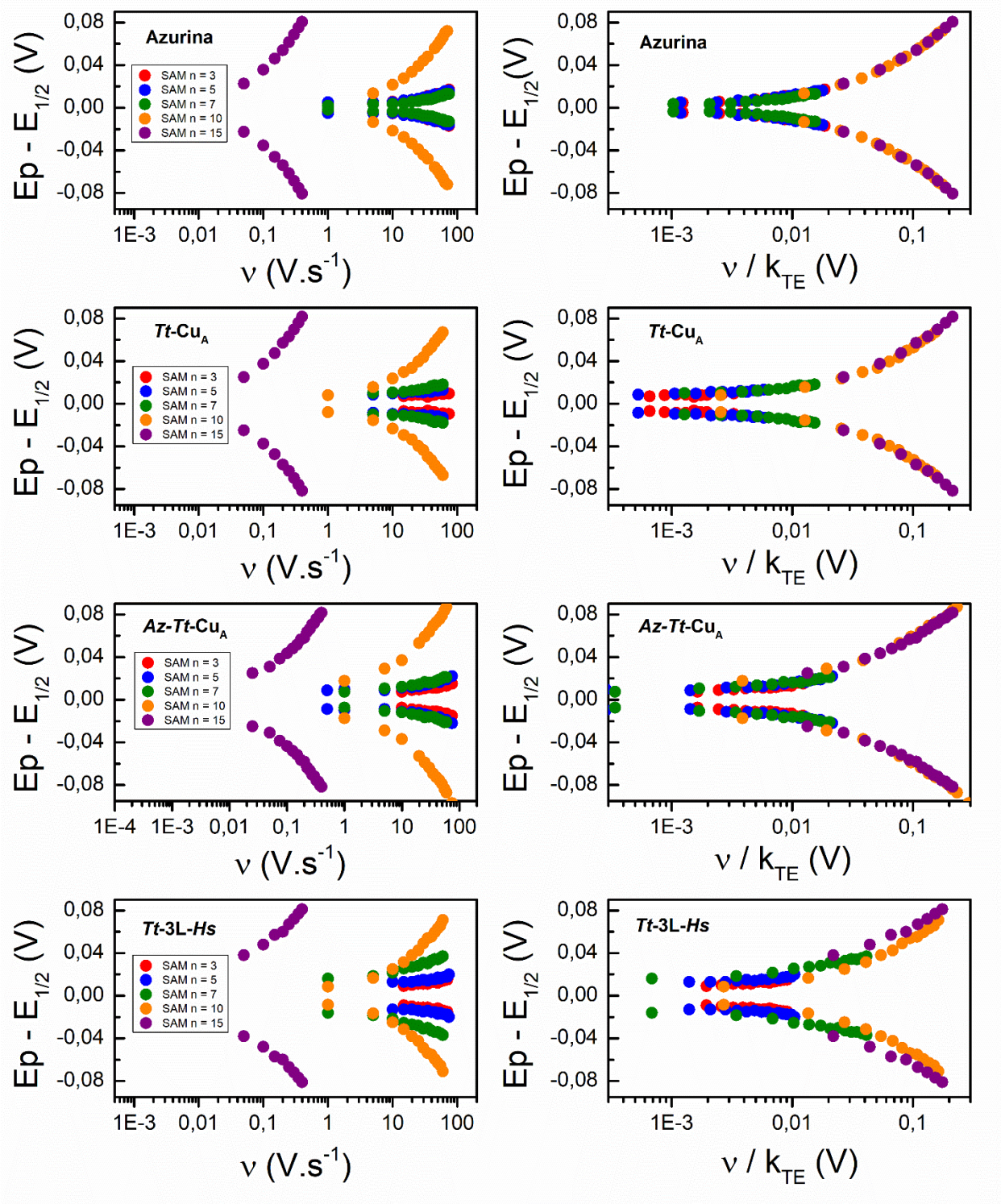


Figura 13: Izquierda, *gráficos de trompetas, potencial de pico (E_p) anódico y catódico en función de la velocidad de barrido (ν), y derecha, gráficos de trompeta normalizados por el valor de la k^o_{TE}, para cuatro proteínas representativas, Azurina, Tt-Cu$_A$, Az-Tt-Cu$_A$ y Tt-3L-Hs, en todas las condiciones de acoplamiento electrónico evaluadas.*

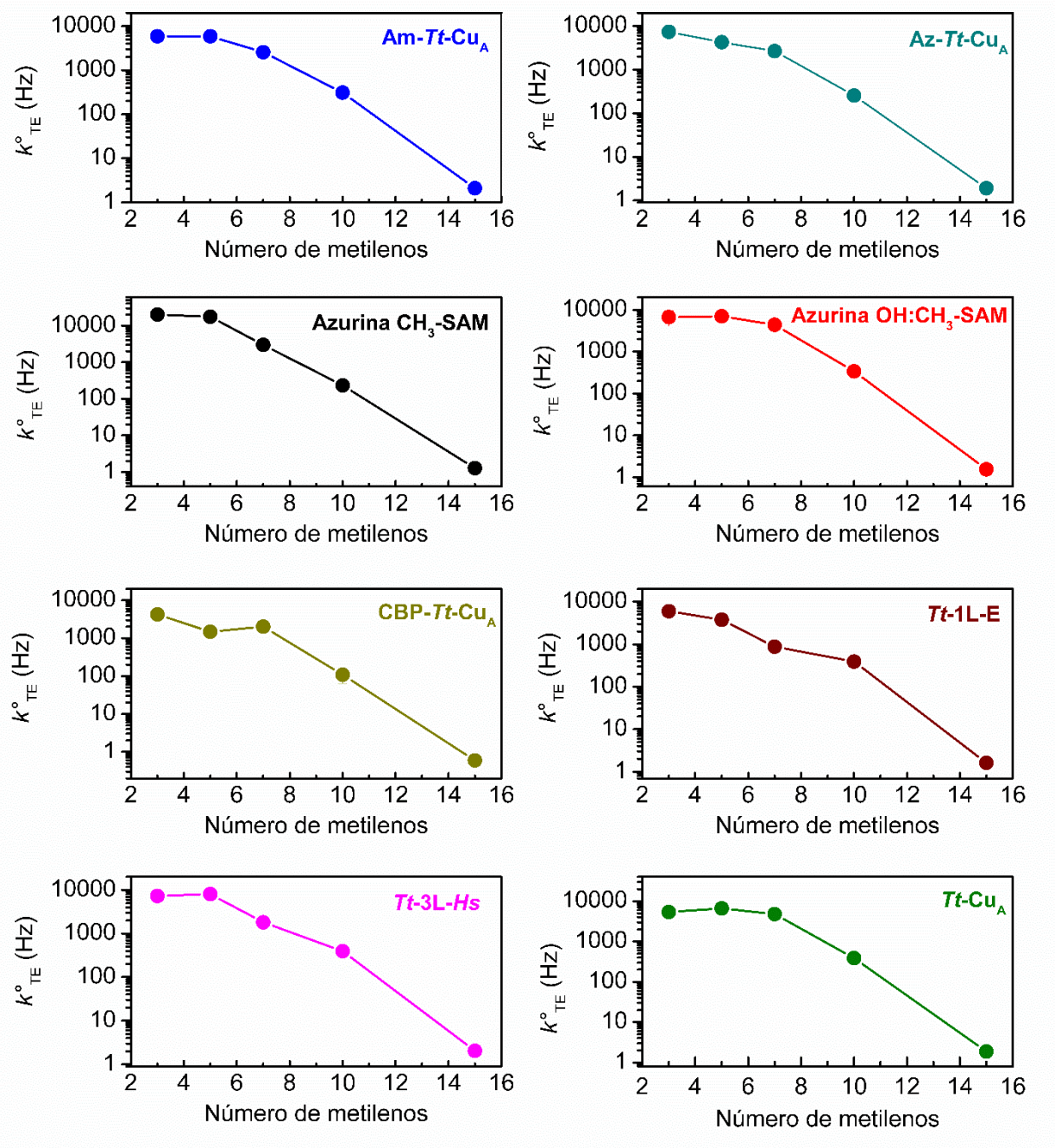


Figura 14: *Valores de* k_{TE}^{o} *en función del largo de monocapa, expresado en número de metilenos.*

Tabla 1: *Valores de k_{TE}^{o} obtenidos empleando los método de Laviron para todas las proteínas evaluadas. En paréntesis se indican los valores de error estándar.*

	k_{TE}^{o} (Hz)				
SAMs con n	3	5	7	10	15
Azurina SAM-CH_3	20000 (±5000)	17000 (±2000)	3000 (±400)	232 (±5)	1,3 (±0,2)
Azurina SAM-CH_3-OH	6700 (±2700)	7000 (±1600)	4400 (±700)	340 (±50)	1,6 (±0,3)
Tt-Cu_A	5400 (±500)	6600 (±1300)	4800 (±600)	390 (±20)	1,9 (±0,1)
Az-*Tt*-Cu_A	7300 (±1000)	4200 (±300)	2600 (±200)	260 (±2)	1,9 (±0,1)
Am-*Tt*-Cu_A	6000 (±1000)	6000 (±1000)	2600 (±400)	309 (±8)	2,08 (±0,07)
CBP-*Tt*-Cu_A	4300 (±700)	1500 (±100)	2000 (±200)	110 (±40)	0,59 (±0,01)
Tt-1L-E	6000 (±800)	3800 (±400)	900 (±200)	392 (±5)	1,6 (±0,1)
Tt-3L-*Hs*	7300 (±1300)	8000 (±400)	1800 (±100)	390 (±20)	2,0 (±0,1)

Tanto el método como el sistema de medida empleados reúnen las condiciones óptimas para experimentos de cinéticas rápidas. Se emplearon electrodos de oro relativamente pequeños, con una superficie electroactiva en el rango de 2,6 a 7,9 mm^2, electrodos de referencia de volumen reducido especialmente diseñados para experimentos cinéticos, y se utilizó una concentración de electrolito soporte suficientemente alta (250 mM KNO_3) para asegurar trabajar en una zona independiente de la fuerza iónica del medio. Estos recaudos nos permitieron obtener valores de k_{TE}^{o} mucho más altos que los reportados hasta la fecha en sistemas y condiciones similares. Aún extremando los cuidados experimentales, en todos los casos se observó la presencia de una región donde la k_{TE}^{o} resulta independiente de la distancia electrodo/proteína. Por otro lado, si bien no existe ningún límite teórico para la obtención de la k_{TE}^{o} por el método de Laviron decidimos realizar experimentos control empleando otra técnica alternativa que permite obtener este parámetro para todas las distancias electrodo/proteína estudiadas, para los dos sistemas silvestres, azurina y *Tt*-Cu_A, y una de las quimeras, Az-*Tt*-Cu_A. Específicamente se utilizó el método de Creager[98] basado en voltametría de corriente alterna. Como se comentó en el capítulo 2 sección 2.2.4.1, en este método la perturbación pasa del dominio temporal al dominio de frecuencias, donde la frecuencia creciente es la que permite determinar la k_{TE}^{o} y de esta manera constituye un control adecuado del método de Laviron basado en voltametría cíclica convencional, donde la perturbación se encuentra en el domino temporal (velocidades de barrido crecientes). A su vez, como este método reporta valores de k_{TE}^{o} con un orden superior (10^5 Hz)[99,100] al de aquellas observadas en la región de la meseta a distancia cortas (10^4 Hz) resulta ideal para corroborar, una vez más, el origen no artificial de esta. Los resultados se presentan en la Figuras 15 y 16.

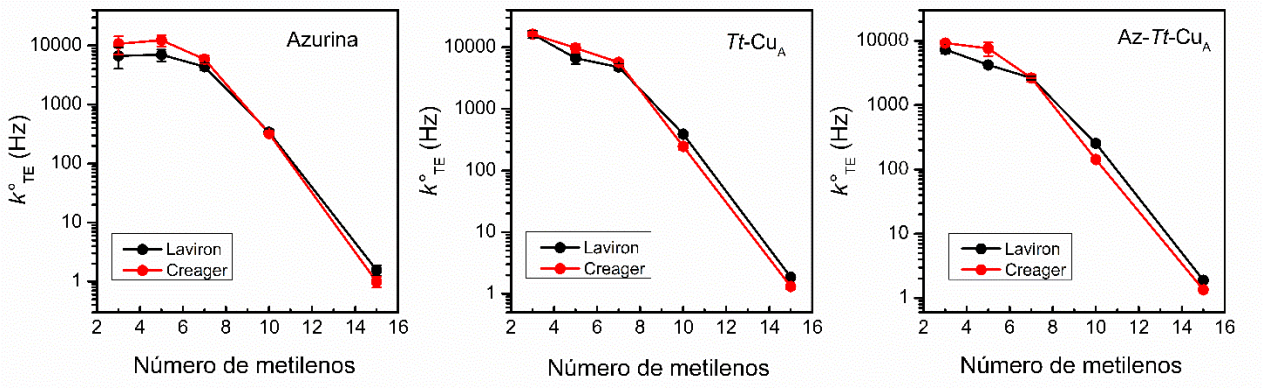


Figura 15: *Valores de k^{o}_{TE} determinadas por los métodos de Laviron y de Creager para tres proteínas, Azurina (en SAM mixta), Tt-Cu$_A$ y Az-Tt-Cu$_A$, en función del largo de monocapa.*

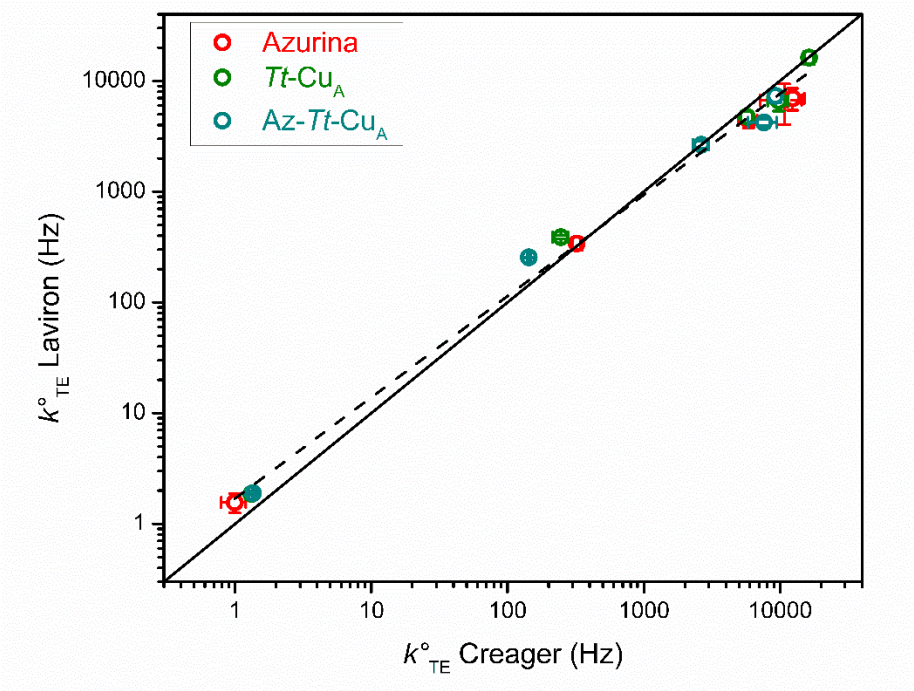


Figura 16: *Valores de k^{o}_{TE} determinadas por los métodos de Laviron en función de aquellos determinados por método de Creager para Azurina (en SAM mixta), Tt-Cu$_A$ y Az-Tt-Cu$_A$, en función del largo de monocapa. En línea punteada se presenta un ajuste lineal de los datos, cuya pendiente (0,91 ± 0,02) difiere ligeramente de la ideal (línea entera).*

Como puede observarse, ambos métodos dan como resultado valores de k_{TE}^{o} del mismo orden para todas las distancias y proteínas testeadas y reproducen perfectamente tanto la zona de incremento exponencial a distancias largas como la meseta a distancias cortas. Si bien el análisis por ambos métodos coincide, y verifica la existencia del comportamiento bifásico de k_{TE}^{o} parece existir una diferencia sistemática sutil. Para monocapas largas, con n de 7 y 15, los valores obtenidos por Creager son sistemáticamente más pequeños que aquellos obtenidos por Laviron, mientras que a monocapas cortas, n de 3 y 5, esta tendencia se invierte observándose valores sistemáticamente mayores. Muy probablemente estas diferencias estén sujetas a la susceptibilidad diferencial de ambas técnicas frente a pequeños desviamientos de la idealidad de los datos experimentales. Así como también al número de parámetros ajustables y a los grados de libertad de estos en cada método. El método de Creager necesita dos parámetros ajustables , el cociente de capacitancias de la monocapa y del analito adsorbido (C_{AD}/ C_{DC}) y la k_{TE}^{o}, y la variable de ajuste es una corriente de pico normalizada. El método de Laviron es más robusto en ese sentido, dado que se basa únicamente en la separación de picos anódicos y catódicos en función de la velocidad de barrido, independientemente de la intensidad del pico, y en su ajuste existe un único parámetro ajustable, la k_{TE}^{o}. En este sentido Creager ha reportado diferencias en los valores de k_{TE}^{o} obtenidos mediante su método de análisis y el análisis convencional de experimentos de impedancia para un mismo set de datos.[98] La principal diferencia radica en el número de parámetros ajustables que, al variar, altera sus grados de libertad en los ajustes, y en diferencias en la variable que se está ajustando, por ejemplo, la componente imaginaria y real de la impedancia (análisis convencional) frente a la corriente de pico (Creager) en función de la frecuencia. Otras características del sistema en estudio no contempladas por el modelo, como ser la existencia de una distribución de orientaciones del analito en estudio, también pueden impactar con diferente peso en ambas técnicas, contribuyendo de manera diferencial a los valores de k_{TE}^{o}.[101,102]

En la Figura 17 se presentan los ajustes de Creager para tres casos representativos de sitios de cobre en distintas condiciones de acoplamiento electrónico. Puede observarse, de manera general, que al graficar el cociente de la corriente de pico y la corriente base ($\left|i_p/i_b\right|$) en función de la frecuencia en unidades de Hertz (ν), la sigmoidea que describen se desplaza hacia la derecha al aumentar el acoplamiento electrónico. Esto se debe a que cuanto más rápida es la velocidad de TE mas alta debe ser la frecuencia para que el sistema deje de percibir la perturbación y deje de reaccionar llevando a una caída en la corriente. Por otra parte, el límite al que tiende el sistema a frecuencias bajas, es cada vez más bajo al aumentar el acoplamiento electrónico, y esto se debe a que ese valor resulta del cociente de las capacitancias de la doble capa (C_{DC}), y la capacitancia de la submonocapa de proteínas adsorbidas (C_{AD}), ver sección 2.2.4.1 en Capítulo 2. Al acortar al monocapa mayor será la C_{DC} debido a que la solución aledaña a la superficie del electrodo percibe un campo eléctrico más intenso, por lo tanto, aumenta el cociente C_{DC}/C_{DC}, y dado que en el límite en que $\nu \to 0$ se tiene que $\left|i_p/i_b\right| \to 1 + (C_{DC}/C_{AD})^{-1}$, al aumentar el valor de C_{DC}, disminuye el de $\left|i_p/i_b\right|$. Recordemos que la concentración superficial de proteína es independiente de la

fuerza del campo eléctrico y depende de las propiedades de la superficie de la monocapa, de modo que ésta es relativamente constante al acortar el largo de la monocapa, y no sucede lo mismo con la concentración de electrolito. Puntualmente, cuando $C_{DC} > C_{AD}$ se tendrá que $\left|i_p/i_b\right| < 2$ como ocurre en monocapas cortas, y cuando $C_{DC} < C_{AD}$ se tendrá que $\left|i_p/i_b\right| > 2$, como se observa para monocapas más largas. El cociente C_{DC}/C_{DC} también va de la mano con la relación de coberturas de las proteínas evaluadas, es decir, con el valor intrínseco de C_{AD} de cada una de ellas, que de manera decreciente siguen el siguiente orden: azurina > *Tt*-Cu_A > Az-*Tt*-Cu_A. A su vez, dado que las capacitancias también dependen de la superficie electroactiva del electrodo y del grado de cobertura, que pueden variar entre experimentos, es posible que esta tendencia no se cumpla estrictamente si se comparan electrodos con diferentes áreas, como es el caso de algunos ajustes de Creager representativos que se presentan en la Figura 17. La tendencia global en todo el conjunto de datos verifica estas relaciones. Sin embargo, es importante notar que el cociente de capacitancias no altera los valores de k_{TE}^{o}, dado que son parámetros independientes. Otro aspecto interesante que se deprende de este conjunto de experimentos es el hecho de que existen desvíos de un ajuste sigmoideo exacto, como el que se puede observar antes y después del punto de inflexión de las curvas sigmoideas, y fue relacionado con la presencia de distintas poblaciones con diferentes velocidades de TE. Esto indica que las proteínas adsorbidas presentan cierta dispersión de orientaciones sobre las SAMs, lo que lleva a la existencia de poblaciones minoritarias más rápidas y más lentas. Este aspecto es mucho menos obvio, y prácticamente imperceptible, en los típicos experimentos voltamétricos con corriente continua.

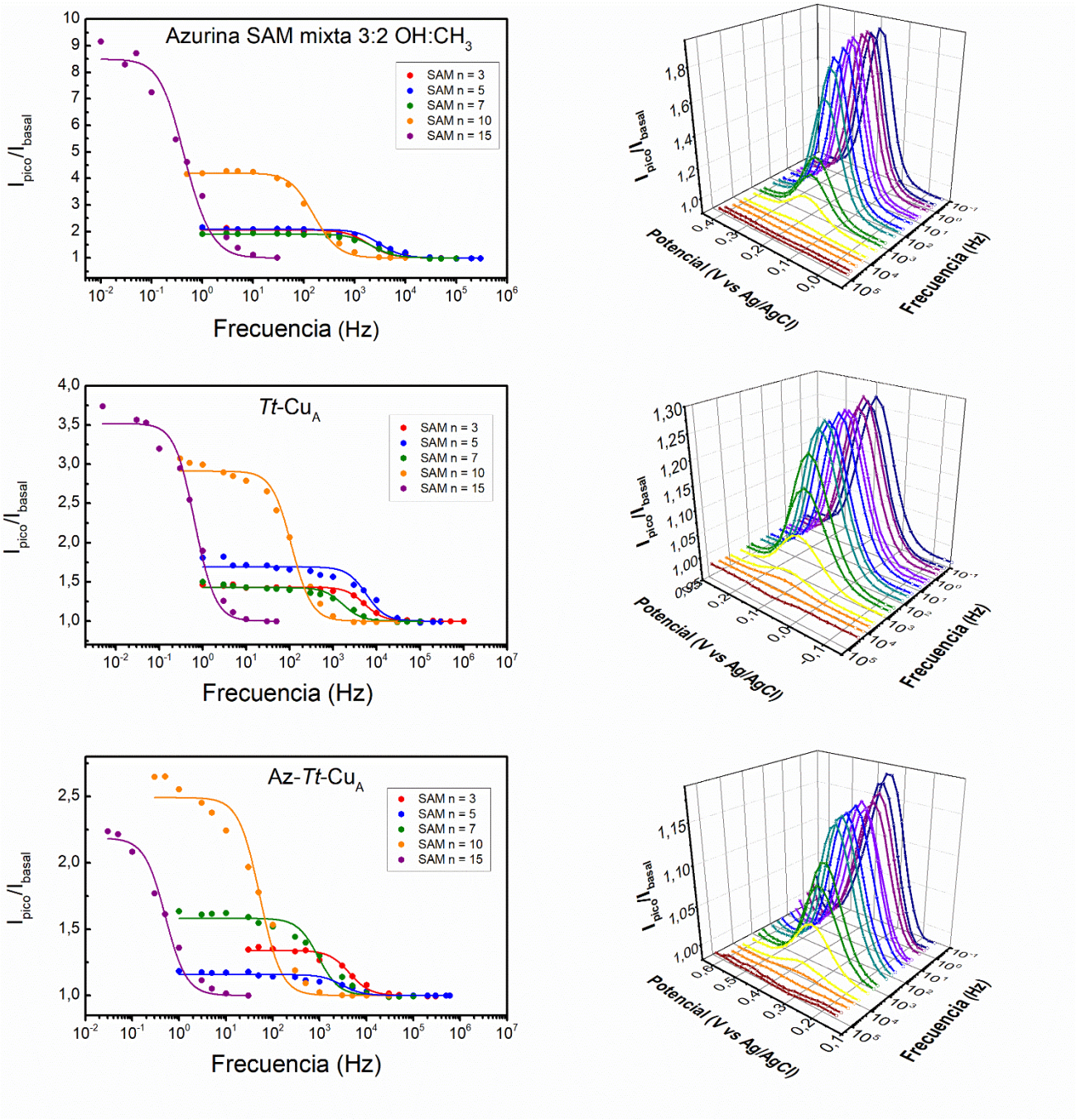


Figura 17: Izquierda, *gráficos de I_{pico}/I_{base} en función de la frecuencia para tres proteínas representativas, Azurina, Tt-Cu$_A$ y Az-Tt-Cu$_A$, para todos los largos de monocapa. Las curvas corresponden a los ajustes de Creager para obtener k_{TE}^{o} (Ecuación 39 capítulo 2). Derecha, voltagramas relativizados por la corriente de base (I_{pico}/I_{base}) a distintas frecuencias para monocapas con n = 3, la condición de mayor k_{TE}^{o} registrada. Notar que el código de colores en el panel izquierdo se corresponde con el largo de SAM, mientras que en el panel derecho representa un gradiente de frecuencias empleadas.*

5.3- Obtención de k_{TE}^{o} en función de la viscosidad.

A juzgar por los resultados anteriores el cambio de comportamiento al aumentar el acoplamiento electrónico entre el sitio metálico y el electrodo estaría reportando un cambio de régimen en el mecanismo de TE, en el que, a distancias largas, n ≥ 10, la velocidad de la TE estaría dominada por la frecuencia de tuneleo electrónico, régimen no adiabático, mientras que a monocapas más cortas, n ≤ 7, el mecanismo se vuelve independiente de la probabilidad de tuneleo. Según la hipótesis de Waldeck, el mecanismo que opera a distancias cortas es uno de control friccional donde ahora el paso limitante de la reacción es la frecuencia de vibración nuclear efectiva del entorno dipolar, ν_{ef}, siendo esta la que determina el acceso al punto de cruce entre ambos perfiles de energía libre del sistema. Para solventes de tipo Debye esta frecuencia se encuentra asociada al tiempo de relajación dieléctrico, y por ende se encuentran controlados por la viscosidad del medio. En sistemas basados en materia blanda, macromoléculas como las proteínas, la viscosidad de la solución afecta la dinámica proteica, llevando a un mecanismo de TE bajo control friccional.[47] Estas ideas llevaron a evaluar la dependencia de la k_{TE}^{o} heterogénea con la viscosidad del medio (η) sobre metaloproteínas de cobre y hemoproteínas. Estos experimentos lograron poner de manifiesto esta dependencia, más aún, mostraron que la k_{TE}^{o} disminuía hiperbólicamente con la η con un factor de decaimiento (γ), ver ecuación 11, cuyo valor se encuentra entre 0 y 1. Además, experimentos realizados con citocromo *c* empleando distintos largos de monocapa mostraron que este factor γ se incrementa al aumentar el acoplamiento electrónico.[61] A fin de testear si una tendencia similar rige el comportamiento en nuestro conjunto de proteínas, se realizaron experimentos voltamétricos para obtener la k_{TE}^{o} en función de la viscosidad creciente del medio para nuestro conjunto de proteínas de cobre.

La relevancia de profundizar el entendimiento de estos sistemas bajo estas condiciones se encuentra intrínsecamente ligado a las condiciones bajo las que se llevan a cabo estas reacciones *in vivo*. El alto grado de *crowding* molecular lleva inevitablemente a un aumento de viscosidad del medio. Es por ello que se emplearon diferentes concentraciones de agentes viscosantes (o de *crowding*) que fueron ajustadas para llegar a viscosidades de hasta 4 cP, el valor estimado para el citosol celular, y como experimento control se alcanzaron concentraciones de hasta 60 cP, como la que se encuentra en el interior mitocondrial.[103] Específicamente, se emplearon soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa, o polietilenglicol de peso molecular promedio de 4000 Da (PEG-4000), moléculas que se seleccionaron por ser comúnmente empleadas en experimentos biológicos por minimizar interacciones específicas, asimismo la diferencias intrínsecas entre ambas moléculas sirve de control interno negativo de la existencia de tales interacciones en nuestro sistema en particular, ver más adelante Figura 25 y Tabla 3. Por otro lado, es importante señalar que las concentraciones empleadas de agentes viscosantes no altera la integridad de los sitios metálicos ya que los espectros Raman resonantes y de absorción electrónica permanecen inalterados en estas condiciones, más allá de cierta dispersión extra, ver Figuras 18 y 19. De la mano de estas observaciones, las respuestas voltamétricas no se ven afectadas por el

empleo de estos agentes, salvo por la separación de picos anódicos y catódicos, lo que da cuenta del efecto de la viscosidad sobre la reacción de TE, ver Figuras 21 y 22. De hecho, los potenciales de reducción permanecen constantes en gran medida para las concentraciones de agentes de viscosantes empleadas, con cambios menores incrementando o disminuyendo su valor respecto del valor a viscosidad unitaria en ciertas proteínas, mientras que otras no presentan cambios notables, ver más adelante Figura 20. Estas variaciones, que en el mayor de los casos (Am-*Tt*-Cu_A) llegan a apenas 24 mV, probablemente den cuenta de cambios de estabilización relativa de ambos estados redox debido a variaciones de la constante dieléctrica el medio, que afectará en distinto grado a cada variante, y no necesariamente de igual manera en ambos estados redox.

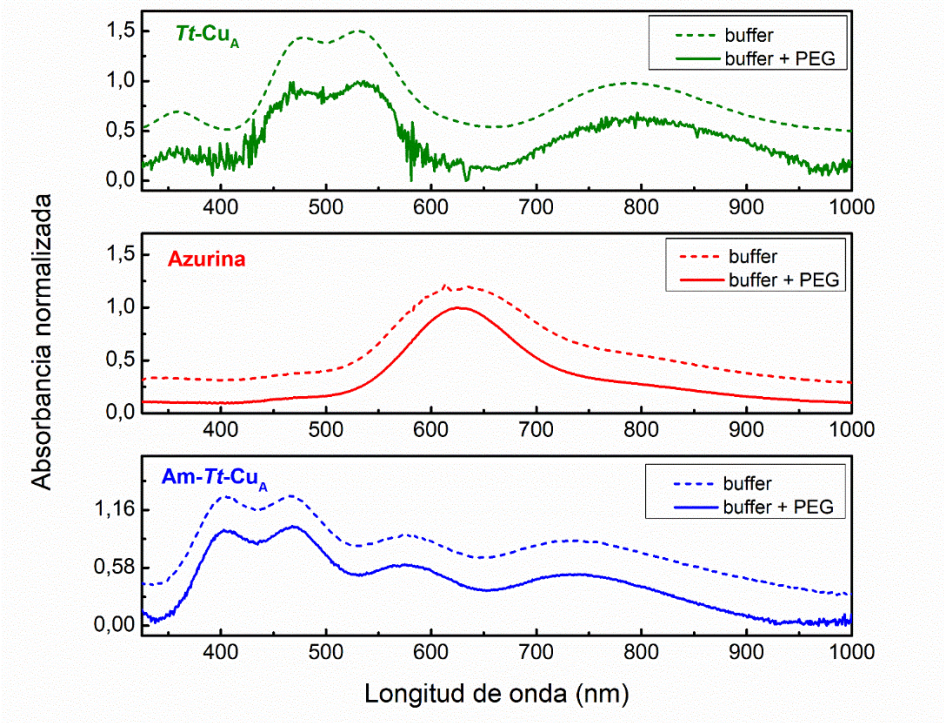


Figura 18: Espectros de absorción electrónica de proteínas representativas, *Tt*-Cu_A, Azurina y Am-*Tt*-Cu_A, medidos a 25°C en buffer acético/acetato 10 mM (pH 4,6, 250 mM KNO_3), con y sin la adición de 20% PEG-4000. Los espectros en ambas condiciones fueron desfasados en una constante para mayor claridad.

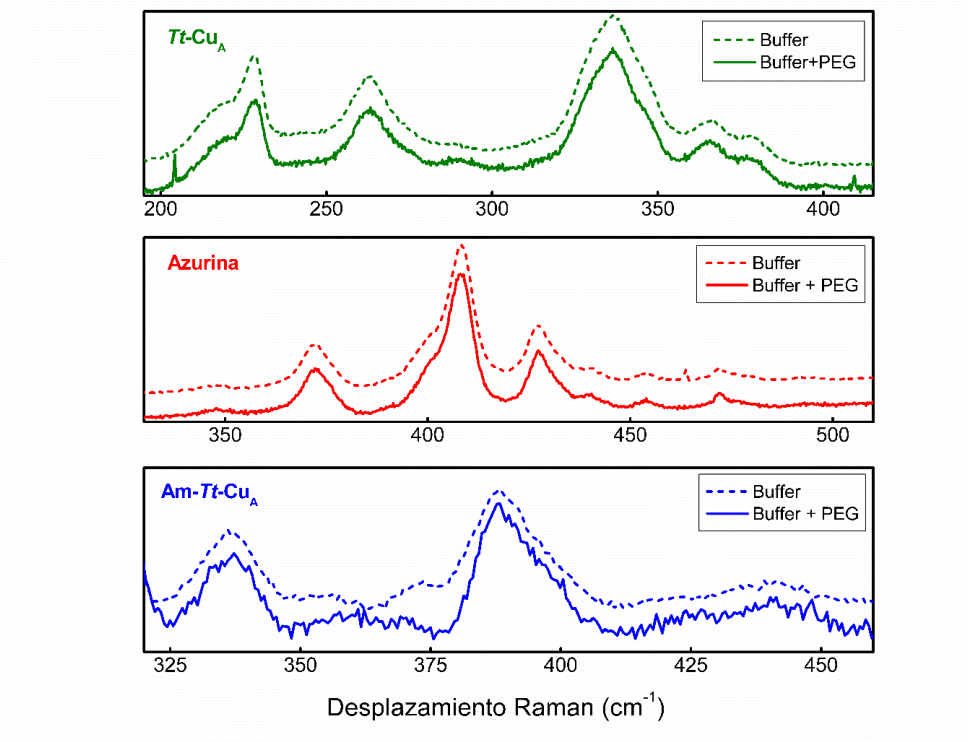


Figura 19: *Espectros Raman resonante de proteínas representativas, Tt-Cu$_A$, Azurina y Am-Tt-Cu$_A$, medidos a 77 K empleando una longitud de onda de excitación de 532 nm, en buffer acético/acetato 10 mM (pH 4,6, 250 mM KNO$_3$), con y sin la adición de 20% PEG-4000.*

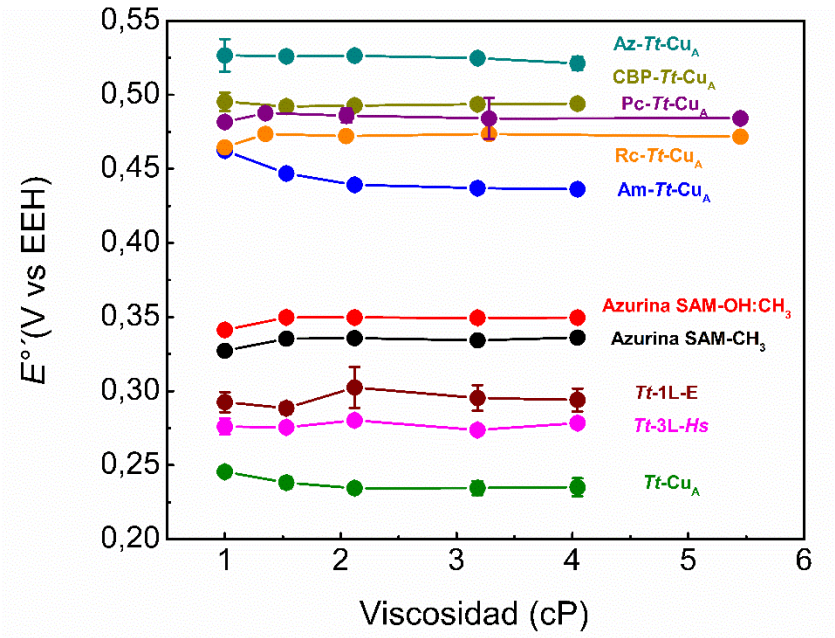


Figura 20: Potenciales de reducción contra el potencial del electrodo estándar de hidrógeno (EEH), en función de viscosidad creciente para todas las proteínas, empleando monocapas n = 5.

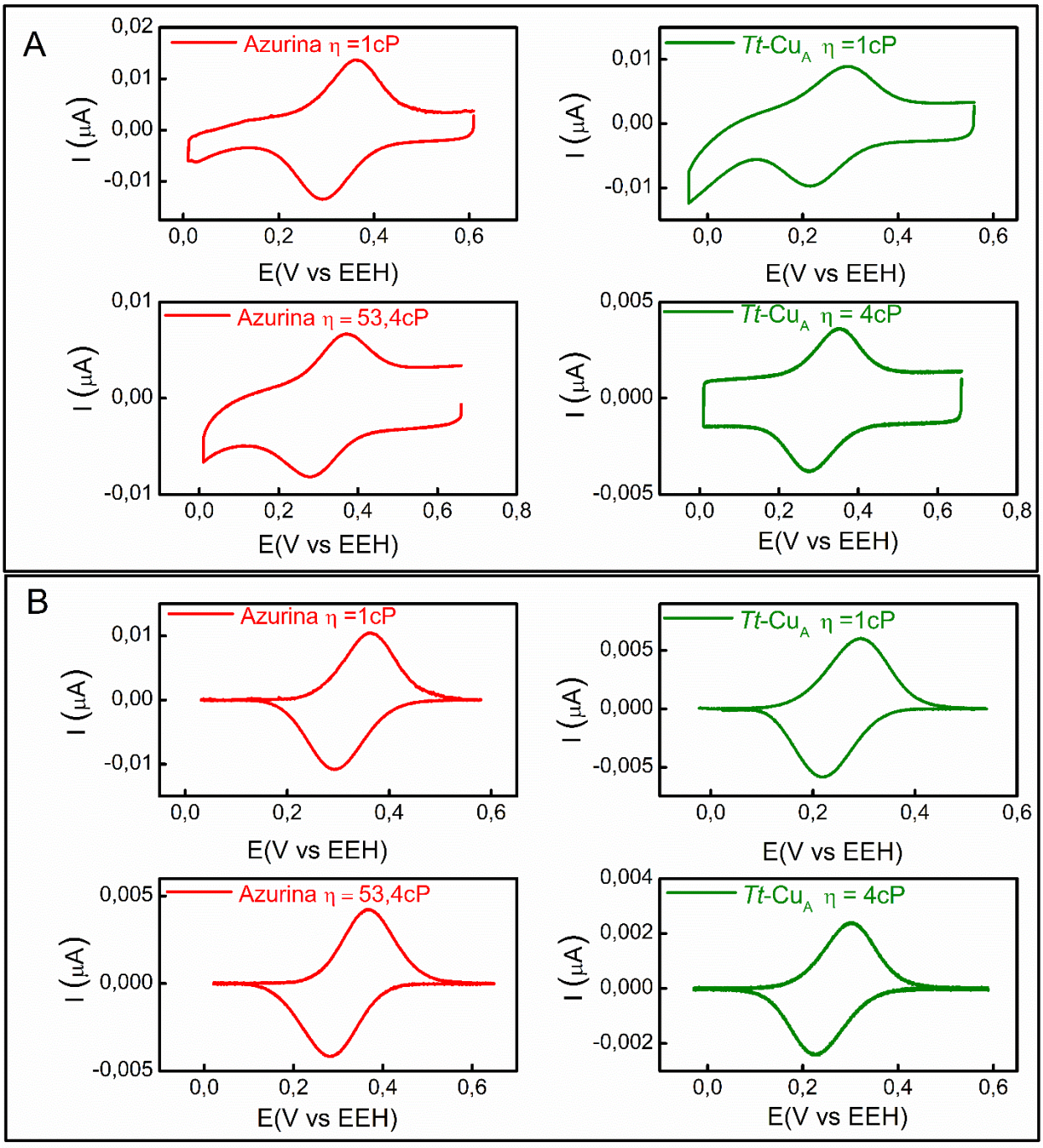


Figura 21: *Voltagramas representativos obtenidas a 0,1 V.s^{-1} para Azurina y Tt-Cu$_A$ adsorbidas en electrodos recubiertos con monocapas con n = 15. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C en buffer acético/acetato 10 mM (pH 4,6 y 250 mM KNO$_3$) en presencia y ausencia de agente viscosante (PEG-4000). Panel superior (**A**) voltagramas sin ningún procesamiento, panel inferior (**B**) voltagramas donde se sustrajo la corriente capacitiva.*

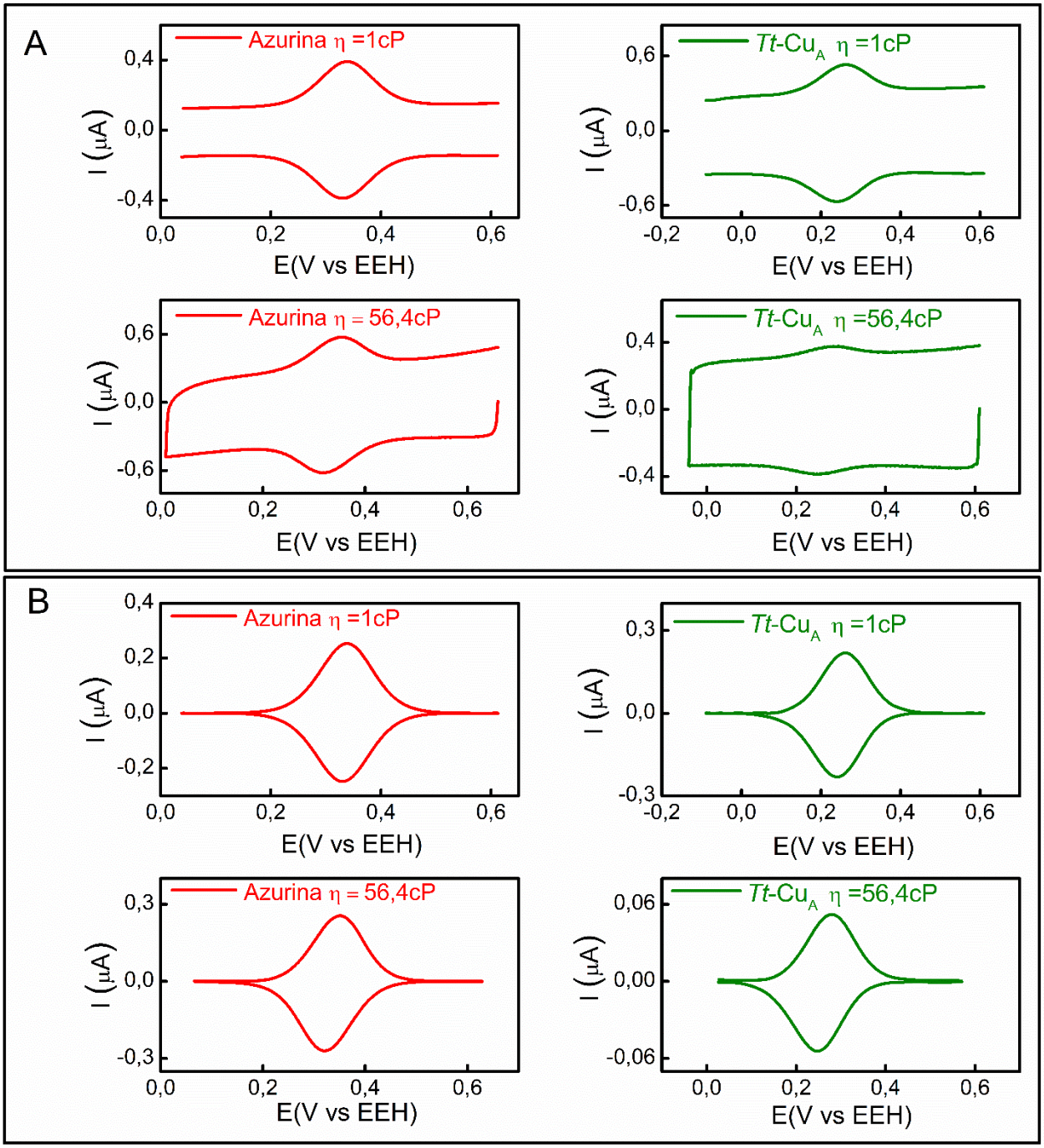


Figura 22 *Voltagramas representativos obtenidas a 10 V.s^{-1} para Azurina y Tt-Cu$_A$ adsorbidas en electrodos recubiertos con monocapas con n = 5. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C en buffer acético/acetato 10 mM (pH 4,6 y 250 mM KNO$_3$) en presencia y ausencia de agente viscosante (PEG-4000). Panel superior (**A**) voltagramas sin ningún procesamiento, panel inferior (**B**) voltagramas donde se sustrajo la corriente capacitiva.*

En todos los casos los experimentos se condujeron empleando una concentración de electrolito soporte (KNO_3) y buffer (10 mM acético/acetato pH 4,6) constantes, de forma tal que la fuerza iónica de la solución (I = 250 mM) se mantenga constante. Tal como se indica en la Figura 23 este valor asegura trabajar en una zona donde la k_{TE}^{o} es independiente de la fuerza iónica de la solución en viscosidades entre 1 y 4 cP.

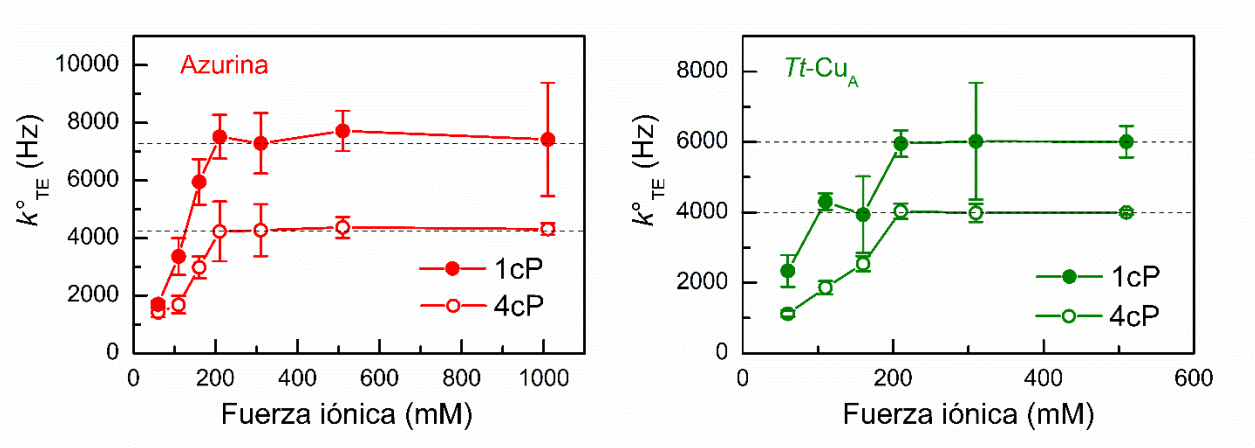


Figura 23 *Valores de k_{TE}^{o} en función de la fuerza iónica de la solución para Azurina y Tt-Cu$_A$ obtenidos empleando monocapas cortas (n = 5). Cada punto representa el valor medio de al menos tres medidas independientes realizadas a 25°C en buffer 10 mM ácido acético/acetato pH 4,6. Los símbolos completos representan medidas a viscosidad 1 cP, mientras que símbolos vacíos representan medidas realizadas a 4 cP, donde la viscosidad se modulo empleando sacarosa como agente viscosante.*

A fin de testear el efecto sobre la dinámica proteica en nuestras proteínas de cobre, se determinaron los valores de k_{TE}^{o} en función de la viscosidad del medio en un rango de 1 a 5 cP, para todos los largos de monocapas (n de 3 a 15) para Azurina y *Tt*-Cu$_A$. Adicionalmente, para el caso de Azurina se emplearon dos monocapas distintas, una mixta que representa la condición empleada por todo el conjunto de proteínas de esta tesis, y otra completamente hidrofóbica, dado que es la condición en la que se encuentran reportados los parámetros bibliográficos para esta proteína. Los resultados se presentan en la Figura 24. Tanto Azurina como *Tt*-Cu$_A$ presentan una dependencia hiperbólica de la k_{TE}^{o} con la viscosidad del medio. Ajustes de los datos a la ecuación 11 permitieron obtener el factor de decaimiento gama, γ, para ambas proteínas, ver Figura 24-B y C y Tabla 2. Esta dependencia hiperbólica con la viscosidad es máxima en monocapas cortas (n = 4) y se vuelve cada vez más débil al aumentar el largo de esta, llegando a desaparecer a n = 15, donde la k_{TE}^{o} es independiente de la viscosidad. Este comportamiento es equivalente al reportado para citocromo *c* coordinado sobre monocapas terminadas en grupos piridina y representa la firma

de un régimen friccional. Es interesante que el factor γ, que representa una medida del acoplamiento de la dinámica proteica con el entorno dipolar (solvente), sea no despreciable incluso en monocapas con n entre 7 y 10, lo que corresponde a distancias de tuneleo de entre 15 y 18,3 Å, compatible con típicas distancias biológicamente relevantes en TE proteica. Más aún, esto es compatible con el hecho de que el factor β calculado previamente entre la k_{TE}^{o} a n = 10 y 15, que representa el factor de decaimiento del acoplamiento electrónico con la distancia, ver ecuación 16, sea ligeramente inferior al valor ampliamente reportado de 1 $Å^{-1}$. Es decir, ya a n = 10 la fricción comienza a influenciar el acceso al punto de cruce para que se lleve a cabo la reacción de TE. Otra observación importante es que la diferencia observada para el parámetro γ entre monocapas con n de 3 y 5 disminuye drásticamente, indicando que se alcanza un valor límite, formando una meseta tal como ocurrió con los gráficos de k_{TE}^{o} en función de la distancia. Este comportamiento sigmoideo del parámetro γ indica una suerte de situación de compromiso entre la frecuencia de tuneleo electrónico a través de la monocapa y la dinámica del binomio proteína-solvente.

Tabla 2: *Valores de γ obtenidos para Azurina bajo dos condiciones diferentes de hidrofobicidad de la monocapa, y para Tt-Cu_A. En paréntesis se indica el error estándar.*

γ	Azurina	Azurina	*Tt*-Cu_A
SAMs con n	SAM-CH_3	SAM OH-CH_3	SAM OH-CH_3
3	0,64 (±0,03)	0,62 (±0,06)	0,29 (±0,01)
5	0,6 (±0,1)	0,59 (±0,06)	0,28 (±0,03)
7	0,14 (±0,05)	0,45 (±0,06)	0,22 (±0,02)
10	0,01 (±0,04)	0,16 (±0,03)	0,08 (±0,02)
15	0	0	0

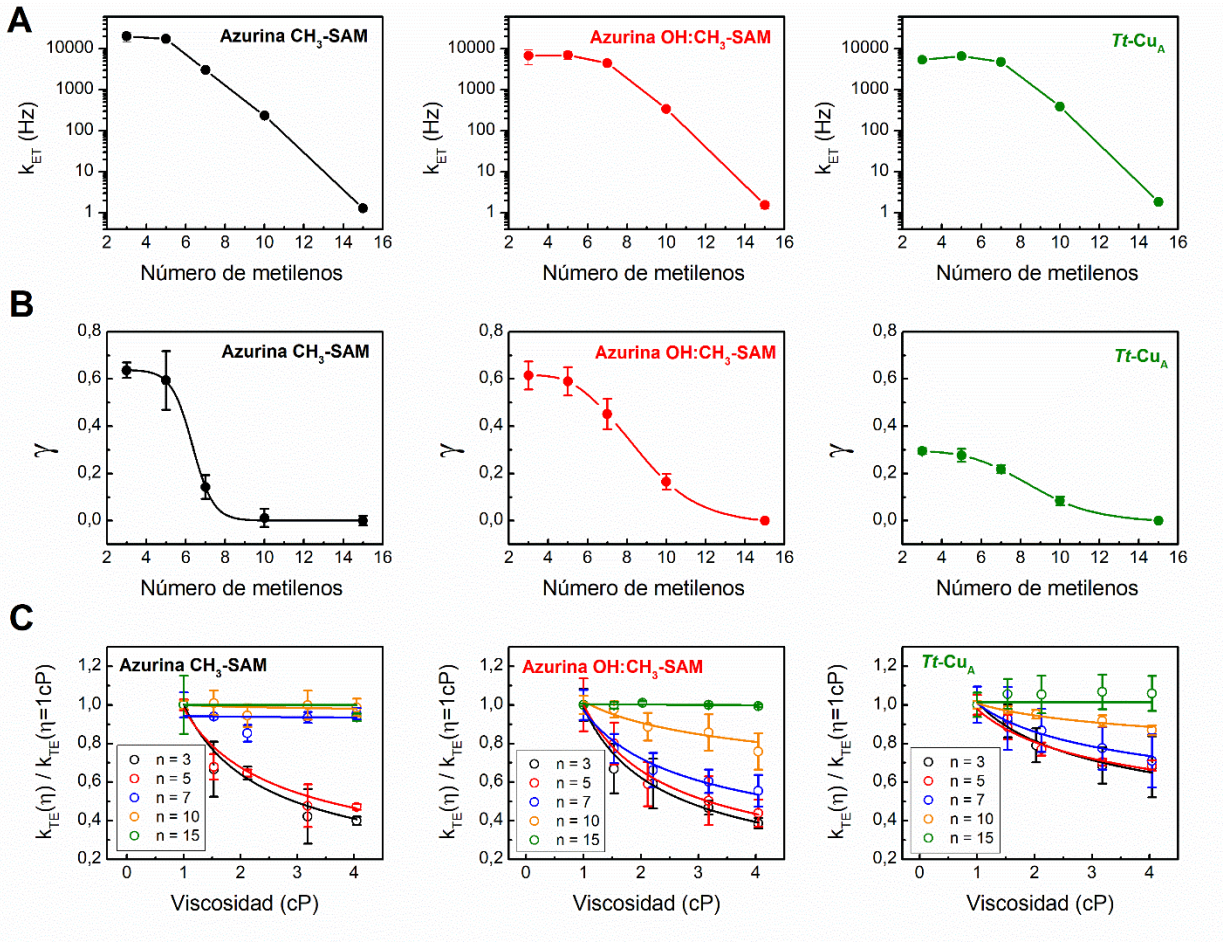


Figura 24: A y **B**. *Valores de* k^o_{TE} *y del factor gama (γ) en función del número de metilenos para Azurina y Tt-Cu*$_A$. ***C****. Valores de* k^o_{TE} *en función de la viscosidad normalizadas por el valor de* k^o_{TE} *a viscosidad 1cP para todos los largos de monocapa. En el caso de Azurina se evaluaron dos monocopas con distinto grado de hidrofobicidad. En A y B las curvas son para guiar el ojo, en C las curvas representan un ajuste de los datos experimentales a la siguiente ecuación* $k^o_{TE}(\eta) = k^o_{TE(\eta=1cP)} \cdot (\eta/cP)^{-\gamma}$.

Se realizaron experimentos control sobre el tipo de agente viscosante empleado. Las medidas hasta este punto se realizaron empleando sacarosa como agente viscosante. En la Figura 25-A se presenten medidas empleando sacarosa y PEG-4000 como agentes viscosantes, sobre monocapas de n = 5. Se obtuvieron resultados idénticos dentro del error experimental para ambas proteínas, Tabla 3. Dado que estas dos moléculas difieren en sus propiedades más relevantes para la TE este experimento control permite descartar efectos específicos sobre las proteínas. En la Figura 26 se presentan algunas propiedades físicas relevantes para ambas. Una de las principales diferencias se refiere a las constantes dieléctricas. Ambos disminuyen la constante dieléctrica estática, ε_s, e incrementan la constante dieléctrica óptica, ε_{op}, de la solución. Y como se comentó

en el Capítulo 1 sección 1.3.1, las constantes dieléctricas estáticas y dinámicas modifican la componente externa de la energía de reorganización, λ^{ext}, a través del factor de Pekar, $\varepsilon_{op}^{-1} - \varepsilon_s^{-1}$. Una disminución del factor de Pekar, ver Figura 26-C, en términos de la teoría clásica de Marcus implicaría una disminución de la energía de reorganización lo cual llevaría a un incremento de la k_{TE}^{o}. Los resultados presentados aquí indican que este efecto acelerador de la reacción de TE se ve sobrecompensado por el efecto ralentizador del incremento de la viscosidad, llevando a una tendencia hiperbólica decreciente de la k_{TE}^{o}. Experimentos con rangos extendidos de viscosidad empelando PEG-4000 indican que esta tendencia es válida incluso en viscosidades elevadas del orden de 53,4 cP, comparables con viscosidades estimadas para el interior mitocondrial en condiciones celulares saludables.[103–105]

Tabla 3: *Valores de γ obtenidos para Azurina y Tt-Cu$_A$, en experimentos control con sacarosa y PEG-4000, y en rango de viscosidad extendido, para monocapas cortas (n = 5)*

	γ			
Proteína	Azurina		*Tt*-Cu$_A$	
Agente viscosante	Sacarosa	PEG-4000	Sacarosa	PEG-4000
Rango normal	0,62 (±0,06)	0,56 (±0,09)	0,29 (±0,01)	0,31 (±0,03)
Rango extendido	---	0,51 (±0,02)	---	0,28 (±0,02)

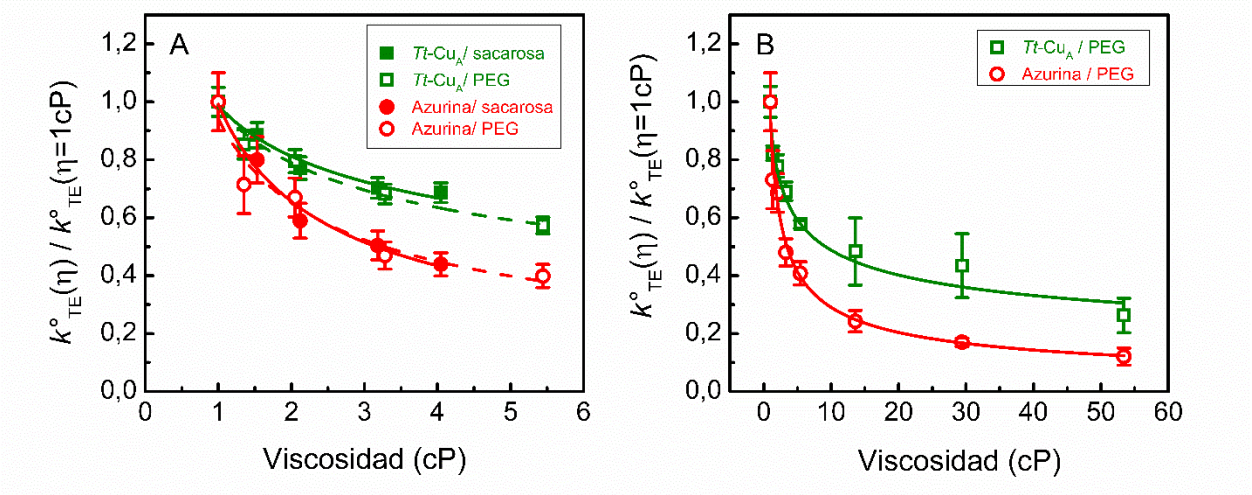


Figura 25: A. *Valores de k_{TE}^{o} normalizadas medidas empleando monocapas de n = 5, en función de la viscosidad utilizando dos agentes viscosantes diferentes, sacarosa y PEG-4000.* ***B****. Valores de k_{TE}^{o} normalizadas en función dela viscosidad para un rango extendido empleando PEG-4000 como agente viscosante, alcanzando viscosidades de hasta 53,4 cP, en monocapas con n = 5. Las curvas representan un ajuste de los datos experimentales a la siguiente ecuación $k_{TE}^{o}(\eta) = k_{TE,\eta=1cP}^{o}.(\eta/cP)^{-\gamma}$.*

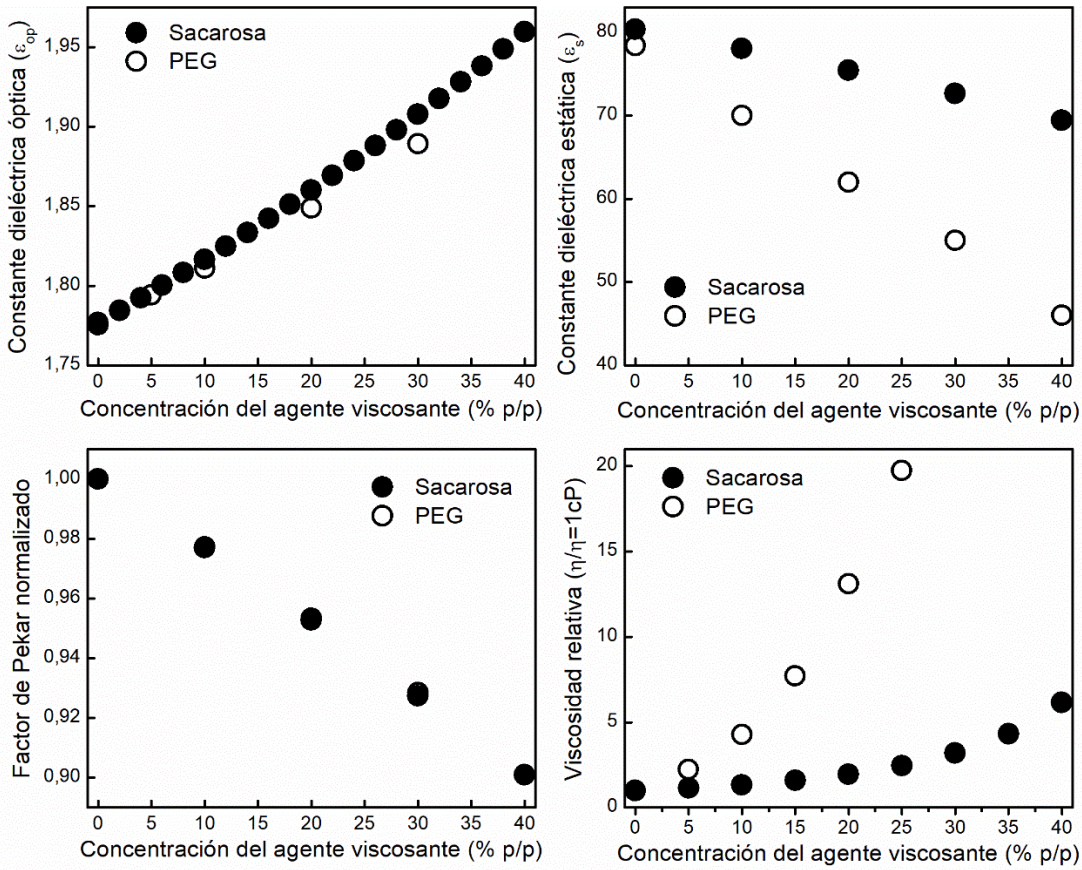


Figura 26: Variación de las constantes ópticas y estáticas, el factor de Pekar, $\varepsilon_{op}^{-1} - \varepsilon_s^{-1}$, *y la viscosidad relativa a la del agua pura en función de la concentración de sacarosa y PEG en agua.*

Los experimentos con azurina en monocapas de un componente terminadas en grupos metilo, y mixtas, con grupos metilo y oxhidrilo, arrojaron ciertas diferencias. Si bien ambas presentan un incremento sigmoideo del factor γ, y el valor máximo en la meseta es el mismo dentro del error experimental, hay diferencias en las monocapas intermedias. El comienzo de la sigmoidea parece ser más tardío, dado que comienza a manifestarse en n = 7 para la monocapa hidrofóbica, cuando ya es evidente en n = 10 para la monocapa mixta. Estas diferencias son difíciles de explicar, pero ciertamente se pueden pensar dos fuentes moleculares para estas diferencias, que radican principalmente en el acoplamiento electrónico y/o la fuerza de interacción entre la superficie proteica y la superficie de la monocapa. Diferencias en el acoplamiento electrónico se vuelven evidentes dado que el valor que alcanza la k_{TE}^{o} en monocapa hidrofóbica es el doble que en la monocapa mixta, y esto es claro especialmente a cortas distancias, incluso cuando en ambas condiciones el valor de γ alcanza su valor máximo. Además, la curva de k_{TE}^{o} parece entrar en la meseta más tarde en la monocapa hidrofóbica, la k_{TE}^{o} para n = 7 se desvía muy poco respecto de la tendencia lineal predicha por el régimen no adiabático, lo cual concuerda con el comportamiento del parámetro γ. Por otra parte, se ha reportado que la fuerza de interacción entre la proteína y la superficie de la monocapa estaría vinculada con el grado de hidrofobicidad

de estas, lo que a su vez correlaciona con el incremento de la energía de activación de la TE.[106] Hacia el final de este capítulo se retomará la influencia de la hidrofobicidad sobre los parámetros de TE. El hecho de que el valor de γ máximo sea el mismo en ambas condiciones sugiere un origen común del mismo, ya sea propio del sitio metálico, de la matriz proteica o combinación de ambas.

Un resultado sumamente interesante que se desprende de esta serie de experimentos es la diferencia en el valor de γ máximo para los sitios de T1 y Cu_A, siendo 0,6 y de 0,3 respectivamente. Recordemos que el factor gama en la hipótesis de Waldeck es una medida del grado de control friccional, es decir, de la influencia de los tiempos de relajación de la proteína y el solvente sobre la velocidad de la TE. En este sentido, para proteínas, da cuenta de la distribución de tiempos de relajación extra aportados por la componente proteica, que no son contemplados en el modelo de solvente de tipo Debye empleados en la teoría de TE adiabática. De modo que esta diferencia en el valor de γ máximo indica un grado de acoplamiento proteína-solvente diferencial, que podría tener consecuencias relevantes en sus funciones *in vivo*. Aun así, con los resultados presentados hasta este momento no se puede discriminar si tal diferencia se origina en las diferencias intrínsecas de ambos sitios metálicos o de las matrices proteicas en las que se encuentran inmersos, o de una combinación de ambas componentes. Si bien ambas proteínas presentan un plegado de tipo cupredoxina y, por lo tanto, comparten una arquitectura global similar, un β-sandwich, existen muchas diferencias en todos los niveles estructurales. En este sentido el conjunto de quimeras con sitios de Cu_A y T1 exógenos introducidos en una misma matriz, la de *Tt*-Cu_A, cobran mucha importancia para dar una respuesta a esta cuestión.

La posibilidad de testear el comportamiento de sistemas quiméricos como los descritos en los capítulos 3y 4 ofrece una oportunidad única para identificar los efectos que el *crowding* molecular pueda tener sobre las diferentes coordenadas de la reacción relevantes para la TE a distintos niveles de jerarquía de la arquitectura y dinámica proteica. Por ello, se extendió el análisis anterior al conjunto de quimeras (cinco de T1, y dos de Cu_A). Dado que el valor máximo de γ se obtuvo para monocapas con n = 3 y 5, en la meseta, se realizaron experimentos cinéticos en función de la viscosidad para obtener los factores γ en las quimeras empleando SAMs con n = 5. En las Figuras 27 y 28 se presentan los perfiles de k_{TE}^{o} en función de la viscosidad con sus respectivos ajustes a la ecuación 11, y curvas de Laviron representativas, respectivamente.

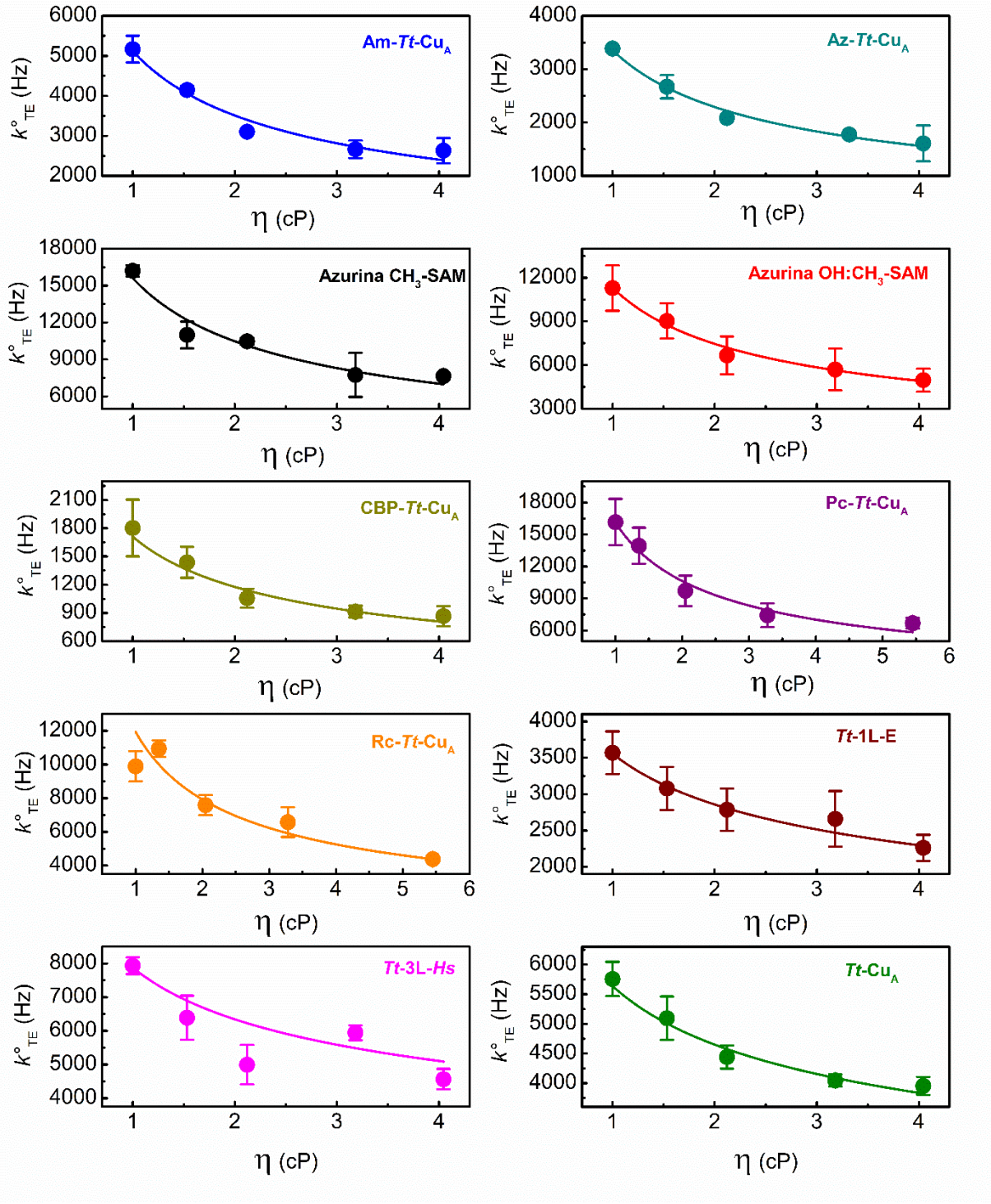


Figura 27: *Valores de* k^o_{TE} *en función de la viscosidad del medio para todo el conjunto de proteínas evaluadas. Los experimentos se realizaron empleando monocapas con n = 5 a 25°C en buffer acético/acetato 10 mM (pH 4,6 y 250 mM* KNO_3*) empleando concentraciones variables de sacarosa o PEG-4000 para modular la viscosidad. Las curvas representan un ajuste de los datos experimentales a la siguiente ecuación* $k^o_{TE}(\eta) = k^o_{TE(\eta=1cP)} \cdot (\eta/cP)^{-\gamma}$.

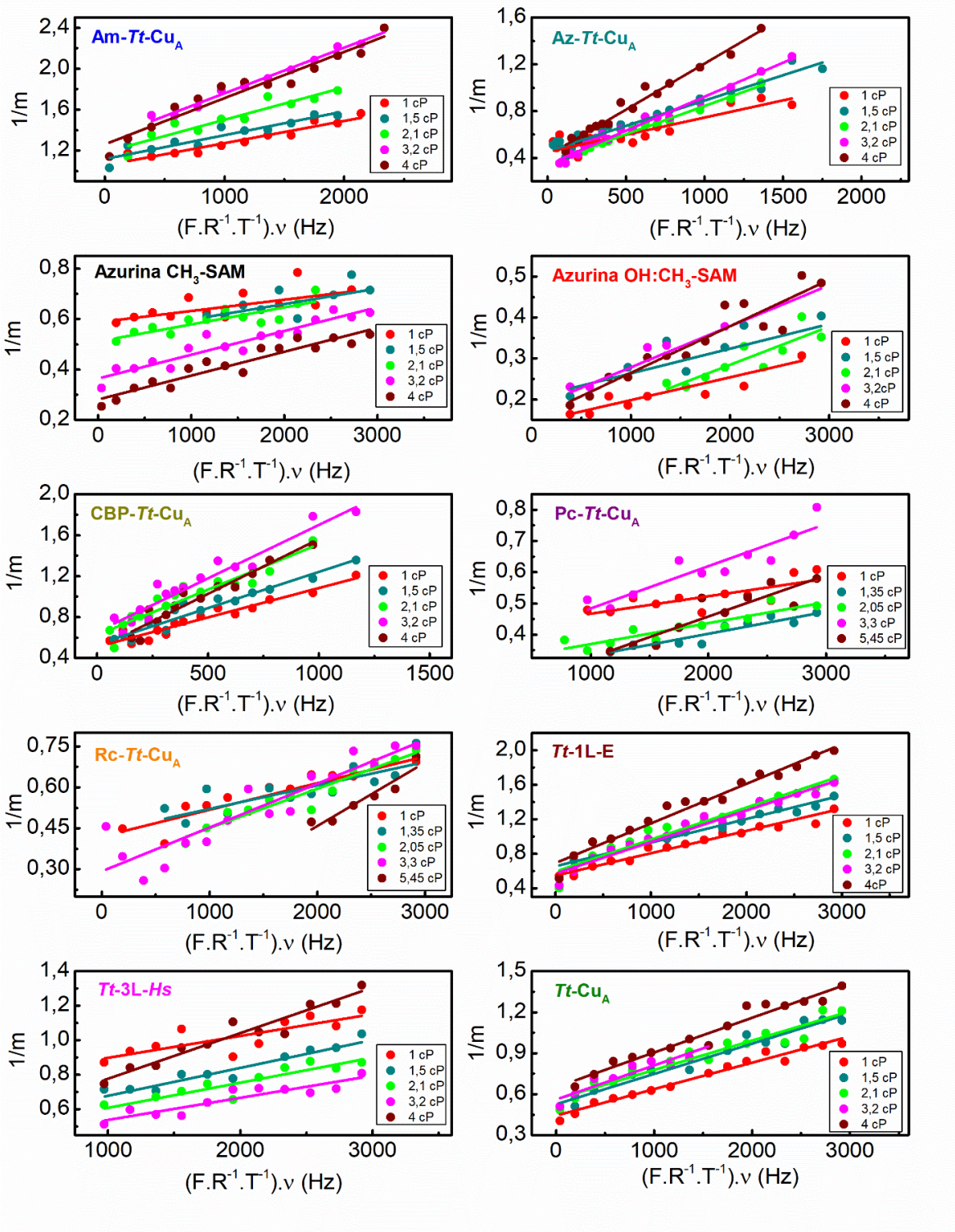


Figura 28: *Curvas de trabajo de Laviron representativas para todo el conjunto de proteínas estudiadas, obtenidas en monocapas n = 5, a viscosidad variable. El código de colores indica viscosidad creciente.*

Los resultados de estos experimentos permitieron responder el interrogante planteado unas líneas más arriba, los valores de γ, obtenidos para todas las quimeras que presentan un sitio mononuclear de T1 se encuentran en el rango de 0,53 a 0,60 similares a aquellos obtenidos para Azurina. Por otro lado, las quimeras de Cu_A, presentan valores idénticos al de *Tt*-Cu_A dentro del error experimental, Tabla 4 y Figura 29. Esto indica que el parámetro γ es sitio específico, y es independiente de la matriz proteica en la que se encuentran, al menos mientras esta sea una cupredoxina como las testeadas en este trabajo. Esto permite redefinir el parámetros γ como una medida del acoplamiento dinámico entre el sitio metálico y el entorno circundante, conformado por el binomio proteína-solvente. Es decir, es una medida de la dinámica local, donde ahora la matriz proteica pasaría a formar parte del medio. Esta observación es consistente con la rigidez del diamante de Cu_2S_2 en los sitios de Cu_A, que incluye un enlace covalente entre ambos átomos de cobre, lo cual lo torna menos deformable que los sitios de T1, y por ello su valor de gama resulta menor, siendo menos sensible a cambios en la viscosidad del medio.

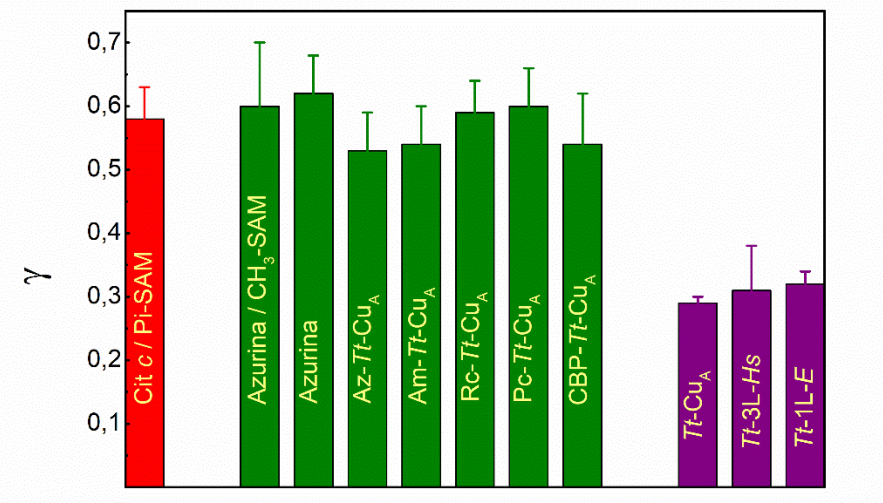


Figura 29: *Valores del parámetro gama para el conjunto completo de proteínas estudiadas. Se incluye el valor bibliográfico para citocromo c coordinado sobre monocapas terminadas en el grupo piridina (rojo).*[61] *En verde se presentan proteínas con sitios T1, y en violeta aquellas con sitios Cu_A. Los valores de k_{TE}^{o} fueron obtenidos empleando monocapas con n = 5 y sacarosa o PEG-4000 como agente viscosante.*

Tabla 4: *Valores de γ obtenidos para Azurina, Tt-Cu_A, y siete quimeras con sitios T1 y Cu_A inmersos en la matriz de Tt-Cu_A.*

Proteína	γ medido para SAMs n = 5
Azurina SAM OH-CH_3	0,62 (±0,06)
Azurina SAM-CH_3	0,6 (±0,1)
Tt-Cu_A	0,29 (±0,01)
Am-*Tt*-Cu_A	0,54 (±0,06)
Az-*Tt*-Cu_A	0,53 (±0,06)
CBP-*Tt*-Cu_A	0,54 (±0,08)
Pc-*Tt*-Cu_A	0,60 (±0,06)
Rc-*Tt*-Cu_A	0,59 (±0,05)
Tt-3L-*Hs*	0,31 (±0,07)
Tt-1L-E	0,32 (±0,02)

Esto plantea otro interrogante importante en este contexto sobre cuál sería el rol de la matriz proteica *per se*, dado que hasta el momento en las teorías que se manejan fueron pensados de manera conjunta. Para intentar profundizar en este aspecto se analiza en la siguiente sección el efecto del cambio de régimen de TE sobre la energía de activación experimental.

Es importante señalar que ni las k_{TE}^{o} ni los valores de energías de activación aparente, $\Delta G_{Ap}^{\#}$, comentados en la siguiente sección muestran dependencia alguna con la concentración superficial de proteína (Γ). Esto se testeó empleando azurina, la proteína que presentaba mayor grado de cobertura sobre el electrodo, de modo de poder descartar efectos de interacción lateral entre proteínas debido a la población molecular sobre el electrodo y verificar que los efectos son atribuibles a la viscosidad debida al agente de *crowding* externo, PEG o sacarosa. Como se observa en la Figura 30 ninguno de los dos parámetros presenta correlación con la concentración superficial en ninguna de las condiciones evaluadas, permitiendo concluir que las tendencias analizadas previamente corresponden a efectos de la viscosidad externa controlada mediante los agentes viscosantes. Por otro lado, también se verifico mediante espectroscopia Raman intensificada por superficies (SERs) que la adsorción de proteína no altera la estructura de la monocapa con n = 5, que es las más empleadas en este trabajo para determinar los valores del factor gama. La técnica de SERs permite testear el orden de la monocapa a nivel del enlace C-S del tiol de la zona profunda de la monocapa, cerca del enlace con la superficie del electrodo, registrando cambios en la intensidad de las bandas características de las conformaciones *gauche* y *trans* que involucran este enlace, centradas en 634 y 702 cm^{-1}, respectivamente.[107] La intensidad de estas bandas no cambia con la adsorción de proteína, Figura 31, indicando que no hay cambios en la estructura de la monocapa a nivel del enlace C-S.

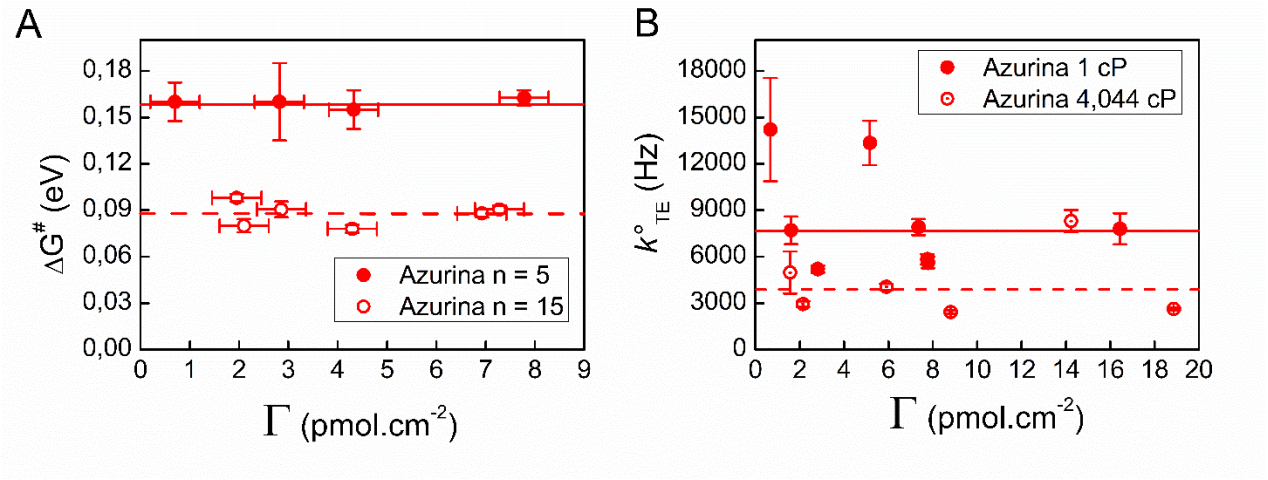


Figura 30: A. *Valores de energía de activación de la TE para monocapas con n de 5 y 15 en función de la concentración superficial (Γ) a viscosidad de 1cP, buffer acuoso sin agente viscosante. B. valores de* k_{TE}^{o} *para monocapas de n = 5 en función de la concentración superficial (Γ) para dos valores de viscosidad, 1 y 4,044 cP. Todas las medidas se realizaron empelando monocapas mixtas (3:2 OH-CH₃)*

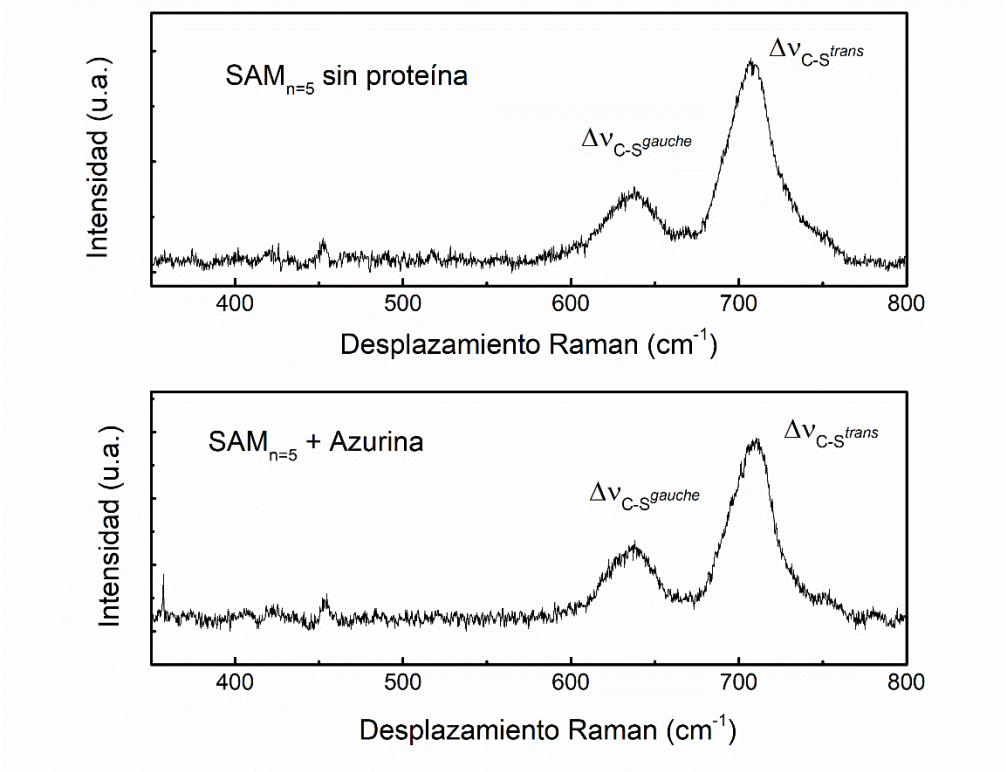


Figura 31: *Espectros SERs del enlace C-S de la monocapas en sus dos conformaciones, gauche (634 cm⁻¹) y trans (702cm⁻¹) antes y después de incubar el electrodo recubierto en solución proteica. No se observa un cambio apreciable en las intensidades de ambas bandas.*

5.4- Obtención de $\Delta G_{TE}^{\#}$ en función del acoplamiento electrónico proteína-electrodo.

La velocidad de la reacción de TE está dada por el producto de dos términos: (1) el factor de Franck-Condon, que da cuenta de la probabilidad de alcanzar la degeneración energética del dador y aceptor de electrones mediante fluctuaciones térmicas, y (2) el acoplamiento electrónico, que decae exponencialmente con la distancia y representa la probabilidad de tuneleo electrónico entre los estados degenerados. En principio ambos términos podrían ser susceptibles al *crowding* molecular a través del incremento de la viscosidad. Según Matyushov y colaboradores el primer término es sensible a la relación entre los tiempos de relajación de reactivos y productos (τ_{rel}) y el tiempo de reacción (τ_{reac}). La teoría de Marcus asume que $\tau_{rel} \ll \tau_{reac}$ lo que podría no ser correcto en medios de relajación lenta. En esos casos el subespacio conformacional (espacio de fases solvente-proteína) al que tendría acceso el sistema a través de exploración térmica se vería reducido en la escala temporal de la reacción de TE (no ergodicidad), ver sección 5.1.3. Esto podría resultar en una disminución de la energía de reorganización respecto de aquella contemplada en la teoría de Marcus, que asume que el sistema se encuentra en equilibrio, siendo capaz el explorar todo el espacio de fases.[5,40,43,86,87] Bajo ese escenario, se espera que la k_{TE}^{o} aumente con la viscosidad, como resultado del descenso de la energía de activación de la reacción. Los resultados experimentales presentados en esta tesis indican lo contrario, donde el sistema no alcanza el caso extremo donde $\tau_{rel} \gg \tau_{reac}$, sino que la reacción procede en un régimen intermedio donde la viscosidad afectaría la velocidad de TE a través del factor pre exponencial. Este régimen es el ya comentado régimen friccional, que puede ser descripto mediante la ecuación de Zusman, y subsecuente modificación de Waldeck y colaboradores empleando la relación empírica entre la k_{TE}^{o} y la viscosidad del medio, ver ecuación 14 en sección 5.1.2. Según esta ecuación la TE la energía de activación aparente, es decir, el valor obtenido experimentalmente, $\Delta G_{Ap}^{\#}$, contiene un primer término, $\Delta G_{TE}^{\#}$, que representa la energía de activación intrínseca de la TE ($\Delta G_{TE}^{\#} = {}^{\lambda}/_{4}$ donde λ es la energía de activación de la teoría de Marcus), y un segundo término, $\gamma \Delta G_{s}^{\#}$, que daría cuenta de la dinámica de relajación del medio, ecuación 36. De esta manera, la $\Delta G_{Ap}^{\#}$ resultaría, contrariamente al caso expuesto líneas arriba, mayor que aquella del régimen no adiabático. Más aún, su incremento sería proporcional, en cierta medida, al factor γ.

$$\Delta G_{Ap}^{\#} = \Delta G_{TE}^{\#} + \gamma \Delta G_{s}^{\#} \qquad \textbf{Ecuación-36}$$

Se obtuvieron los valores de energía de activación a partir de un ajuste de Arrhenius de los valores de k_{TE}^{o} en función de la temperatura para Azurina y *Tt*-Cu_A a distintos largos de monocapa, y se compararon con los valores de γ obtenidos previamente, Figura 32. Como puede observarse, existe una relación proporcional entre la energía de activación aparente y este factor. Ambos presentan una zona que se vuelve independiente de la distancia proteína-superficie del electrodo, alcanzando una meseta, ver Figura 24-B.

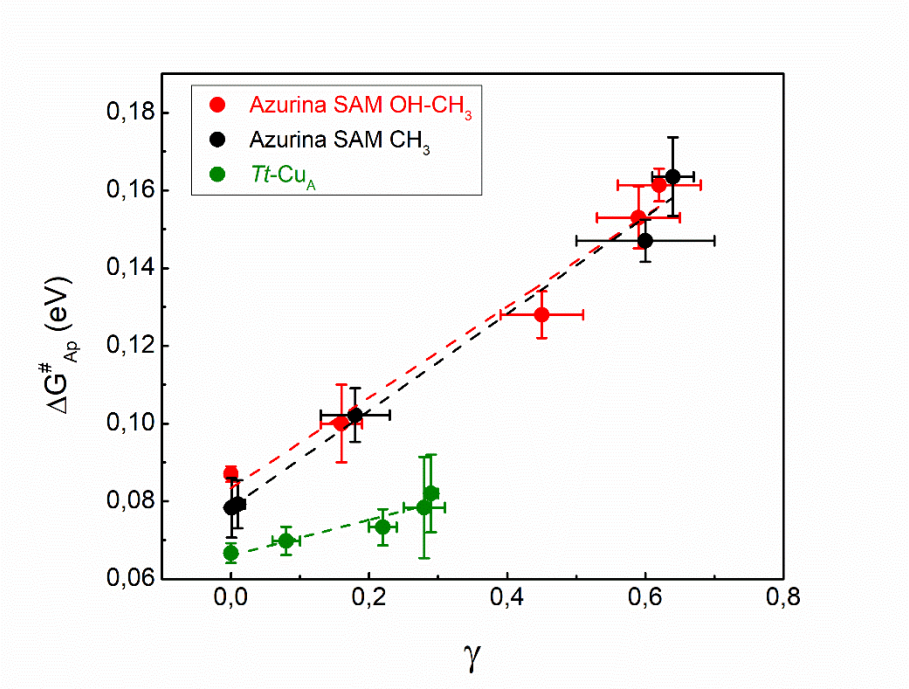


Figura 32: *Energías de activación en función del factor gama para todos los largos de monocapa. La línea punteada corresponde a un ajuste lineal de los datos. Los valores de las pendientes son 0,12 (±0,01) eV para Azurina en monocapa mixta, 0,125 (±0,008) eV para Azurina en monocapa hidrofóbica y 0,046 (±0,009) eV para Tt-Cu$_A$.*

Se decidió extender este análisis para el resto del conjunto de proteínas. En particular se obtuvieron energías de activación empleando monocapas con n = 15, donde el factor $\gamma = 0$ asegurando un régimen no adiabático, donde puede emplearse el modelo de TE de Marcus, y con n = 5, que corresponde a la zona de la meseta en los gráficos de k_{TE}^{o} y γ en función del largo de la monocapa, donde el valor de γ se vuelve máximo, Figura 24-B. En las Figuras 33 y 34 se presentan los gráficos de Arrhenius para n de 15 y 5, respectivamente. En la Tabla 5 se presentan los valores de $\Delta G^{\#}$ para ambos casos. Notar que en este capítulo los parámetros cinéticos se obtienen a pH 4,6, mientras que aquellos presentados en el Capítulo 3 para las quimeras de sitios T1 son a pH neutro. No se observan diferencias significativas para este parámetro con el pH.

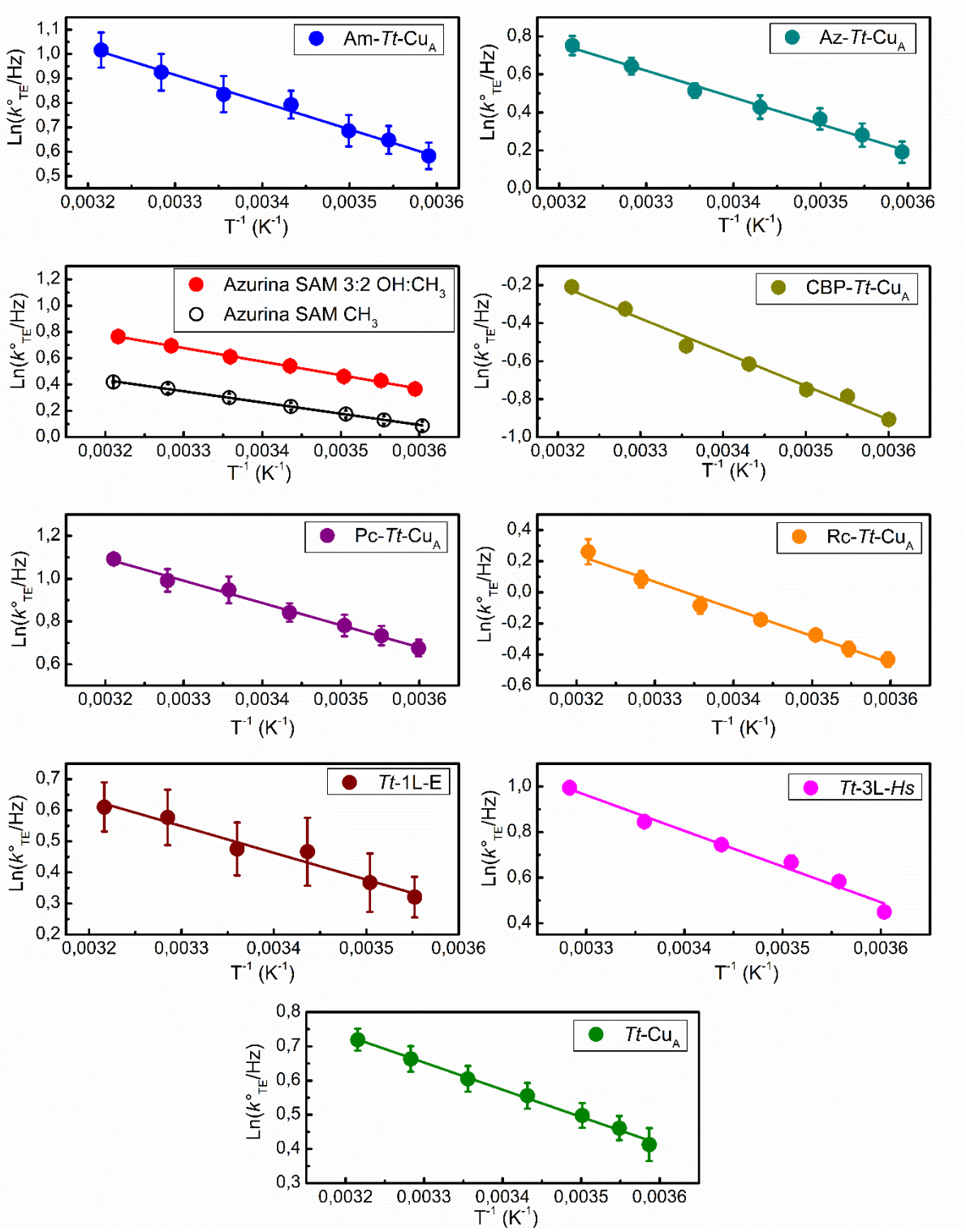


Figura 33: *Gráfico del logaritmo natural de la* k_{TE}^{o} *en función de la inversa de la temperatura, y sus respectivos ajustes de Arrhenius par SAMs con n = 15, buffer acético 10 mM pH 4,6, 250 mM* KNO_3.

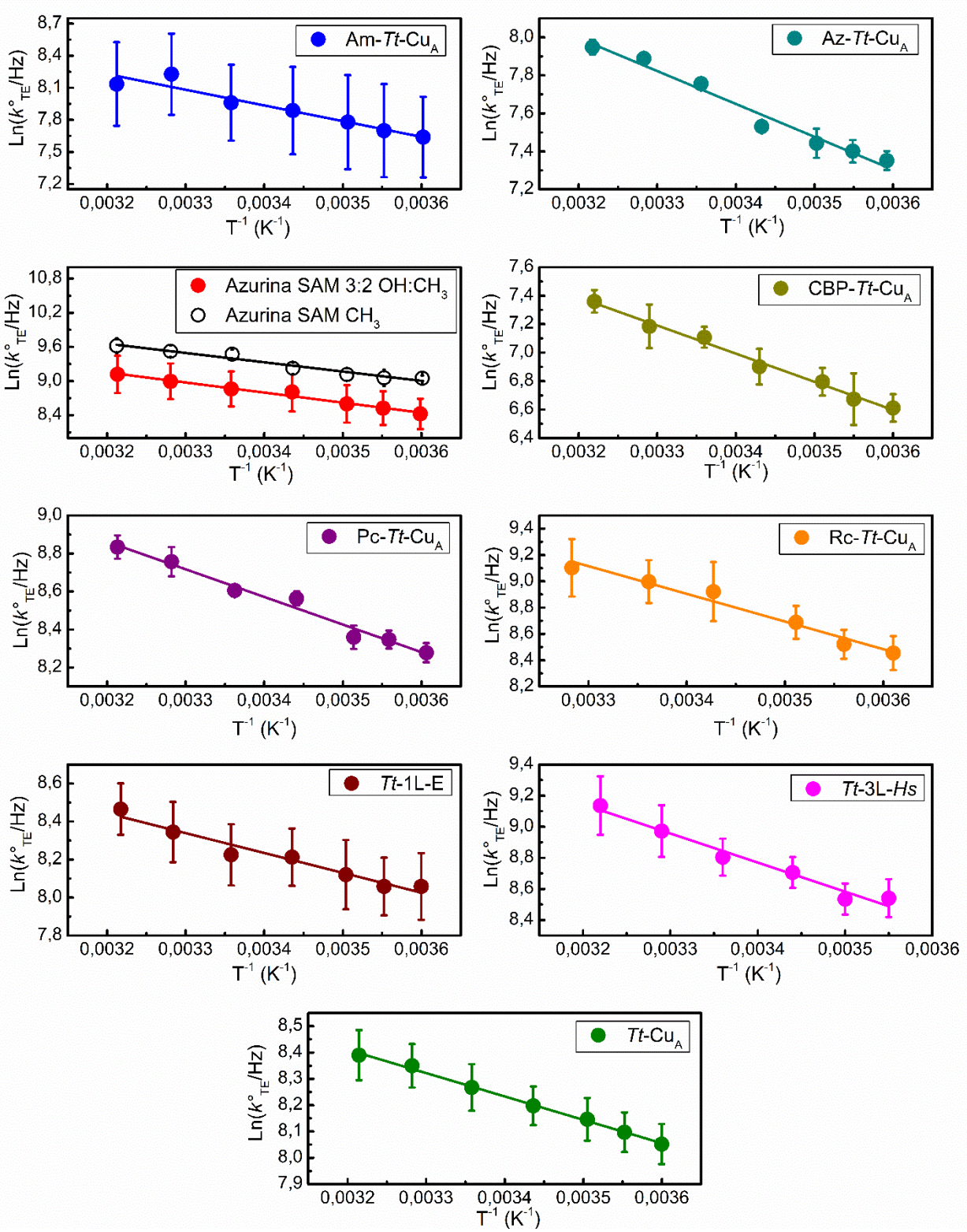


Figura 34: *Gráfico del logaritmo natural de la* k^{o}_{TE} *en función de la inversa de la temperatura, y sus respectivos ajustes de Arrhenius par SAMs con n = 5, buffer acético 10 mM pH 4,6, 250 mM* KNO_3.

Dado que para monocapas n = 15, el factor $\gamma = 0$, uno puede acceder directamente a la energía de activación de Marcus, es decir, $\Delta G_{Ap}^{\#} = \Delta G_{TE}^{\#}$. Mientras que para monocapas con n = 5, el factor $\gamma \neq 0$ de modo que el segundo término en la expresión de la energía de activación aparente no desparece, $\gamma \Delta G_s^{\#} \neq 0$. Sin embargo, se puede acceder al segundo término restando el valor de la energía de activación a monocapas largas del valor obtenido a monocapas cortas, $\Delta G_{Ap}^{\#} - \Delta G_{TE}^{\#} = \gamma \Delta G_s^{\#}$. Más aún, dado que se conoce el valor del factor γ en todos los casos, si se divide por este valor se obtiene directamente el componente $\Delta G_s^{\#}$, ver Tabla 5 y Figura 35. Sorprendentemente, el factor $\Delta G_s^{\#}$ parece ser especifico de la matriz proteica, contrariamente a lo observado con el factor gama comentado en la sección anterior. Todas aquellas proteínas que comparten la matriz proteica de *Tt*-Cu_A, ya sea que contengan un sitio de cobre de T1 o de Cu_A, experimentan un incremento en su energía de activación similar, con un valor promedio de 0,06 (±0,02) eV. Por otro lado, la Azurina que contiene un sitio T1, y por ende comparte el mismo valor de γ que otras proteínas estudiadas aquí, pero difiere en su matiz proteica de aquella de *Tt*-Cu_A, posee un valor de entre 0,11-0,12 eV. Estos valores coinciden dentro del error con aquellos obtenidos de la pendiente de la Figura 32.

Tabla 5: *Valores de todos los parámetros cinéticos, $\Delta G_{Ap}^{\#}$, γ, $\Delta G_{TE}^{\#}$ y $\Delta G_s^{\#}$ obtenidos para Azurina, Tt-Cu_A, y siete quimeras con sitios T1 y Cu_A inmersos en la matriz de Tt-Cu_A.*

Proteína	Parámetro cinético			
	$\Delta G_{Ap}^{\#}$ (eV)	$\Delta G_{TE}^{\#}$ (eV)	γ	$\Delta G_s^{\#}$ (eV)
Citocromo *c* SAM-piridina[#]	0,225	0,095	0,58	0,224
Azurina SAM OH-CH_3	0,153 (±0,008)	0,087 (±0,002)	0,62 (±0,06)	0,11 (±0,01)
Azurina SAM-CH_3	0,14 (±0,01)	0,071 (±0,009)	0,6 (±0,1)	0,12 (±0,02)
Azurina SAM-CH_3*	0,154	0,076	0,59	0,132
Tt-Cu_A	0,08 (±0,01)	0,067 (±0,003)	0,29 (±0,01)	0,05 (±0,01)
Am-*Tt*-Cu_A	0,12 (±0,01)	0,10 (±0,02)	0,54 (±0,06)	0,04 (±0,03)
Az-*Tt*-Cu_A	0,14 (±0,01)	0,120 (±0,005)	0,53 (±0,06)	0,04 (±0,02)
CBP-*Tt*-Cu_A	0,19 (±0,01)	0,155 (±0,008)	0,54 (±0,08)	0,05 (±0,02)
Pc-*Tt*-Cu_A	0,13 (±0,04)	0,09 (±0,02)	0,60 (±0,06)	0,08 (±0,06)
Rc-*Tt*-Cu_A	0,19 (±0,03)	0,15 (±0,03)	0,59 (±0,05)	0,08 (±0,05)
Tt-3L-*Hs*	0,15 (±0,01)	0,13 (±0,02)	0,31 (±0,07)	0,07 (±0,03)
Tt-1L-E	0,090 (±0,009)	0,074 (±0,007)	0,32 (±0,02)	0,05 (±0,02)

Extraído de la referencia [61] * Extraído de la referencia [47]

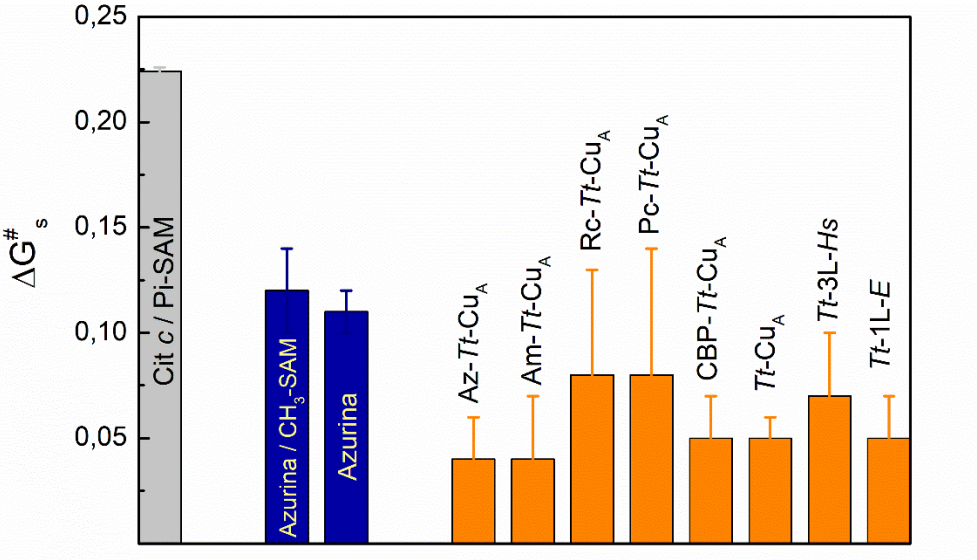


Figura 35: *Valores del parámetro $\Delta G_s^{\#}$ para el conjunto completo de proteínas estudiadas. Se incluye el valor bibliográfico para citocromo c coordinado sobre monocapas terminadas en el grupo piridina (gris). En azul se presentan los valores para Azurina medidas en diferentes condiciones, y en naranja todas aquellas proteínas con matiz de Tt-Cu_A, independientemente del sitio metálico que contengan (T1 o Cu_A).*

Estos resultados son sumamente interesantes ya que permiten responder el interrogante planteado en la sección anterior sobre la relevancia de la matriz proteica *per sé* sobre los parámetros de TE. Según la disección de las componentes de activación bajo el modelo propuesto por Waldeck, el exceso de energía de activación respecto al régimen no adiabático es proporcional tanto al factor γ, que en función de los datos presentados más arriba pueden entenderse como una medida del acoplamiento del centro metálico con el entorno (proteína-solvente), y el factor $\Delta G_s^{\#}$, que parece ser específico de la matriz proteica en la que se encuentra inmerso el centro metálico. Esto abre nuevos interrogantes de interés tanto biológico como tecnológico. Desde un punto de vista biológico, esta aparente jerarquización de la influencia de la arquitectura proteica sobre la barrera de activación del proceso permitiría la evolución independiente de ambas y adelanta una relación no trivial en las combinaciones sitio metálico-matriz proteica presentes en la naturaleza. Desde un punto de vista tecnológico esta característica permitiría la modulación fina de este parámetro simplemente eligiendo el par sitio metálico-matriz óptimo. Esto, por supuesto asumiendo que esta característica sea de alcance general y describa el funcionamiento de otras metaloproteínas. En ese sentido, se presentan los parámetros reportados en literatura para citocromo *c* coordinado a la monocapa a través de grupo piridina que indican que estas conclusiones pueden tener un alcance más amplio y excede a la familia de metaloproteínas estudiadas en este trabajo de tesis, las cupredoxinas. No obstante, la interpretación microscópica de ciertas contribuciones aún requiere mucho más trabajo teórico como experimental. Por

ejemplo, a pesar de que ambas matrices proteicas, la de azurina y la de *Tt*-Cu_A, se caracterizan por una elevada rigidez, lo que garantizaría una TE eficiente en el contexto de la teoría de Marcus, el menor valor de temperatura de desnaturalización y estudios de movilidad de cadena polipeptídica por RMN[108–110] indican que la matriz de azurina es menos rígida que aquella de *Tt*-Cu_A. Más aún, estudios en citocromo *c* indican que esta proteína sería aún más flexible que las cupredoxinas. Claramente existe una correlación entre la flexibilidad de la matriz con el incremento del factor $\Delta G_S^{\#}$ que no resulta trivial y requiere atención.

Debe llamarse la atención que, si bien el modelo de Waldeck permite una primera aproximación al problema, el modelo es aproximado y aún se requiere profundizar en este tipo de investigaciones de modo de generar un conjunto de datos lo suficientemente robusto como para desarrollar una teoría de TE que prediga naturalmente estas contribuciones dinámicas a las barreras energéticas de la TE. En la siguiente sección se analizará una teoría de TE heterogénea proteica reciente que parece atender este punto de manera directa, presentando un modelo que explica, al menos en cierta medida, de manera natural los desvíos de las observaciones experimentales respecto de la teoría de Marcus.

5.5- Validación del modelo de TE friccional de Matyushov. Casos de estudio: Azurina y *Tt*-Cu_A

De manera contemporánea con este trabajo de tesis Matyushov publicó una nueva teoría para la TE heterogénea[90] específica para proteínas, pero *a priori* potencialmente extensible a otras macromoléculas (materia blanda), que trata específicamente sobre el posible origen de los desvíos experimentales respecto a la teoría de Marcus comentados a lo largo de este capítulo. Brevemente, incorpora la dinámica proteica considerando que esta puede ser descripta a través de dos nuevos parámetros, que surgen de simplificar el problema siguiendo dos supuestos, el primero consiste en asumir que los diferentes movimientos proteicos pueden, en una primera aproximación, ser condensados en una única constante de fuerza $\kappa = k_B T/\delta R^2$, y a su vez, considerar que el desplazamiento de la proteína sobre la superficie depende de un único tiempo de relajación, $D_R = (\beta^2 \tau_R)^{-1}$. Tal como se comentó en la sección 5.1.3 de la introducción de este capítulo, este modelo propone una nueva definición para el factor de entrecruzamiento "*g*" que incorpora la influencia de la dinámica proteica redefiniendo el tiempo de relajación característico del proceso como un tiempo de relajación efectivo (τ_{ef}), que depende no solo el tiempo de relajación del corrimiento de Stokes, τ_x, como en teorías previas sino que también incorpora explícitamente un tiempo de relajación difusional de la proteína sobre la superficie, τ_R. A su vez, el nuevo *g* depende exponencialmente de la varianza del desplazamiento proteico, δR^2. Por otro lado, asume que el acoplamiento entre proteína y electrodo no es un valor fijo, sino que estaría definido por la dinámica proteica que acerca y aleja el centro redox activo de la superficie según la constante de fuerza que condensa la dinámica proteica, $\kappa = k_B T/\delta R^2$, alterando este parámetro, y debiéndose entonces, según esta propuesta, considerar un valor promedio del mismo controlado

por la magnitud de δR^2. De este modo, logró reproducir el comportamiento bifásico de la k_{TE}^o con la distancia para citocromo *c* coordinado sobre monocapas terminadas en grupos piridina y predice un incremento de la energía de activación del proceso de TE bajo este régimen.[90] Sin embargo, no explica de manera directa la dependencia de la k_{TE}^o con la viscosidad del medio. En esta sección se aplicará este modelo a los datos electroquímicos de las proteínas Azurina y *Tt*-Cu_A y se mostrará que esta nueva teoría permite entender la dependencia con la viscosidad aún cuando no lo explica la formulación de Matyurshov, otorgando una expresión analítica para el factor γ máximo observado en la zona de la meseta, y permitirá recuperar una expresión en función de la viscosidad en términos de este nuevo modelo que contendrá la misma información que la ecuación empírica de k_{TE}^o en función de la viscosidad, $k_{TE}^o(\eta) = k_{TE(\eta_o)}^o . \eta^{-\gamma}$.

5.5.1- Dependencia con la distancia y tiempos de relajación efectivos

Empleando una combinación de las ecuaciones 3, 15, 23 y 24 se obtiene la ecuación 37 donde los únicos dos parámetros ajustables son τ_{ef} y Δ_o^θ, donde $\Delta_o^\theta = \Delta_o \, exp\left(1/2 \, \beta^2 \langle \delta R^2 \rangle\right)$. De modo que a partir de los gráficos de k_{TE}^o en función de la distancia se pueden obtener estos dos parámetros en el marco de la teoría de Matyushov.

$$k_{TE}^o = \left(\frac{\Delta_o^\theta \, exp\left(-\beta(R + R_o)\right)/\hbar}{1 + \tau_{ef} \; \Delta_o^\theta \, exp\left(-\beta(R + R_o)\right)/\hbar} \right) erfc\left(\frac{\lambda}{\sqrt{4\lambda k_B T}} \right) \qquad \textbf{Ecuación-37}$$

Para poder utilizar esta ecuación se deben emplear la distancia en unidades de Å, de modo que la distancia controlada por el largo de la monocapa fue estimada según la siguiente ecuación $R/\text{Å} = 1{,}9 + 1{,}12 \, n$, donde n indica el número de metilenos.[97] Por otra parte, se estimó como 4 enlaces la distancia en ambas estructuras proteicas, Azurina y *Tt*-Cu_A, empleándose como distancia mínima entre dador (sitio metálico) y aceptor (superficie del electrodo) como R_o= 4 Å.[46] El segundo factor de la ecuación 37 es una constante dado que todos los valores de k_{TE}^o fueron obtenidos a una temperatura constante de 298 K. El valor de la energía de reorganización que se empleará para determinar el valor de este segundo término fue obtenido a partir de un ajuste de la ecuación de Marcus empleando el software comercial JellyFit®, empleando la separación de picos voltamétricos a 298 K en monocapas largas, con n = 15, Figura 36. En la Figura 37 se presentan los ajustes de la ecuación 37 y en la Tabla 6 todos los parámetros de esta teoría calculados para ambas proteínas en dos condiciones de hidrofobicidad de la superficie de la monocapa. En esta sección, por una cuestión de completitud se extendió el análisis de *Tt*-Cu_A sobre monocapas totalmente hidrofóbicas terminadas en grupos metilo.

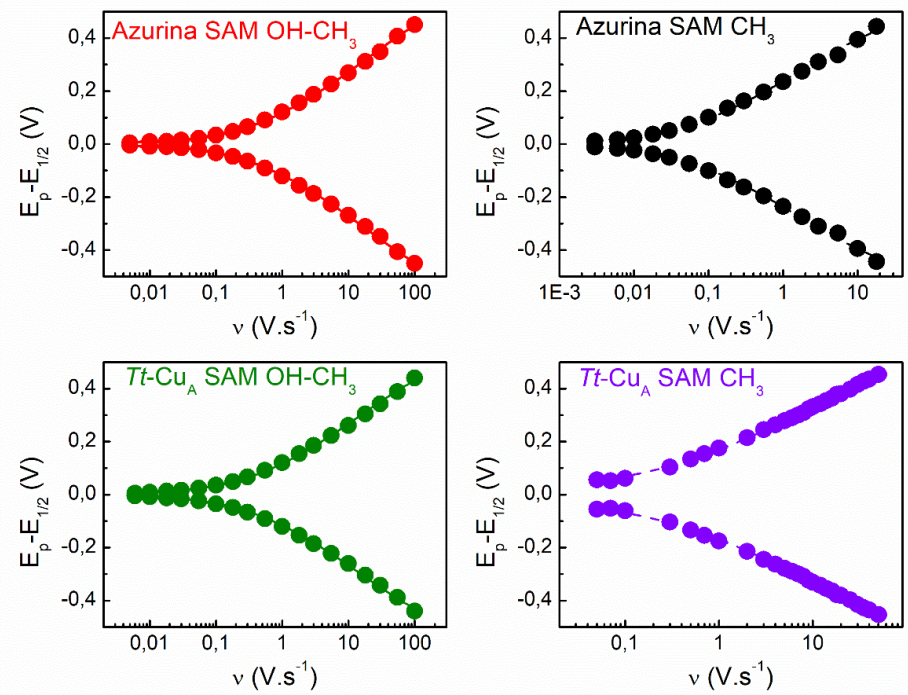


Figura 36: *Gráficos de trompetas, potencial de pico (E_p) anódico y catódico en función de la velocidad de barrido, para Azurina y Tt-Cu_A en ambas monocapas empleadas. Las líneas punteadas corresponden a un ajuste de Marcus empleando el software JellyFit®.*

Tabla 6: *Valores de los parámetros de la teoría de TE de Matyushov obtenidos a partir de la dependencia de* k_{TE}^{o} *con la distancia.*

Proteína Parámetro cinético	Proteína y condiciones de medida			
	Azurina		*Tt*-Cu_A	
	SAM OH-CH_3	SAM-CH_3	SAM OH-CH_3	SAM-CH_3
$\beta(\text{Å}^{-1})$	0,96	0,93	0,95	0,95
$\lambda\ (eV)$	0,25 (±0,03)	0,21 (±0,02)	0,21 (±0,02)	0,22 (±0,02)
τ_{ef} (s)	3,5 x 10^{-6} (±0,2 x 10^{-6})	2,5 x 10^{-6} (±0,7 x 10^{-6})	7,2 x 10^{-6} (±0,1 x 10^{-6})	4,9 x 10^{-6} (±0,6 x 10^{-6})
Δ_o^{θ} (eV)	3,4 x 10^{-4} (±0,1 x 10^{-4})	8,2 x 10^{-5} (±0,2 x 10^{-5})	1,91 x 10^{-4} (±0,02 x 10^{-4})	2,4 x 10^{-4} (±0,2 x 10^{-4})
τ_R (s)	3,6 x 10^{-10} (±0,1 x 10^{-10})	3,9 x 10^{-10} (±0,1x 10^{-10})	1,1 x 10^{-9} (±0,1x 10^{-10})	1,1 x 10^{-9} (±0,1x 10^{-10})
$\langle \delta R^2 \rangle\ (\text{Å}^2)$	10,2 (±0,1)	10,4 (±0,3)	10,6 (±0,4)	10,2 (±0,2)
$\kappa(eV\ \text{Å}^{-2})$	2,51 x 10^{-3} (±0,02 x 10^{-3})	2,48 x 10^{-3} (±0,08 x 10^{-3})	2,4 x 10^{-3} (±0,1 x 10^{-3})	2,51 x 10^{-3} (±0,06 x 10^{-3})

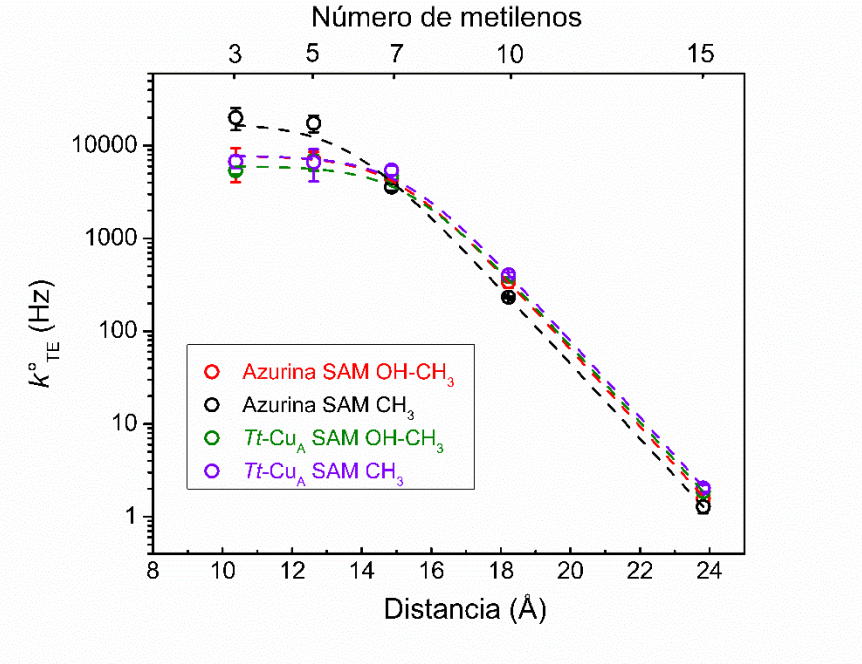


Figura 37: *Valores de* k^o_{TE} *en función de la distancia mostrando los ajustes de la ecuación 37 de la teoría de Matyushov.*

Se puede observar que la energía de reorganización de Azurina difiere en un 20% entre ambas condiciones de hidrofobicidad de la SAM, no obstante, dado que se trata de la misma proteína es improbable que la estructura del sitio metálico se vea fuertemente alterada por la interacción con la superficie de la monocapa. Lo más probable es que esa pequeña diferencia provenga de diferencias en la contribución externa, específicamente del solvente, λ^{ext}. Al adsorberse sobre la monocapa se desplazan moléculas de solvente de la región especifica de la superficie proteica que se encuentra en contacto con la monocapa. Dado que la hidrofilicidad de la superficie de la monocapa es diferente es probable que exista cierta diferencia en la orientación de la proteína, y dado que la topología de la proteína no es idéntica a lo largo de toda su superficie, la accesibilidad de las moléculas de solvente a bolsillos sobre la superficie proteica cercanos al sitio activo podría verse alterada. Más aún, existe una gran cantidad de evidencia diversa, tanto teórica como experimental, de que el comportamiento dinámico de las moléculas de solvente estaría fuertemente influenciado por la hidrofobicidad de la superficie proteica[8,111–122]. Estas pequeñas diferencias en la superficie proteica expuesta en zonas cercanas al centro de cobre podrían explicar esta pequeña diferencia observada en los valores de λ. En secciones anteriores se llamó la atención al hecho de que la entrada en la región independiente de la distancia de la k^o_{TE} para Azurina sobre monocapas hidrofóbicas era tardía, observándose que incluso a cortas distancias (n de 5 y 7) la tendencia se desviaba poco del comportamiento exponencial predicho para TE no adiabática, cuando por el contrario, en superficies mixtas el régimen ya se encontraba claramente sobre la meseta. Esto a su vez, se daba paralelamente al incremento de la energía de activación aparente y la dependencia de k^o_{TE} con la viscosidad tardíos, reflejando una entrada al

régimen friccional a distancias más cortas de proteína-electrodo que para el caso de monocapas mixtas, Figura 24-A y B. A partir del ajuste de la ecuación 37 se obtiene el valor del acoplamiento electrónico, Δ_o^θ, y tal como se sospechaba, este parámetro resulta sensible a la hidrofobicidad de la monocapa resultando cuatro veces menor en monocapas completamente hidrofóbicas. Esto es consistente con la propuesta de una orientación ligeramente diferente en ambas situaciones. Una inspección del supuesto sitio de unión indica que hay una amplia región hidrofóbica rodeando al Nε del residuo coordinante parcialmente expuesto a solvente histidina-117[123]. Es así como este residuo podría mediante puente de hidrogeno unirse a los grupos oxhidrilo de la monocapa proveyendo un camino electrónico más eficiente que no sería posible en monocapas hidrofóbicas. Por el contrario, el residuo equivalente en *Tt*-Cu_A no se encuentra expuesto a solvente, y se observa que el sitio de unión con su dador de electrones natural, el citocromo *c*, contiene una región hidrofóbica cercana al grupo hemo del dador y residuos fenilalanina o triptófano, según la especie, en el aceptor.[124,125] Estas diferencias estructurales sutiles permiten entender la diferencia en la susceptibilidad de los parámetros λ y Δ_o^θ de ambas proteínas.

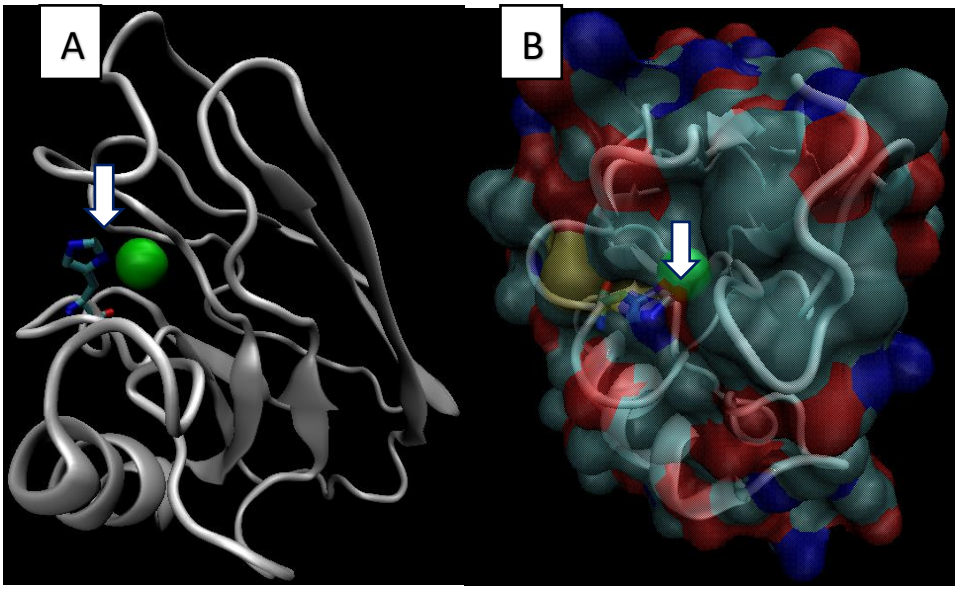


Figura 38: *Representación de la estructura cristalográfica de Azurina (PDB: 1AZU) donde el átomo de cobre se representa como una esfera verde. La matriz proteica se representa con un motivo de lazos según su estructura secundaria (**A**), o, además, con una representación de la superficie coloreada según el tipo de átomo presente en ella (**B**). En ambas representaciones se indica con una flecha blanca el residuo His117 expuesto a solvente.*

Por otro lado, los valores de τ_{ef} parecen ser sensibles tanto a la hidrofobicidad de la superficie de la monocapa como a la matriz proteica. En particular la relajación es aproximadamente un 30% más rápida en monocapas hidrofóbicas independientemente de la proteína en cuestión. Probablemente esto refleje las diferencias intrínsecas en el comportamiento dinámico de la monocapa que se traducen en una contribución diferencial. Por otra parte, los valores de *Tt*-Cu_A duplican aquellos obtenidos para Azurina, lo que sugiere diferencias dinámicas de ambas matrices proteicas. Es interesante notar que los coeficientes de difusión de ambas proteínas determinados por métodos electroquímicos difieren, siendo el de azurina (D = 3 x 10^{-7} cm^2 s^{-1}) mayor al de *Tt*-Cu_A (D = 1 x 10^{-7} cm^2 s^{-1}). Teniendo en cuenta que el $\tau_{ef} \propto \tau_R$ y que $\tau_R = (\beta^2 D_R)^{-1}$ estos resultados coinciden de manera cualitativa con la tendencia observada para el τ_{ef}.

La varianza del desplazamiento proteico, δR^2, se obtuvo a partir del valor de τ_{ef}, donde sólo resta conocerse el valor de τ_R, el que puede ser estimado fácilmente asumiendo que D_R puede aproximarse al coeficiente de difusión obtenido por métodos electroquímicos, Figura 39, y empleando la expresión $\tau_R = (\beta^2 D_R)^{-1}$. Empleando una combinación de las ecuaciones 25, 26 y 27, y adoptando un valor de 750 ps para el parámetro τ_x, obtenido a partir de estimaciones previas para citocromo *c*[88] se obtuvieron los valores de δR^2, con un valor medio para ambas proteínas en ambas monocapas de 10,3 $Å^2$. Si bien el citocromo *c* es una proteína estructural y dinámicamente distinta a las cupredoxinas, un orden de magnitud de variación en el parámetro τ_x representa menos de un 10% del valor de δR^2. Por otra parte, esta nueva teoría propone de alguna manera restarle peso al τ_x al incorporar la dinámica proteica de manera independiente a él, sugiriendo, en otras palabras, que este parámetro no da cuenta de todos los procesos de relajación que afectan el proceso de TE. El valor obtenido representa un desplazamiento cuadrático medio de 3,2 Å a lo largo de la dirección R, perpendicular a la superficie de la monocapa, lo que indica que este parámetro representa una suerte de convolución de factores, entre ellos dinámica propia de la estructura proteica así como también reorientación proteica alrededor de un punto de unión sobre la superficie, lo que va de acuerdo con resultados de simulaciones y experimentos realizados sobre citocromo *c*.[70] A partir de estos resultados, se puede estimar el valor de la constante efectiva, κ, según la siguiente relación $\kappa = k_B T/\delta R^2$, obteniéndose el mismo valor para ambas proteínas dentro del error experimental, con un valor promedio de 2,48 x 10^{-3} eV $Å^{-2}$.

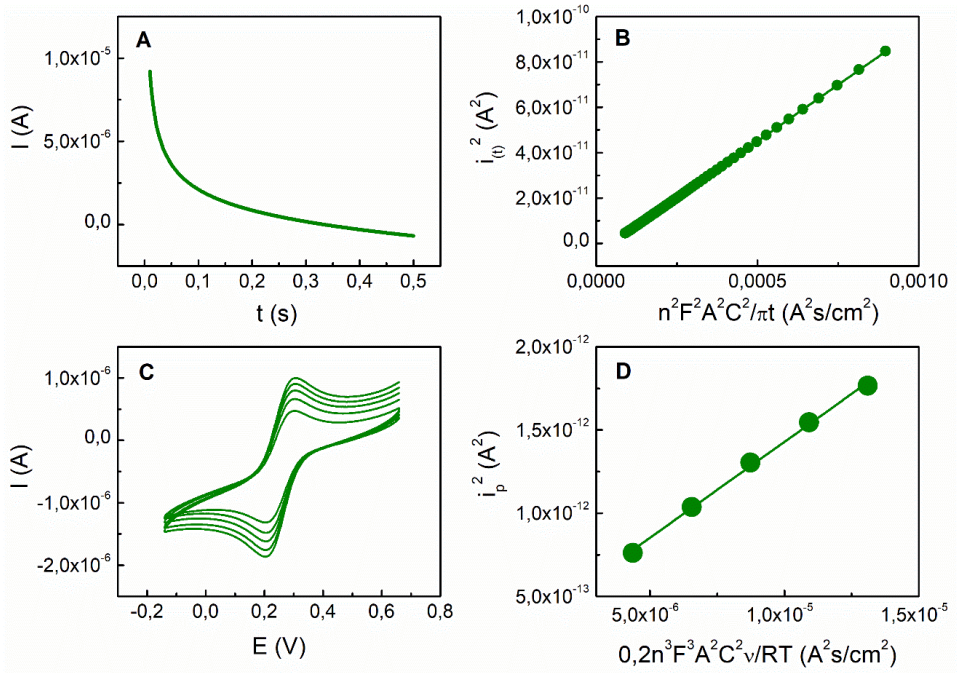


Figura 39: *Medidas electroquímicas empleadas para determinar el coeficiente de difusión, D, de Tt-Cu$_A$ empleando un buffer fosfato 10 mM, pH 7 y 500mM KNO$_3$, utilizando electrodos de oro recubiertos con monocapas n = 5 terminadas en grupos OH.* ***A.*** *Cronoamperograma obtenido durante de 10 segundos a un potencial fijo partiendo de un potencial de 0,6 V y un salto a -0,1 V.* ***B.*** *Gráfico de Cottrell a partir de los datos del experimento presentado en A, de cuya pendiente se obtiene el coeficiente de difusión, D = 10^{-7} cm^2 s^{-1}.* ***C****. Voltagramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido entre 20 y 60 mV/s.* ***D****. Gráfico análogo a la ecuación de Cottrell para voltametría cíclica en solución, D = 10^{-7} cm^2 s^{-1}.*

5.5.2- Contribución friccional a la energía de activación

Tal como se comentó previamente, una de las características que se observa al acortar el largo de la monocapa es un incremento de la energía de activación. En la Figura 40 se presenta este incremento para ambas proteínas en ambas monocapas, y se ve observa claramente que presenta un comportamiento sigmoideo, tal como lo hacía el parámetro empírico γ, Figura 24-B. Este incremento es consistente con un régimen friccional a monocapas cortas y un régimen no adiabático a monocapas largas. A juzgar por los datos, parece que la transición entre ambos regímenes puros, en monocapas de n de 3 y 15, es más pronunciada en monocapas hidrofóbicas para *Tt*-Cu$_A$, mientras que la situación opuesta ocurre para Azurina, siendo más pronunciada en monocapas más hidrofílicas. En las condiciones límite, completamente no adiabático (n = 15) y completamente friccional (n = 3), se pueden aplicar las ecuaciones 29 y 35, respectivamente. Recordemos que este modelo también propone ecuaciones analíticas donde se verifica que $E_a\,(NA) = \frac{\lambda}{4} - \frac{(\beta k_b T)^2}{2\kappa} < E_a\,(FC) = \frac{\lambda}{4} + \frac{(\beta k_b T)^2}{2\kappa} + E_s$, como se observa experimentalmente.

En este nuevo modelo, el valor de κ se asumió independiente del largo de la monocapa y de la temperatura, es por ello que pudo obtenerse a partir de los gráficos de k_{TE}^{o} en función de la distancia, Figura 37. Sin embargo, este mismo parámetro puede obtenerse a partir de la dependencia de la k_{TE}^{o} con la temperatura a monocapas largas empleando la ecuación 29 y parámetros presentados en la Tabla 6, ver Figura 40-B. Curiosamente, los valores de κ obtenidos de esta última forma son un orden de magnitud superior que aquellos obtenidos a partir de la dependencia de k_{TE}^{o} con la distancia, Tabla 6. Es probable que esta discrepancia provenga de la sobresimplificación de considerar una dependencia lineal de δR^2 con la temperatura, y sea necesario considerar en modificaciones futuras una dependencia más compleja. De este análisis se desprende que esta contribución no sería despreciable ya que corresponde entre 2 y 3 veces el valor de la energía de reorganización según este modelo.

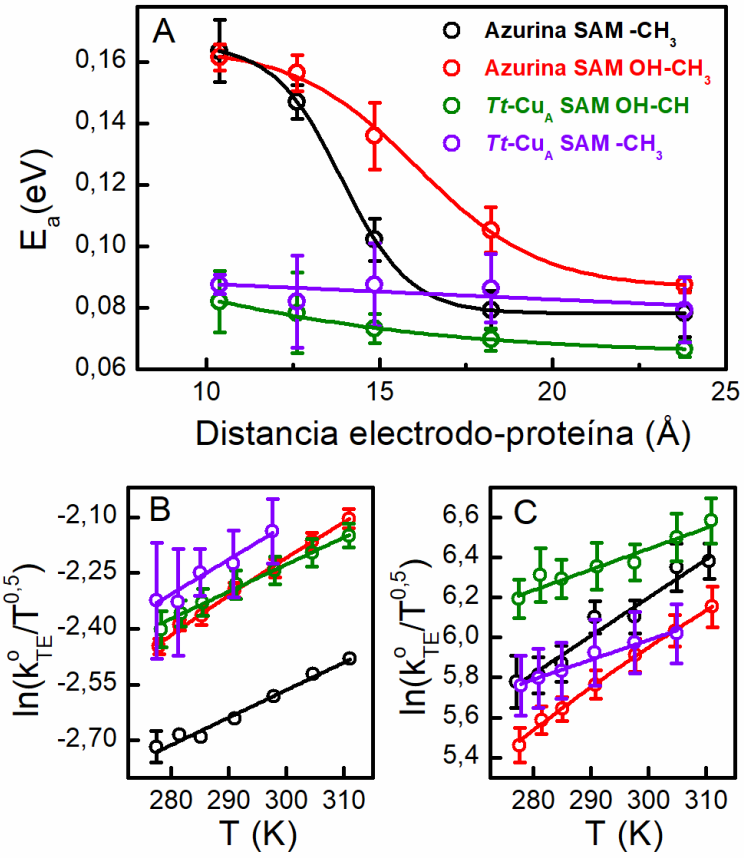


Figura 40: *Datos cinéticos obtenidos a temperatura variable para Azurina y Tt-Cu$_A$, en monocapas hidrofílicas e hidrofóbicas.* ***A****. Energías de activación (E_a) obtenidas a partir de ajustes de Arrhenius en función de la distancia electrodo-proteína, la curvas son solo para guiar el ojo.* ***B****. Valores de k_{TE}^{o} obtenidos en SAM con n = 15 en función de la temperatura ajustados según la ecuación 29 para obtener los valores de κ.* ***C****. Valores de k_{TE}^{o} obtenidos en SAM con n = 3 en función de la temperatura ajustados según la ecuación 35 para obtener los valores de E_s.*

Tabla 7: *Valores de los parámetros de la teoría de TE de Matyushov obtenidos a partir de la dependencia de* k_{TE}^{o} *con la temperatura***.**

Proteína Parámetro cinético	Proteína y condiciones de medida			
	Azurina		*Tt*-Cu_A	
	SAM OH-CH_3	SAM-CH_3	SAM OH-CH_3	SAM-CH_3
$\kappa\left(eV\ \text{Å}^{-2}\right)$	0,023 (±0,003)	0,029 (±0,004)	0,03 (±0,01)	0,02 (±0,02)
$E_s\ (eV)$	0,113 (±0,004)	0,11 (±0,01)	0,04 (±0,01)	0,041 (±0,005)

Por otro lado, la energía de activación extra, E_s, fue determinada a partir de ajustar los datos experimentales obtenidos a monocapa de n = 3 con la ecuación 35, adoptando el valor de κ estimado previamente en el régimen no adiabático. Los resultados indican que este parámetro es insensible a la hidrofobicidad de la monocapa, pero es fuertemente sensible a la proteína, con valores de 0,11 y 0,04 eV para Azurina y *Tt*-Cu_A, tal como se observó previamente. Este parámetro es asimilable al factor $\Delta G_S^{\#}$del modelo de Waldeck, que resultó ser especifico de la matriz proteica. Por lo tanto, este nuevo modelo recupera a grandes rasgos los resultados para el régimen friccional puro, y no adiabático puro, señalados empleando el modelo de Waldeck. Sin embargo, no permite, al menos de una forma trivial, obtener expresiones analíticas para largos de monocapa intermedios. De modo que no es directo evaluar la dependencia del incremento de la E_s al acortar la monocapa.

5.5.3- Efecto de la viscosidad sobre la reacción de TE heterogénea

Como se trató previamente, la k_{TE}^{o} presenta una dependencia hiperbólica con la viscosidad del medio que puede ser descripta según la siguiente ecuación empírica $k_{TE}^{o}(\eta) = k_{TE(\eta_o)}^{o}.\eta^{-\gamma}$. Donde el parámetro γ es función del largo de monocapa, siendo específico del tipo de sitio metálico presente en la proteína, con valores entre 0 y 0,3 para un sitio de Cu_A, y entre 0 y 0,6 para un sitio de T1 como el presente en Azurina, Figuras 24-B y 29. A partir de ese mismo conjunto de datos, valores de k_{TE}^{o} en función de la viscosidad para todos los largos de monocapa, se puede obtener el valor del parámetro τ_{ef} en función de la viscosidad, ajustando los valores de k_{TE}^{o} en función de la distancia para cada valor de viscosidad empleando la ecuación 37, ver Figura 41 y 42.

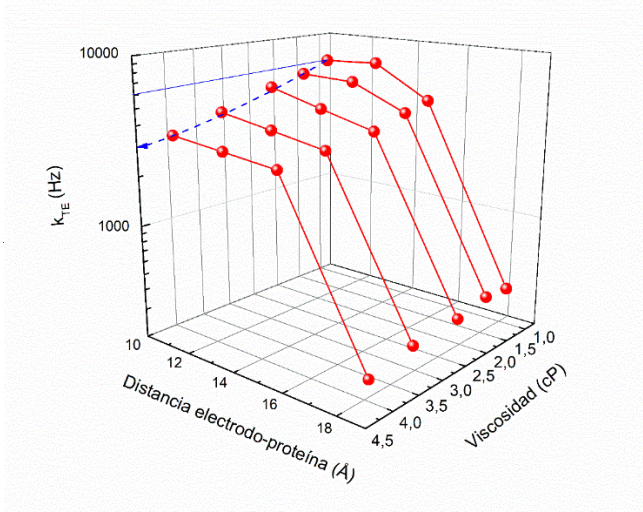


Figura 41: *Gráfico representativo de la dependencia de la k_{TE}^{o} con la distancia y la viscosidad. Los datos corresponden a Azurina en monocapas mixtas. Para mayor claridad de la curvatura con la viscosidad no se incluyeron los datos en monocapas largas (n = 15).*

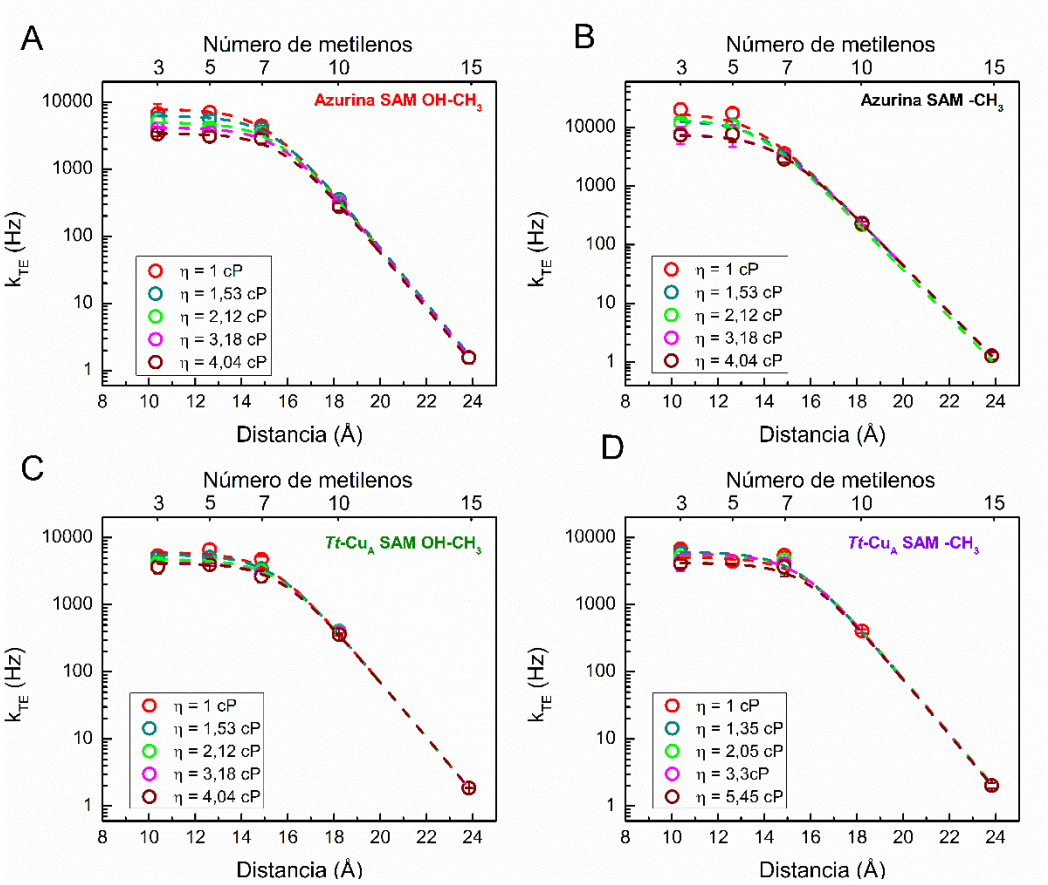


Figura 42: *Valores de k_{TE}^{o} en función de la distancia a distintas viscosidades para ambas proteínas en ambas monocapas, mostrando los ajustes de la ecuación 37 de la teoría de Matyushov.*

Como puede observarse en la Figura 43-B τ_{ef} varía entre 2 y 10 microsegundos y exhibe una dependencia empírica similar al parámetro γ con la viscosidad, ecuación 11.

$$\tau_{ef}(\eta) = \tau_{ef(\eta=1)} \cdot \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \qquad \textbf{Ecuación-38}$$

Es interesante que el parámetro γ_t parece representar el valor máximo de gama, ya que coincide con el valor obtenido para Azurina y *Tt*-Cu$_A$ en las monocapas más cortas, donde empíricamente su valor deja de incrementarse con la distancia electrodo-proteína. Recordemos que este parámetro fue interpretado como una medida empírica del grado de control friccional de la cinética de la TE. De acuerdo con esa propuesta encontramos que la normalización del factor gama por el γ_t lleva a una dependencia directa con el factor de entrecruzamiento *g*, Figura 43-C, que queda plasmada en la siguiente relación empírica, con punto de inflexión en $\gamma/\gamma_t = 0{,}5$ y *g* = 1.

$$\gamma/\gamma_t = \sqrt{g/(g+1)} \qquad \textbf{Ecuación-39}$$

Según indican las ecuaciones 25 a 27 el τ_{ef} es una función de los tiempos de relajación τ_R y τ_x a través de la función $h(\tau_R, \tau_x)$. Esta última puede adoptar valores entre 0 y 1, y determina el peso de cada tiempo de relajación. Pueden obtenerse expresiones para τ_{ef} en los casos límite:

- Si vale que $\tau_x \gg \tau_R$ entonces se tiene:

$$\tau_{ef} = 2\,\tau_R\, exp(\beta^2\,\delta R^2) \qquad \textbf{Ecuación-40}$$

- Si vale que $\tau_x \ll \tau_R$ entonces se tiene:

$$\tau_{ef} = \frac{8\tau_x k_B T}{\lambda}\, exp(\beta^2\,\delta R^2) \qquad \textbf{Ecuación-41}$$

La combinación de la ecuación 26 con la relación de Stokes-Einstein da una expresión simple para la dependencia de tiempo de relajación τ_R con la viscosidad:

$$\tau_R \approx \frac{\eta}{\eta_o}\,\tau_{R(\eta_o)} \qquad \textbf{Ecuación-42}$$

De modo que, si se asume que τ_x no depende de la viscosidad en el rango experimental, uno puede inferir que $\gamma_t = 1$ y $\gamma_t = 0$ se corresponden con los dos casos límite presentados líneas arriba. Sin embargo, los experimentos arrojan valores de γ_t intermedios, lo que sugiere que τ_R y τ_x son comparables bajo las condiciones experimentales empleadas. De hecho, adoptando un valor de 750 ps para τ_x se obtiene que $\tau_x/\tau_R \approx 2$ para Azurina y $\tau_x/\tau_R \approx 0{,}7$ para *Tt*-Cu$_A$.

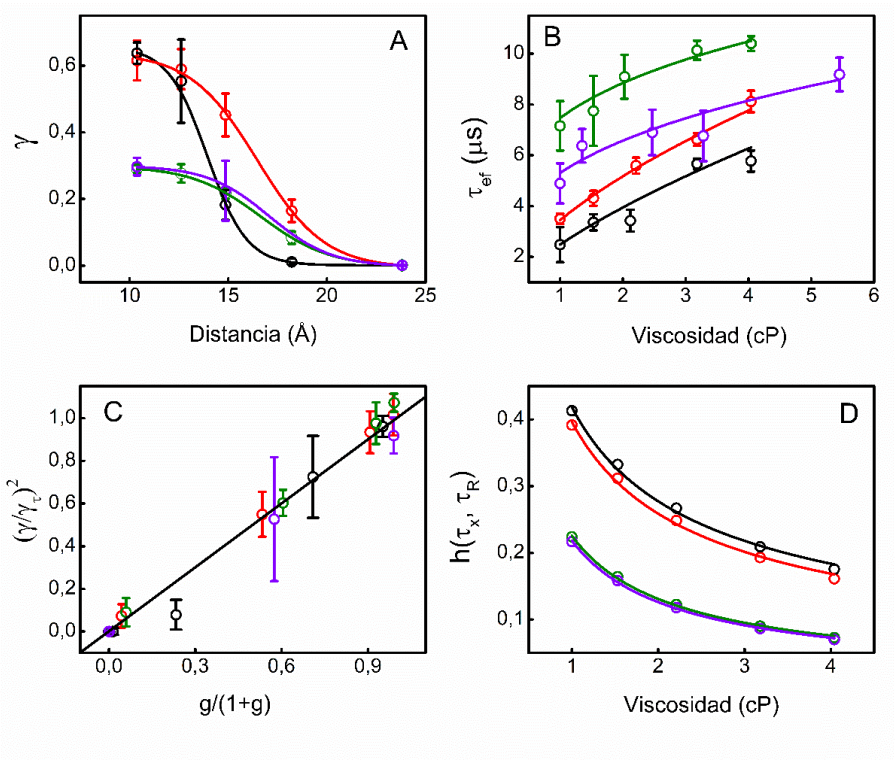


***Figura 43: A**. Parámetro friccional γ obtenido empleando la ecuación 11, en función de la distancia electrodo-proteína. **B**. Tiempos de relación efectivos, τ_{ef}, en función de la viscosidad del medio, η, La línea representa un ajuste de la ecuación 38. **C**. Cuadrado del parámetro γ normalizado por el valor máximo, γ_t, en función del cociente $g/(1+g)$. **D**. Función $h(\tau_x, \tau_R)$ calculada para diferentes valores de viscosidad empleando una combinación de las ecuaciones 27 y 42.*

Combinando las ecuaciones 27 y 42 se puede obtener la variación de la función $h(\tau_x, \tau_R)$ con la viscosidad, $h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta)}\right)$, ver Figura 43-D. Curiosamente el comportamiento de la función $h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta)}\right)$ con la viscosidad recuerda el comportamiento del factor empírico γ con la viscosidad, de modo que lleva a pensar que este comportamiento puede ser expresado como una potencia de la viscosidad, permitiendo utilizar el valor de τ_R a viscosidad unitaria, $h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}, \eta\right)$, y puede ser reproducido por la siguiente expresión aproximada:

$$h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}, \eta\right) \approx \left(1 - \sqrt{\frac{{}^{\lambda}/_{2k_BT}}{{}^{\lambda}/_{2k_BT} + 4\ {}^{\tau_x}/_{\tau_{R(\eta=1)}}}}\right)\left(\frac{\eta}{1\ cP}\right)^{-\sqrt{\frac{{}^{\lambda}/_{2k_BT}}{{}^{\lambda}/_{2k_BT} + 4\ {}^{\tau_x}/_{\tau_{R(\eta=1)}}}}} \qquad \textbf{Ecuación-43}$$

La que puede ser escrita de manera más compacta de la siguiente manera:

$$h(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}, \eta) \approx h(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}) \left(\frac{\eta}{1\ cP}\right)^{h(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)})-1} \qquad \textbf{Ecuación-44}$$

Esta ecuación fue evaluada numéricamente para un amplio rango de valores y se encontró que representa una buena aproximación hasta viscosidades de 10 cP, el doble de las empleadas en este trabajo, Figura 44.

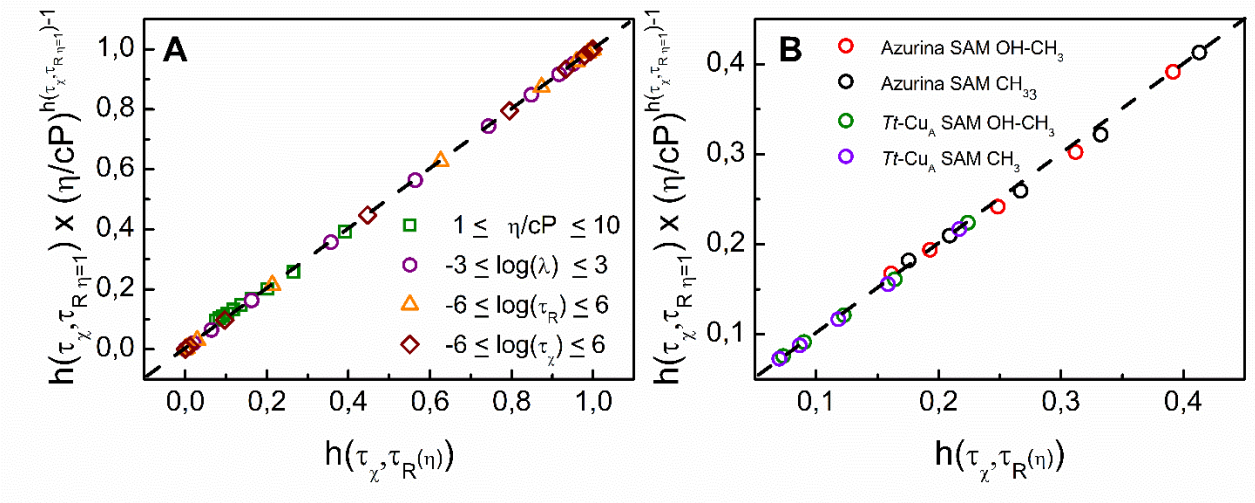


***Figura 44: A**. Función aproximada $h(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}, \eta)$ definida en la ecuación 44, en función de la $h(\tau_x, \tau_{R(\eta)})$ para diferentes valores de viscosidad (cuadrados verdes), energías de reorganización (círculos púrpura), τ_R(triángulos anaranjados) y τ_x (rombos marrones). Al variar el parámetro de prueba el resto de los parámetros se mantuvieron fijos con sus valores correspondientes a viscosidad unitaria. Se emplearon los valores de Azurina en monocapas mixtas como ejemplo. **B**. Se presenta el mismo gráfico extendido al resto del conjunto de proteínas y condiciones, empleando los parámetros obtenidos para cada caso puntual.*

Esta observación permite profundizar el entendimiento sobre el parámetro γ_t, considerando la dependencia de τ_{ef} con la viscosidad, es decir $\tau_{ef}(\eta)$. Comparando las ecuaciones 25 y 38 se llega a:

$$\tau_{ef}(\eta) = \tau_{ef(\eta=1)} \cdot \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} = 2\ \tau_R(\eta)\ exp(\beta^2 \delta R^2)\ h(\tau_x, \tau_{R(\eta)}) \qquad \textbf{Ecuación-45}$$

De modo que en esta expresión la viscosidad entra a través de los factores $\tau_R(\eta)$ y $h(\tau_x, \tau_{R(\eta)})$. Si ahora se introducen las aproximaciones comentadas anteriormente, es decir, las ecuaciones 42 y 44, se tiene la siguiente expresión aproximada:

$$\tau_{ef(\eta=1)} \cdot \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \cong 2\,\tau_{R(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right) exp(\beta^2 \delta R^2)\; h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}\right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}\right)-1} \qquad \textbf{Ecuación-46}$$

Reagrupando todos los factores a viscosidad unitaria, por un lado, y los dos factores dependientes de la viscosidad por el otro, se llega a:

$$\tau_{ef}(\eta) = \tau_{ef(\eta=1)} \cdot \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \cong \tau_{ef(\eta=1)} \cdot \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}\right)} \qquad \textbf{Ecuación-47}$$

De esta manera se logra obtener una expresión analítica para el parámetro empírico γ_t , siendo válida la siguiente igualdad $\gamma_t \cong h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}\right)$, dentro de las condiciones donde tengan sentido las aproximaciones realizadas, Figura 44. De hecho, estimaciones basadas en la ecuación 25 arrojan valores de 0,4 y 0,2 para Azurina y *Tt*-Cu_A, respectivamente, mientras que los valores experimentales son 0,6 y 0,3. Considerando las aproximaciones realizadas en el cálculo estas predicciones se encuentran cualitativamente de acuerdo con los valores experimentales y logran reproducir el factor dos de diferencia entre ellas. Queda demostrado entonces que este parámetro empírico posee un significado físico definido, que no es otra cosa que la función que representa el peso relativo de ambos tiempos de relajación característicos τ_R y τ_x en la reacción de TE a viscosidad unitaria.

Aún queda por determinar el significado de los γ obtenidos a diferentes largos de monocapa, los que son intermedios entre 0 y γ_t. Para indagar en esta cuestión, se puede partir de la expresión general para k_{TE}^o, ecuaciones 3 y 15, donde la expresaremos en función de la viscosidad, η, y de la distancia entre dador y aceptor de electrones, $R' = R + R_o$, de modo que sus parámetros también serán funciones de η y R':

$$k_{TE}^o(\eta, R') = \tau_{ef}^{-1}(\eta) \left(\frac{\tau_{ef}(\eta)\,\langle\Delta(R')\rangle/\hbar}{1 + \tau_{ef}(\eta)\,\langle\Delta(R')\rangle/\hbar}\right) erfc\left(\frac{\lambda}{\sqrt{4\lambda k_B T}}\right) \qquad \textbf{Ecuación-48}$$

En un segundo paso se introducirá la expresión empírica que describe la dependencia de τ_{ef} con la viscosidad, ecuación 38, obteniéndose:

$$k_{TE}^o(\eta, R') = \tau_{ef\,(\eta=1)}^{-1} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle\Delta(R')\rangle/\hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle\Delta(R')\rangle/\hbar}\right) erfc\left(\frac{\lambda}{\sqrt{4\lambda k_B T}}\right) \qquad \textbf{Ecuación-49}$$

Una comparación de esta expresión con aquella para la k_{TE}^o bajo un régimen friccional puro, es decir en monocapas de n = 3 o 5, ecuación 32, nos permitirá reducir la expresión, poniéndola en función de la k_{TE}^o en el régimen friccional puro a viscosidad unitaria, $k_{FC(\,\eta=1)}^o$:

$$k_{TE}^{o}(\eta, R') = k_{FC(\eta=1)}^{o} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) \qquad \textbf{Ecuación-50}$$

Por otra parte, se puede desarrollar la expresión de $k_{TE}^{o}(\eta, R')$ empírica, obtenida previamente, la ecuación 11 (reintroducida aquí como la ecuación 51), donde el parámetro γ será función de *R´*, $\gamma(R')$, y al igual que antes $k_{TE(\eta=1)}^{o}$ se expande empleando la expresión general del modelo de Matyushov para k_{TE}^{o}, ecuaciones 3 y 15**:**

$$k_{TE}^{o}(\eta, R') = k_{TE(\eta=1)}^{o}(R') \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación-51}$$

$$k_{TE}^{o}(\eta, R') = \tau_{ef(\eta=1)}^{-1} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) erfc \left(\frac{\lambda}{\sqrt{4\lambda k_B T}} \right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación-52}$$

Del mismo modo que antes, podemos identificar en esta nueva expresión la expresión correspondiente a $k_{FC(\eta=1)}^{o}$ y la reescribimos en función de esta última:

$$k_{TE}^{o}(\eta, R') = k_{FC(\eta=1)}^{o} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación-53}$$

Igualando las ecuaciones 50 y 53 se llega a la siguiente expresión a partir de la cual se puede obtener una relación directa entre $\gamma(R')$ y el γ_t:

$$\begin{aligned} k_{TE}^{o}(\eta, R') &= k_{FC(\eta=1)}^{o} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) \\ &= k_{FC(\eta=1)}^{o} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \end{aligned} \qquad \textbf{Ecuación-54}$$

$$\left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t} \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{\gamma_t} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) = \left(\frac{\tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar}{1 + \tau_{ef(\eta=1)} \langle \Delta(R') \rangle / \hbar} \right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación-55}$$

Escrita en función del factor de entrecruzamiento, *g*, se tiene:

$$\left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t} \left(\frac{g\,(\eta, R')}{1 + g\,(\eta, R')} \right) = \left(\frac{g_{\eta=1}\,(R')}{1 + g_{\eta=1}\,(R')} \right) \left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')} \qquad \textbf{Ecuación-56}$$

Las expresiones halladas dan cuenta de la caída del valor de k_{TE}^{o} con el incremento de la viscosidad para cualquier largo de monocapa ($R´$), a partir de la $k_{FC(\eta=1)}^{o}$, que es la constante máxima registrada, del régimen friccional puro. De modo, que los factores presentados en la ecuación 56 contendrían la misma información y describen el mismo comportamiento, Figura 45. En otras palabras, el modelo de Matyushov logra describir el comportamiento de k_{TE}^{o} en todas las condiciones, incluso donde el régimen friccional no es total. Bajo este modelo la dependencia con la viscosidad a cualquier largo de monocapa surge naturalmente, aunque no fue analizado por Matyushov en su formulación original.

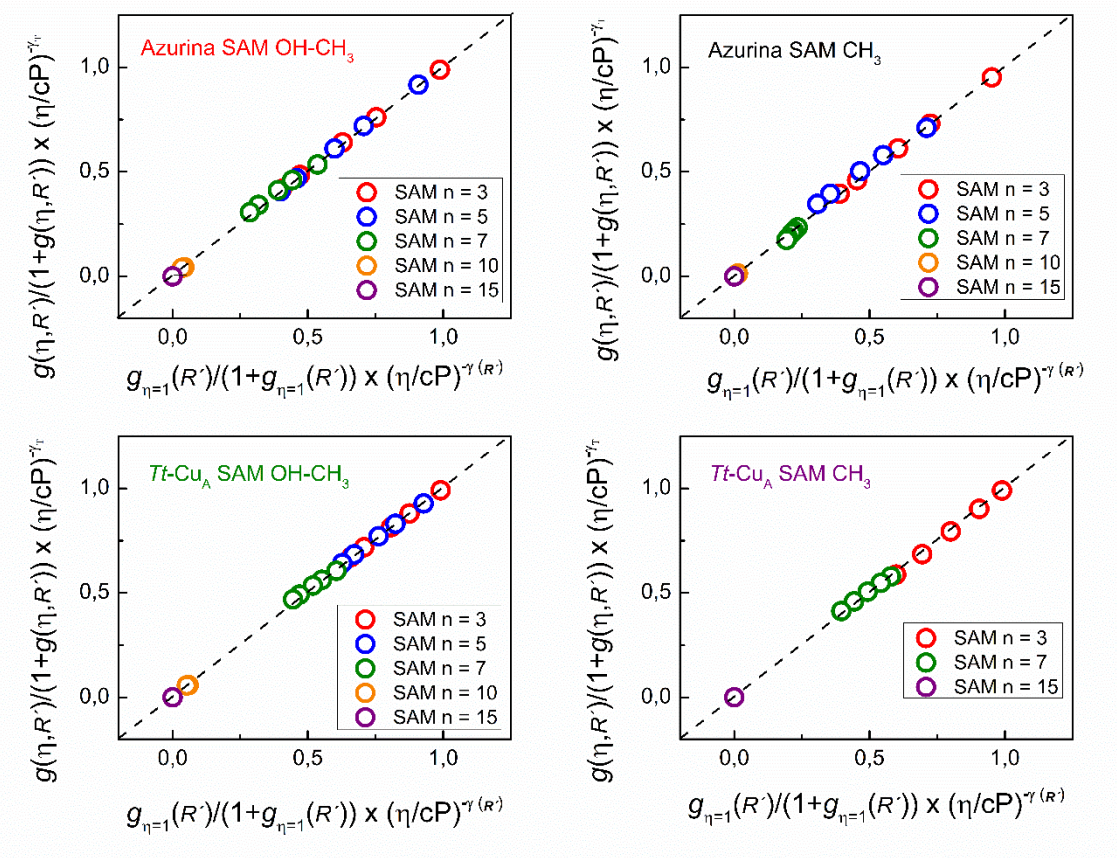


Figura 45: *Gráfico de la igualdad presentada en la ecuación 56 para todas las proteínas en ambas condiciones de medida. La línea punteada representa una pendiente unitaria, mostrando que la igualdad se verifica perfectamente.*

5.6- Conclusiones

Mediante técnicas electroquímicas se estudió exhaustivamente un conjunto amplio de proteínas de cobre naturales como *Tt*-Cu_A y Azurina, y artificiales como las quimeras con centros T1 y Cu_A introducidos mediante técnicas de ingeniería de bucles en la matriz de *Tt*-Cu_A. Se determinaron los parámetros asociados a la reacción de TE heterogénea de muestras proteicas adsorbidas sobre electrodos biocompatbilizados, en función del acoplamiento electrónico, la temperatura, la hidrofobicidad y la viscosidad. En todos los casos se observaron desvíos de lo predicho por el modelo de Marcus de transferencia electrónica no adiabática, a saber: (1) pérdida de la dependencia exponencial de la k_{TE}^o con la distancia entre dador-aceptor de electrones llevando a un comportamiento bifasico, (2) incrementos en la energía de reorganización aparente y (3) dependencia creciente de la k_{TE}^o con la viscosidad del medio. Estos desvíos fueron en franco aumento conforme se acorta la distancia entre proteína y electrodo, lo que indica un claro cambio de régimen de TE de uno no adiabático controlado por tuneleo electrónico a uno de control friccional. En particular, el análisis del amplio conjunto de proteínas estudiadas en este trabajo de tesis puso de manifiesto el orden jerárquico de las contribuciones proteicas en los parámetros específicos en el régimen friccional. Se logró identificar que el parámetro γ, que representa el coeficiente de decaimiento empírico de la k_{TE}^o con la viscosidad del medio, es sitio metálico especifico resultando independiente de la matriz proteica en la que se encuentre (de Azurina o de *Tt*-Cu_A). Esto permitió redefinirlo sutilmente como una medida del acoplamiento dinámico entre el sitio metálico y su entorno, es decir, matriz proteica y solvente. Por otra parte, se identificó que existe una correlación entre la magnitud del incremento de la energía de activación aparente y la matriz proteica testeada, independientemente del sitio metálico que alberga, lo cual deja en evidencia el desacople y el distinto origen de ambos desvíos, que hasta el momento se trataron de manera conjunta.

Finalmente, el desarrollo de una nueva teoría de TE heterogénea para proteínas de manera contemporánea a esta tesis nos dio la oportunidad de contar con un nuevo marco teórico que nos permitió trabajar de manera cuantitativa. El análisis en profundidad para dos sistemas de cobre canónicos naturales, como la Azurina y *Tt*-Cu_A, nos permitió no solo testear y validar la bondad de la nueva propuesta, sino también extenderla para dar cuenta de la dependencia de k_{TE}^o con la viscosidad del medio, que no había sido abordada en la formulación original del modelo. Así mismo, nos permitió identificar puntos débiles del modelo que serán el objeto de estudios futuros.

5.7- Referencias

[1] H. Frauenfelder, P.G. Wolynes, Rate Theories and Puzzles of Hemeprotein Kinetics, Science. 229 (1985) 337–345. https://doi.org/10.1126/science.4012322.

[2] K. Henzler-Wildman, D. Kern, Dynamic personalities of proteins, Nature. 450 (2007) 964–972. https://doi.org/10.1038/nature06522.

[3] M. Wolf, R. Gulich, P. Lunkenheimer, A. Loidl, Relaxation dynamics of a protein solution investigated by dielectric spectroscopy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1824 (2012) 723–730. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.02.008.

[4] A. Ghosh, J.S. Ostrander, M.T. Zanni, Watching Proteins Wiggle: Mapping Structures with Two-Dimensional Infrared Spectroscopy, Chem. Rev. 117 (2017) 10726–10759. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00582.

[5] D.N. LeBard, D.V. Matyushov, Glassy Protein Dynamics and Gigantic Solvent Reorganization Energy of Plastocyanin, J. Phys. Chem. B. 112 (2008) 5218–5227. https://doi.org/10.1021/jp709586e.

[6] M.-C. Bellissent-Funel, A. Hassanali, M. Havenith, R. Henchman, P. Pohl, F. Sterpone, D. van der Spoel, Y. Xu, A.E. Garcia, Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins, Chem. Rev. 116 (2016) 7673–7697. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00664.

[7] S.K. Jørgensen, N.S. Hatzakis, Insights in enzyme functional dynamics and activity regulation by single molecule studies, Biophys. Rev. Lett. 08 (2013) 137–160. https://doi.org/10.1142/S1793048013300028.

[8] J.T. King, K.J. Kubarych, Site-Specific Coupling of Hydration Water and Protein Flexibility Studied in Solution with Ultrafast 2D-IR Spectroscopy, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 18705–18712. https://doi.org/10.1021/ja307401r.

[9] A. Krushelnitsky, D. Reichert, K. Saalwächter, Solid-State NMR Approaches to Internal Dynamics of Proteins: From Picoseconds to Microseconds and Seconds, Acc. Chem. Res. 46 (2013) 2028–2036. https://doi.org/10.1021/ar300292p.

[10] D. Laage, T. Elsaesser, J.T. Hynes, Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules, Chem. Rev. 117 (2017) 10694–10725. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00765.

[11] G. Wei, W. Xi, R. Nussinov, B. Ma, Protein Ensembles: How Does Nature Harness Thermodynamic Fluctuations for Life? The Diverse Functional Roles of Conformational Ensembles in the Cell, Chem. Rev. 116 (2016) 6516–6551. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00562.

[12] L. Hannibal, F. Tomasina, D.A. Capdevila, V. Demicheli, V. Tórtora, D. Alvarez-Paggi, R. Jemmerson, D.H. Murgida, R. Radi, Alternative Conformations of Cytochrome c: Structure, Function, and Detection, Biochemistry. 55 (2016) 407–428. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01385.

[13] R. Guo, S. Zong, M. Wu, J. Gu, M. Yang, Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2, Cell. 170 (2017) 1247-1257.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050.

[14] J. Gu, M. Wu, R. Guo, K. Yan, J. Lei, N. Gao, M. Yang, The architecture of the mammalian respirasome, Nature. 537 (2016) 639–643. https://doi.org/10.1038/nature19359.

[15] L.A. Abriata, D. Álvarez-Paggi, G.N. Ledesma, N.J. Blackburn, A.J. Vila, D.H. Murgida, Alternative ground states enable pathway switching in biological electron transfer, PNAS. 109 (2012) 17348–17353. https://doi.org/10.1073/pnas.1204251109.

[16] D. Alvarez-Paggi, M.A. Castro, V. Tórtora, L. Castro, R. Radi, D.H. Murgida, Electrostatically Driven Second-Sphere Ligand Switch between High and Low Reorganization Energy Forms of Native Cytochrome c, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 4389–4397. https://doi.org/10.1021/ja311786b.

[17] D. Alvarez-Paggi, W. Meister, U. Kuhlmann, I. Weidinger, K. Tenger, L. Zimányi, G. Rákhely, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Disentangling Electron Tunneling and Protein Dynamics of Cytochrome c through a Rationally Designed Surface Mutation, J. Phys. Chem. B. 117 (2013) 6061–6068. https://doi.org/10.1021/jp400832m.

[18] D. Alvarez-Paggi, U. Zitare, D.H. Murgida, The role of protein dynamics and thermal fluctuations in regulating cytochrome c/cytochrome c oxidase electron transfer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1837 (2014) 1196–1207. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.01.019.
[19] D. A. Capdevila, W. A. Marmisollé, F. Tomasina, V. Demicheli, M. Portela, R. Radi, D. H. Murgida, Specific methionine oxidation of cytochrome c in complexes with zwitterionic lipids by hydrogen peroxide: potential implications for apoptosis, Chemical Science. 6 (2015) 705–713. https://doi.org/10.1039/C4SC02181A.
[20] D.A. Capdevila, W.A. Marmisollé, F.J. Williams, D.H. Murgida, Phosphate mediated adsorption and electron transfer of cytochrome c. A time-resolved SERR spectroelectrochemical study, Phys. Chem. Chem. Phys. 15 (2013) 5386–5394. https://doi.org/10.1039/C2CP42044A.
[21] M. Hoppert, F. Mayer, Prokaryotes: Even without membrane-bounded compartments, prokaryotes display a high degree of subcellular organization, American Scientist. 87 (1999) 518–525.
[22] D.N. Beratan, C. Liu, A. Migliore, N.F. Polizzi, S.S. Skourtis, P. Zhang, Y. Zhang, Charge Transfer in Dynamical Biosystems, or The Treachery of (Static) Images, Acc. Chem. Res. 48 (2015) 474–481. https://doi.org/10.1021/ar500271d.
[23] P. Antoniou, Z. Ma, P. Zhang, D.N. Beratan, S.S. Skourtis, Vibrational control of electron-transfer reactions: a feasibility study for the fast coherent transfer regime, Phys. Chem. Chem. Phys. 17 (2015) 30854–30866. https://doi.org/10.1039/C5CP00610D.
[24] H. Wang, S. Lin, J.P. Allen, J.C. Williams, S. Blankert, C. Laser, N.W. Woodbury, Protein Dynamics Control the Kinetics of Initial Electron Transfer in Photosynthesis, Science. 316 (2007) 747–750. https://doi.org/10.1126/science.1140030.
[25] M. Malferrari, F. Francia, G. Venturoli, Coupling between Electron Transfer and Protein–Solvent Dynamics: FTIR and Laser-Flash Spectroscopy Studies in Photosynthetic Reaction Center Films at Different Hydration Levels, J. Phys. Chem. B. 115 (2011) 14732–14750. https://doi.org/10.1021/jp2057767.
[26] D.V. Matyushov, Protein electron transfer: Dynamics and statistics, J. Chem. Phys. 139 (2013) 025102. https://doi.org/10.1063/1.4812788.
[27] E.I. Solomon, R.G. Hadt, B.E.R. Snyder, Activating Metal Sites for Biological Electron Transfer, Israel Journal of Chemistry. 56 (2016) 649–659. https://doi.org/10.1002/ijch.201600016.
[28] S.A. Pérez-Henarejos, L.A. Alcaraz, A. Donaire, Blue Copper Proteins: A rigid machine for efficient electron transfer, a flexible device for metal uptake, Archives of Biochemistry and Biophysics. 584 (2015) 134–148. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.020.
[29] O. Farver, N.M. Marshall, S. Wherland, Y. Lu, I. Pecht, Designed azurins show lower reorganization free energies for intraprotein electron transfer, PNAS. 110 (2013) 10536–10540. https://doi.org/10.1073/pnas.1215081110.
[30] J.R. Winkler, H.B. Gray, Electron Flow through Metalloproteins, Chem. Rev. 114 (2014) 3369–3380. https://doi.org/10.1021/cr4004715.
[31] H.B. Gray, J.R. Winkler, Long-range electron transfer, PNAS. 102 (2005) 3534–3539. https://doi.org/10.1073/pnas.0408029102.
[32] J. Blumberger, Recent Advances in the Theory and Molecular Simulation of Biological Electron Transfer Reactions, Chem. Rev. 115 (2015) 11191–11238. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00298.
[33] R.A. Marcus, N. Sutin, Electron transfers in chemistry and biology, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics. 811 (1985) 265–322. https://doi.org/10.1016/0304-4173(85)90014-X.
[34] R.A. Marcus, On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions, J. Chem. Phys. 43 (1965) 679–701. https://doi.org/10.1063/1.1696792.
[35] S. Gosavi, S.S. Gosavi, Electron Transfer at Metal Surfaces, (2002).
[36] S. Gosavi, R.A. Marcus, Nonadiabatic Electron Transfer at Metal Surfaces, J. Phys. Chem. B. 104 (2000) 2067–2072. https://doi.org/10.1021/jp9933673.

[37] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, T. Tretyakova, D.H. Waldeck, R. van Eldik, Electron transfer with azurin at Au–SAM junctions in contact with a protic ionic melt: impact of glassy dynamics, Phys. Chem. Chem. Phys. 15 (2013) 16515–16526. https://doi.org/10.1039/C3CP51896E.
[38] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, T. Tretyakova, R. van Eldik, Electron transfer with self-assembled copper ions at Au-deposited biomimetic films: mechanistic `anomalies' disclosed by temperature- and pressure-assisted fast-scan voltammetry, J. Phys. D: Appl. Phys. 48 (2015) 255402. https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/25/255402.
[39] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, R. van Eldik, Multiple Mechanisms for Electron Transfer at Metal/Self-Assembled Monolayer/Room-Temperature Ionic Liquid Junctions: Dynamical Arrest versus Frictional Control and Non-Adiabaticity, Chemistry – A European Journal. 15 (2009) 5254–5262. https://doi.org/10.1002/chem.200802450.
[40] V. Kapko, D.V. Matyushov, Dynamical Arrest of Electron Transfer in Liquid Crystalline Solvents, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 13184–13194. https://doi.org/10.1021/jp0615205.
[41] D.V. Matyushov, Nanosecond Stokes Shift Dynamics, Dynamical Transition, and Gigantic Reorganization Energy of Hydrated Heme Proteins, J. Phys. Chem. B. 115 (2011) 10715–10724. https://doi.org/10.1021/jp200409z.
[42] D.V. Matyushov, Non-Ergodic Electron Transfer in Mixed-Valence Charge-Transfer Complexes, J. Phys. Chem. Lett. 3 (2012) 1644–1648. https://doi.org/10.1021/jz300630t.
[43] D.V. Matyushov, Protein electron transfer: is biology (thermo)dynamic?, J. Phys.: Condens. Matter. 27 (2015) 473001. https://doi.org/10.1088/0953-8984/27/47/473001.
[44] A. Avila, B.W. Gregory, K. Niki, T.M. Cotton, 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. 104 (2000) 2759–2766. https://doi.org/10.1021/jp992591p.
[45] Q. Chi, J. Zhang, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup, Ordered Assembly and Controlled Electron Transfer of the Blue Copper Protein Azurin at Gold (111) Single-Crystal Substrates, J. Phys. Chem. B. 105 (2001) 4669–4679. https://doi.org/10.1021/jp0105589.
[46] K. Fujita, N. Nakamura, H. Ohno, B.S. Leigh, K. Niki, H.B. Gray, J.H. Richards, Mimicking Protein−Protein Electron Transfer: Voltammetry of Pseudomonas aeruginosa Azurin and the Thermus thermophilus CuA Domain at ω-Derivatized Self-Assembled-Monolayer Gold Electrodes, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 13954–13961. https://doi.org/10.1021/ja047875o.
[47] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, M. Shushanyan, K.L. Davis, D.H. Waldeck, R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, PNAS. 107 (2010) 2757–2762. https://doi.org/10.1073/pnas.0910837107.
[48] J. Wei, H. Liu, D.E. Khoshtariya, H. Yamamoto, A. Dick, D.H. Waldeck, Electron-Transfer Dynamics of Cytochrome C: A Change in the Reaction Mechanism with Distance, Angewandte Chemie International Edition. 41 (2002) 4700–4703. https://doi.org/10.1002/anie.200290021.
[49] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, J. Wei, Y.-F. He, H. Liu, D.H. Waldeck, 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. 108 (2004) 2261–2269. https://doi.org/10.1021/jp0353800.
[50] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy, Chem. Soc. Rev. 37 (2008) 937–945. https://doi.org/10.1039/B705976K.
[51] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 7 (2005) 3773–3784. https://doi.org/10.1039/B507989F.

[52] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Electron-Transfer Processes of Cytochrome c at Interfaces. New Insights by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy, Acc. Chem. Res. 37 (2004) 854–861. https://doi.org/10.1021/ar0400443.
[53] U.A. Zitare, J. Szuster, M.F. Scocozza, A. Espinoza-Cara, A.J. Leguto, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, The role of molecular crowding in long-range metalloprotein electron transfer: Dissection into site- and scaffold-specific contributions, Electrochimica Acta. 294 (2019) 117–125. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.069.
[54] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Dynamical effects in metalloprotein heterogeneous electron transfer, Electrochimica Acta. 342 (2020) 136095. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136095.
[55] J.-J. Feng, D.H. Murgida, U. Kuhlmann, T. Utesch, M.A. Mroginski, P. Hildebrandt, I.M. Weidinger, Gated Electron Transfer of Yeast Iso-1 Cytochrome c on Self-Assembled Monolayer-Coated Electrodes, J. Phys. Chem. B. 112 (2008) 15202–15211. https://doi.org/10.1021/jp8062383.
[56] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Proton-Coupled Electron Transfer of Cytochrome c, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 4062–4068. https://doi.org/10.1021/ja004165j.
[57] K. Niki, W.R. Hardy, M.G. Hill, H. Li, J.R. Sprinkle, E. Margoliash, K. Fujita, R. Tanimura, N. Nakamura, H. Ohno, J.H. Richards, H.B. Gray, Coupling to Lysine-13 Promotes Electron Tunneling through Carboxylate-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Cytochrome c, J. Phys. Chem. B. 107 (2003) 9947–9949. https://doi.org/10.1021/jp035392l.
[58] K.L. Davis, D.H. Waldeck, Effect of Deuterium Substitution on Electron Transfer at Cytochrome c/SAM Interfaces, J. Phys. Chem. B. 112 (2008) 12498–12507. https://doi.org/10.1021/jp803006b.
[59] A. El Kasmi, J.M. Wallace, E.F. Bowden, S.M. Binet, R.J. Linderman, Controlling Interfacial Electron-Transfer Kinetics of Cytochrome c with Mixed Self-Assembled Monolayers, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 225–226. https://doi.org/10.1021/ja973417m.
[60] J. Xu, E.F. Bowden, Determination of the Orientation of Adsorbed Cytochrome c on Carboxyalkanethiol Self-Assembled Monolayers by In Situ Differential Modification, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 6813–6822. https://doi.org/10.1021/ja054219v.
[61] H. Yue, D. Khoshtariya, D.H. Waldeck, J. Grochol, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, On the Electron Transfer Mechanism Between Cytochrome c and Metal Electrodes. Evidence for Dynamic Control at Short Distances, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 19906–19913. https://doi.org/10.1021/jp0620670.
[62] M.F. Molinas, A.D. Candia, S.H. Szajnman, J.B. Rodríguez, M. Martí, M. Pereira, M. Teixeira, S. Todorovic, D.H. Murgida, Electron transfer dynamics of Rhodothermus marinus caa3 cytochrome c domains on biomimetic films, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 18088–18098. https://doi.org/10.1039/C1CP21925A.
[63] P. Zuo, T. Albrecht, P.D. Barker, D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Interfacial redox processes of cytochrome b562, Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 7430–7436. https://doi.org/10.1039/B904926F.
[64] A. Kranich, H. Naumann, F.P. Molina-Heredia, H.J. Moore, T.R. Lee, S. Lecomte, M.A. de la Rosa, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Gated electron transfer of cytochromec6 at biomimetic interfaces: a time-resolved SERR study, Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 7390–7397. https://doi.org/10.1039/B904434E.
[65] A.V. Zhuravleva, D.M. Korzhnev, E. Kupce, A.S. Arseniev, M. Billeter, V.Yu. Orekhov, Gated Electron Transfers and Electron Pathways in Azurin: A NMR Dynamic Study at Multiple Fields and Temperatures, Journal of Molecular Biology. 342 (2004) 1599–1611. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.001.
[66] L.J.C. Jeuken, J.P. McEvoy, F.A. Armstrong, 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. 106 (2002) 2304–2313. https://doi.org/10.1021/jp0134291.
[67] L.J.C. Jeuken, Conformational reorganisation in interfacial protein electron transfer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1604 (2003) 67–76. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00026-4.

[68] A. Kranich, H.K. Ly, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Direct Observation of the Gating Step in Protein Electron Transfer: Electric-Field-Controlled Protein Dynamics, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 9844–9848. https://doi.org/10.1021/ja8016895.
[69] H.K. Ly, M.A. Marti, D.F. Martin, D. Alvarez-Paggi, W. Meister, A. Kranich, I.M. Weidinger, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Thermal Fluctuations Determine the Electron-Transfer Rates of Cytochrome c in Electrostatic and Covalent Complexes, ChemPhysChem. 11 (2010) 1225–1235. https://doi.org/10.1002/cphc.200900966.
[70] D. Alvarez-Paggi, D.F. Martín, P.M. DeBiase, P. Hildebrandt, M.A. Martí, D.H. Murgida, Molecular Basis of Coupled Protein and Electron Transfer Dynamics of Cytochrome c in Biomimetic Complexes, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 5769–5778. https://doi.org/10.1021/ja910707r.
[71] L.D. Zusman, Outer-sphere electron transfer in polar solvents, Chemical Physics. 49 (1980) 295–304. https://doi.org/10.1016/0301-0104(80)85267-0.
[72] L.D. Zusman, Dynamical Solvent Effects in Electron Transfer Reactions, Zeitschrift Für Physikalische Chemie. 186 (1994) 1–29. https://doi.org/10.1524/zpch.1994.186.Part_1.001.
[73] L.D. Zusman, Outer-sphere electron transfer reactions at an electrode, Chemical Physics. 112 (1987) 53–59. https://doi.org/10.1016/0301-0104(87)85021-8.
[74] A.M. Kuznetsov, J. Ulstrup, Theory of electron transfer at electrified interfaces, Electrochimica Acta. 45 (2000) 2339–2361. https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00336-4.
[75] R.R. Dogonadze, A.M. Kuznetsov, A.A. Chernenko, THEORY OF HOMOGENEOUS AND HETEROGENEOUS ELECTRONIC PROCESSES IN LIQUIDS, Russ. Chem. Rev. 34 (1965) 759. https://doi.org/10.1070/RC1965v034n10ABEH001561.
[76] M. Abramowitz, I.A. Stegun, Handbook of mathematical functions with formulas, graphs, and mathematical tables., Ninth, National Bureau of Standards Applied Mathematics Series, Washington DC, USA, 1970.
[77] M.J. Weaver, I.I.I. McManis, Dynamical Solvent Effects on Electron-Transfer Processes: Recent Progress and Perspectives, PURDUE UNIV LAFAYETTE IN DEPT OF CHEMISTRY, 1990. https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA222603 (accessed March 28, 2022).
[78] M.J. Weaver, Dynamical solvent effects on activated electron-transfer reactions: Principles, pitfalls, and progress, 1992. https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1992dsea.rept.....W (accessed March 28, 2022).
[79] M.J. Weaver, Molecular solvent-dynamical effects on activated electron-transfer kinetics: How important is solvent friction?, Journal of Molecular Liquids. 60 (1994) 57–71. https://doi.org/10.1016/0167-7322(94)00739-X.
[80] N. Agmon, Tetrahedral Displacement: The Molecular Mechanism behind the Debye Relaxation in Water, J. Phys. Chem. 100 (1996) 1072–1080. https://doi.org/10.1021/jp9516295.
[81] R.A. Robinson, R.H. Stokes, Electrolyte solutions, second edition, Dover Publicatins, Inc.1959, MIneola, New York, USA, n.d.
[82] R. Qadeer, Concentration and temperature dependence of viscosity of uranium solutions in H2O and 3 mol/L HNO3, J. Zheijang Univ.-Sci. 5 (2004) 457–461. https://doi.org/10.1631/jzus.2004.0457.
[83] E.N. Andrade, Viscosity and plasticity, W. Heffner and Sons Ltd, Cambridge, 1947.
[84] H.A. Kramers, Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, Physica. 7 (1940) 284–304. https://doi.org/10.1016/S0031-8914(40)90098-2.
[85] D.V. Matyushov, Potential-step transient response of an electrochemical system, Journal of Electroanalytical Chemistry. 367 (1994) 1–6. https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)03019-L.
[86] D.V. Matyushov, A phenomenological model of dynamical arrest of electron transfer in solvents in the glass-transition region, The Journal of Chemical Physics. 122 (2005) 084507. https://doi.org/10.1063/1.1851981.
[87] D.V. Matyushov, Nonergodic activated kinetics in polar media, J. Chem. Phys. 130 (2009) 164522. https://doi.org/10.1063/1.3119639.

[88] S.S. Seyedi, M.M. Waskasi, D.V. Matyushov, Theory and Electrochemistry of Cytochrome c, J. Phys. Chem. B. 121 (2017) 4958–4967. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b00917.
[89] Z. Futera, X. Jiang, J. Blumberger, Ergodicity Breaking in Thermal Biological Electron Transfer? Cytochrome C Revisited II, J. Phys. Chem. B. (2020). https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c01414.
[90] D.V. Matyushov, Dynamical Effects in Protein Electrochemistry, J. Phys. Chem. B. 123 (2019) 7290–7301. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b04516.
[91] N.A. Chebotareva, B.I. Kurganov, N.B. Livanova, Biochemical effects of molecular crowding, Biochemistry (Moscow). 69 (2004) 1239. https://doi.org/10.1007/s10541-005-0070-y.
[92] D. Miyoshi, N. Sugimoto, Molecular crowding effects on structure and stability of DNA, Biochimie. 90 (2008) 1040–1051. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.009.
[93] A. Politou, P.A. Temussi, Revisiting a dogma: the effect of volume exclusion in molecular crowding, Current Opinion in Structural Biology. 30 (2015) 1–6. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.005.
[94] R. Saha, A. Pohorille, I.A. Chen, Molecular Crowding and Early Evolution, Orig Life Evol Biosph. 44 (2014) 319–324. https://doi.org/10.1007/s11084-014-9392-3.
[95] M.T. Hay, M.C. Ang, D.R. Gamelin, E.I. Solomon, W.E. Antholine, M. Ralle, N.J. Blackburn, P.D. Massey, X. Wang, A.H. Kwon, Y. Lu, Spectroscopic Characterization of an Engineered Purple CuA Center in Azurin, Inorg. Chem. 37 (1998) 191–198. https://doi.org/10.1021/ic971232a.
[96] C.E.D. Chidsey, Free Energy and Temperature Dependence of Electron Transfer at the Metal-Electrolyte Interface, Science. (1991). https://doi.org/10.1126/science.251.4996.919.
[97] Y.-P. Liu, M.D. Newton, Reorganization Energy for Electron Transfer at Film-Modified Electrode Surfaces: A Dielectric Continuum Model, J. Phys. Chem. 98 (1994) 7162–7169. https://doi.org/10.1021/j100080a011.
[98] S.E. Creager, T.T. Wooster, A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers, Anal. Chem. 70 (1998) 4257–4263. https://doi.org/10.1021/ac980482l.
[99] S. Creager, C.J. Yu, C. Bamdad, S. O'Connor, T. MacLean, E. Lam, Y. Chong, G.T. Olsen, J. Luo, M. Gozin, J.F. Kayyem, Electron Transfer at Electrodes through Conjugated "Molecular Wire" Bridges, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 1059–1064. https://doi.org/10.1021/ja983204c.
[100] J.J. Sumner, K.S. Weber, L.A. Hockett, S.E. Creager, Long-Range Heterogeneous Electron Transfer Between Ferrocene and Gold Mediated By n-Alkane and N-Alkyl-Carboxamide Bridges, J. Phys. Chem. B. 104 (2000) 7449–7454. https://doi.org/10.1021/jp000992v.
[101] F.G. Davia, S.E. Herrera, E.J. Calvo, Gaussian Distribution of Electron Transfer Distance in Redox Terminated Self-Assembled Thiol Monolayers, J. Phys. Chem. C. 123 (2019) 13939–13943. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00702.
[102] S.E. Herrera, F.G. Davia, F.J. Williams, E.J. Calvo, Metal Nanoparticle Enhancement of Electron Transfer to Tethered Redox Centers through Self-Assembled Molecular Films, Langmuir. 35 (2019) 6297–6303. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00280.
[103] Z. Yang, Y. He, J.-H. Lee, N. Park, M. Suh, W.-S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang, J.S. Kim, A Self-Calibrating Bipartite Viscosity Sensor for Mitochondria, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 9181–9185. https://doi.org/10.1021/ja403851p.
[104] T. Liu, X. Liu, D.R. Spring, X. Qian, J. Cui, Z. Xu, Quantitatively Mapping Cellular Viscosity with Detailed Organelle Information via a Designed PET Fluorescent Probe, Sci Rep. 4 (2014) 5418. https://doi.org/10.1038/srep05418.
[105] N. Jiang, J. Fan, S. Zhang, T. Wu, J. Wang, P. Gao, J. Qu, F. Zhou, X. Peng, Dual mode monitoring probe for mitochondrial viscosity in single cell, Sensors and Actuators B: Chemical. 190 (2014) 685–693. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.062.
[106] S. Monari, G. Battistuzzi, C.A. Bortolotti, S. Yanagisawa, K. Sato, C. Li, I. Salard, D. Kostrz, M. Borsari, A. Ranieri, C. Dennison, M. Sola, Understanding the Mechanism of Short-Range Electron Transfer Using an Immobilized Cupredoxin, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 11848–11851. https://doi.org/10.1021/ja303425b.

[107] W.A. Marmisollé, D.A. Capdevila, E. de la Llave, F.J. Williams, D.H. Murgida, Self-Assembled Monolayers of NH2-Terminated Thiolates: Order, pKa, and Specific Adsorption, Langmuir. 29 (2013) 5351–5359. https://doi.org/10.1021/la304730q.
[108] M.-E. Zaballa, L.A. Abriata, A. Donaire, A.J. Vila, Flexibility of the metal-binding region in apo-cupredoxins, Proceedings of the National Academy of Sciences. 109 (2012) 9254–9259. https://doi.org/10.1073/pnas.1119460109.
[109] P. Wittung-Stafshede, B.G. Malmström, D. Sanders, J.A. Fee, J.R. Winkler, H.B. Gray, Effect of Redox State on the Folding Free Energy of a Thermostable Electron-Transfer Metalloprotein: The CuA Domain of Cytochrome Oxidase from Thermus thermophilus, Biochemistry. 37 (1998) 3172–3177. https://doi.org/10.1021/bi972901z.
[110] J. Chaboy, S. Díaz-Moreno, I. Díaz-Moreno, M.A. De la Rosa, A. Díaz-Quintana, How the Local Geometry of the Cu-Binding Site Determines the Thermal Stability of Blue Copper Proteins, Chemistry & Biology. 18 (2011) 25–31. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.12.006.
[111] J. Yang, Y. Wang, L. Wang, D. Zhong, Mapping Hydration Dynamics around a β-Barrel Protein, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 4399–4408. https://doi.org/10.1021/jacs.6b12463.
[112] J. Song, B. Allison, S. Han, Local water diffusivity as a molecular probe of surface hydrophilicity, MRS Bulletin. 39 (2014) 1082–1088. https://doi.org/10.1557/mrs.2014.254.
[113] A. Oleinikova, N. Smolin, I. Brovchenko, Influence of Water Clustering on the Dynamics of Hydration Water at the Surface of a Lysozyme, Biophysical Journal. 93 (2007) 2986–3000. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108753.
[114] F. Pizzitutti, M. Marchi, F. Sterpone, P.J. Rossky, How Protein Surfaces Induce Anomalous Dynamics of Hydration Water, J. Phys. Chem. B. 111 (2007) 7584–7590. https://doi.org/10.1021/jp0717185.
[115] S.M. Bhattacharyya, Z.-G. Wang, A.H. Zewail, Dynamics of Water near a Protein Surface, J. Phys. Chem. B. 107 (2003) 13218–13228. https://doi.org/10.1021/jp030943t.
[116] S. Pronk, E. Lindahl, P.M. Kasson, Dynamic heterogeneity controls diffusion and viscosity near biological interfaces, Nature Communications. 5 (2014) 3034. https://doi.org/10.1038/ncomms4034.
[117] J.I. Monroe, M.S. Shell, Computational discovery of chemically patterned surfaces that effect unique hydration water dynamics, PNAS. 115 (2018) 8093–8098. https://doi.org/10.1073/pnas.1807208115.
[118] A.R. Bizzarri, S. Cannistraro, Molecular Dynamics of Water at the Protein−Solvent Interface, J. Phys. Chem. B. 106 (2002) 6617–6633. https://doi.org/10.1021/jp020100m.
[119] Y. Qin, M. Jia, J. Yang, D. Wang, L. Wang, J. Xu, D. Zhong, Molecular Origin of Ultrafast Water–Protein Coupled Interactions, J. Phys. Chem. Lett. 7 (2016) 4171–4177. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.6b01954.
[120] Y. Qin, L. Zhang, L. Wang, D. Zhong, Observation of the Global Dynamic Collectivity of a Hydration Shell around Apomyoglobin, J. Phys. Chem. Lett. 8 (2017) 1124–1131. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.7b00205.
[121] R. Barnes, S. Sun, Y. Fichou, F.W. Dahlquist, M. Heyden, S. Han, Spatially Heterogeneous Surface Water Diffusivity around Structured Protein Surfaces at Equilibrium, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 17890–17901. https://doi.org/10.1021/jacs.7b08606.
[122] B. Bagchi, Water Dynamics in the Hydration Layer around Proteins and Micelles, Chem. Rev. 105 (2005) 3197–3219. https://doi.org/10.1021/cr020661+.
[123] H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G.W. Canters, X-ray crystal structure of the two site-specific mutants His35Gln and His35Leu of azurin from Pseudomonas aeruginosa, Journal of Molecular Biology. 218 (1991) 427–447. https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90723-J.
[124] D.R. Gamelin, D.W. Randall, M.T. Hay, R.P. Houser, T.C. Mulder, G.W. Canters, S. de Vries, W.B. Tolman, Y. Lu, E.I. Solomon, Spectroscopy of Mixed-Valence CuA-Type Centers: Ligand-Field Control of Ground-State Properties Related to Electron Transfer, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 5246–5263. https://doi.org/10.1021/ja973161k.

[125] S. DeBeer George, M. Metz, R.K. Szilagyi, H. Wang, S.P. Cramer, Y. Lu, W.B. Tolman, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, 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. 123 (2001) 5757–5767. https://doi.org/10.1021/ja004109i.

Capítulo 6

Conclusiones generales

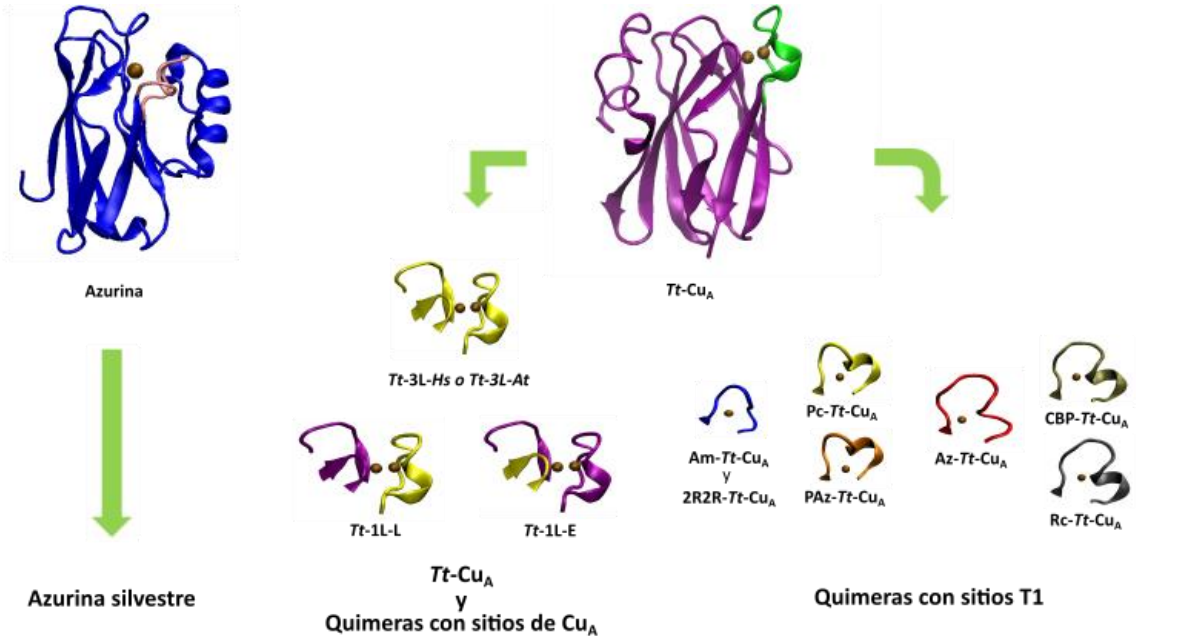
6.1- Conclusiones y perspectivas

El objetivo planteado al comienzo de esta tesis fue el de contribuir a elucidar los mecanismos moleculares que participan de la regulación de los parámetros asociados a la reacción de TE en metaloproteínas de cobre, poniendo especial atención en dos aspectos relevantes en este tipo de sistemas: (i) la influencia de los diferentes niveles estructurales, primera y segunda esfera de coordinación y matriz proteica, y (ii) su influencia bajo condiciones de viscosidad y acoplamiento electrónico crecientes en medios anisotrópicos (reacción de TE heterogénea) que emulan, en cierto grado, el complejo entorno intracelular.[1–7] Los resultados obtenidos indican que existe un importante nivel de desacople entre aspectos cinéticos, termodinámicos y dinámicos que responden a diferentes componentes moleculares del sistema proteína-solvente que permiten su modulación independiente. Estos resultados anticipan un escenario donde un control/regulación de tipo modular pueda ser efectivamente considerado a la hora de pensar nuevas estrategias de diseño e ingeniería de metaloproteínas buscando optimizar procesos de TE explotando la naturaleza jerárquica del comportamiento y estructura proteicas.[8] Por otra parte, esta visión se podría extrapolar a sistemas naturales permitiendo pensar en un escenario donde el mecanismo de selección natural pudiera estar operando sobre estos sistemas con mayor libertad, es decir, donde el solapamiento de presiones de selección se vea reducido. Esta reducción, otorgaría mayores grados de libertad al cambio evolutivo en cada categoría jerárquica (en nuestro caso mayormente estructurales) lo que posibilitaría un mayor grado de optimización de cada componente individual pudiendo contribuir con la radiación evolutiva de las distintas familias de metaloproteínas redox.[9–13]

Específicamente, en el capítulo 3 se presentó el análisis espectroscópico y funcional de un conjunto de proteínas quiméricas donde se introdujeron sitios metálicos mononucleares de cobre de tipo 1 en una matriz proteica que nativamente alberga un sitio binuclear de Cu_A. La evidencia experimental indica que en este tipo de construcciones la energía de reorganización y el potencial de reducción pueden ser modulados de manera independiente, el primero respondiendo exclusivamente al grado de accesibilidad del sitio metálico por el solvente circundante, mientras que el segundo parece estar fuertemente dominado por imposiciones estructurales que determinan la geometría del centro metálico, modulando la estabilidad relativa de ambos estados redox. A diferencia de sistemas quiméricos estudiados previamente, donde fueron empleadas matrices proteicas que naturalmente albergaban sitios T1, nuestras quimeras permiten regular la accesibilidad variando sistemáticamente la longitud del bucle que conforma el centro metálico, lo cual lo vuelve particularmente versátil, dando cuenta de un

incremento progresivo en la energía de reorganización (λ) de 0,3 a 0,6 eV. Por otro lado, el cambio gradual del largo del bucle introduce perturbaciones geométricas sutiles que modulan alrededor de 60 mV el potencial de reducción, entorno a un valor promedio de 440 mV, considerando todo el conjunto de quimeras. Si, por el contrario, se reemplazan los residuos no coordinantes de los bucles, es decir, manteniendo la primera esfera de coordinación intacta, por residuos cargados positivamente sin alterar significativamente la accesibilidad del centro, se logra alterar la estabilidad relativa de ambos estados redox, permitiendo un incremento del potencial de hasta 120 mV, a valores de energía de reorganización fijos.[14] Las condiciones experimentales fueron elegidas de forma tal de poder analizar los resultados en el marco de la TE de Marcus, sin embargo, ofrecen una plataforma única para profundizar el entendimiento sobre TE heterogénea en condiciones de acoplamiento electrónico y viscosidad crecientes donde históricamente se observaron desvíos del modelo de Marcus.[15,16] Puntualmente, en el capítulo 5 se presenta evidencia robusta que indica un cambio de mecanismo de TE de uno no adiabático a uno de control friccional, principalmente a través del factor preexponencial que rige las expresiones de k_{TE} en ambos regímenes. Los parámetros que emergen en las expresiones en el régimen friccional de TE responden nuevamente a características distintivas de cada nivel estructural. Centros de Cu_A y T1 difieren en su sensibilidad a la viscosidad del medio, con factores γ promedio de 0,3 y 0,6 respectivamente, de manera independiente del andamiaje proteico en el cual se encuentren inmersos, matriz proteica de *Tt*-Cu_A o de Azurina.[17] A su vez, el incremento de la energía de activación aparente del proceso de TE ($\Delta G_{Ap}^{\#}$) se encuentra regido, en cierta medida, por la matriz proteica de Azurina o de *Tt*-Cu_A, presentando valores de 0,12 (±0,01) eV y 0,046 (±0,009) eV, respectivamente, para el factor de activación friccional, notado como $\Delta G_S^{\#}$ en el modelo de Waldeck[18–20] e identificado como E_S en el modelo de Matyushov[21,22]. De esta manera, se añade una capa de complejidad extra al análisis realizado hasta el momento que debe ser tenida en cuenta para un diseño racional de metaloproteínas artificiales donde se busque el control y optimización de la TE. En este sentido resulta particularmente interesante el hecho de que este nuevo incremento de la energía de activación muestre una naturaleza modular. Esto sugiere su incorporación en la receta casi de manera directa, ver Figura-1.

Por otra parte, la metodología empleada permitió generar metaloproteínas con propiedades fisicoquímicas novedosas expandiendo el conocimiento actual en el campo. Se lograron generar sitios mononucleares de cobre de tipo 1,5 (T1,5) que presentan propiedades espectroscópicas y funcionales intermedias entre un sitio T1 y los sitios T2 preexistentes mediante la incorporación directa de un ligando exógeno en el sitio T1 de las quimeras.[23] De un modo análogo se logró generar un sitio de cobre T2 a partir de incorporar un bucle que carece de la metionina axial comúnmente presente en sitios T1 en la matriz de *Tt*-Cu_A.[24,25] Ambos tipos de sitios obtenidos presentan indicios de una covalencia del enlace Cu-S_{cis} intensificada, probablemente debido a imposiciones estéricas y geométricas provenientes de la matriz de *Tt*-Cu_A que deviene en una actividad electroquímica incrementada, lo que las vuelve excelentes candidatos para estudios de electrocatálisis y sensado de pequeñas moléculas.



TE no adiabática			
λ = 0,3 eV	estado σ_u* ⟷ estado π_u		λ = 0,3 eV ⟶ λ = 0,6 eV
	λ = 0,3 eV	λ = 0,6 eV	Bucle corto ⟶ Bucle largo
	$\|H_{DA}\|$ ↓↓↓	$\|H_{DA}\|$ ↑↑↑	ASAS bajo ⟶ ASAS alto
TE control friccional			
Sitio T1 γ = 0,6	Sitio de Cu_A γ = 0,3		Sitio T1 γ = 0,6
Matriz de Azurina $\Delta G_s^{\#}$= 0,12 eV	Matriz de *Tt*-Cu_A $\Delta G_s^{\#}$= 0,046 eV		Matriz de *Tt*-Cu_A $\Delta G_s^{\#}$= 0,046 eV

Figura 1: *Esquema que condensa los principales parámetros de activación modulables en las metaloproteínas de cobre estudiadas. Panel superior: Estructuras cristalinas de Azurina (pdb 4AZU) y Tt-Cu_A (pdb 2CUA) donde los bucles ligantes se indican coloreados de rosa y verdes, respectivamente. Para las quimeras de Cu_A se indica en color amarillo el/los bucle/s reemplazados por secuencias análogas eucariotas, y en violeta las secuencias originales de Tt-Cu_A. Panel inferior: principales parámetros cinéticos y dinámicos de activación que caracterizan los distintos regímenes de TE estudiados, susceptibles de ser modificados en forma independiente, o de manera modular.*

Además del potencial en el diseño racional o re-diseño de metaloproteínas naturales tanto la metodología empleada como el sistema de estudio permiten ahondar sobre conceptos de interés teórico básico como es el caso del fenómeno de compensación entrópico/entálpica observado en sitios T1, T2 y Cu_A, y sus bases moleculares subyacentes, particularmente en lo que se refiere a las diferentes contribuciones a la entropía de reducción, ΔS_{Red}. Para los sitios T1 se observó una compensación entrópica/entálpica completa[26–30] y dependencia de los valores de ΔS_{Red}, y por ende también de ΔH_{Red}, con el tipo de electrolito soporte empleado[31,32] siguiendo su posición en la serie de Hofmeister[33–41], lo que sugiere que las contribuciones a la entropía son principalmente debidas a cambios en la estructura promedio del solvente en ambos estados redox. Esto se da conjuntamente con la ausencia de fuertes cambios en el potencial redox y, por ende, en la estructura del sitio metálico.[42–45] Por otro lado, el sitio T2 presente en la quimera *Nmar*-*Tt*-Cu_A representa el primer caso reportado de un control entrópico del potencial de reducción, es decir, la componente entrópica es mayor en modulo que su contraparte entálpica, contrariamente a todos los sistemas de cobre reportados hasta el momento, demostrando que aún no está todo dicho y hay mucho más que se puede aprender de sistemas artificiales.[25] El caso de los sitios de Cu_A tratados en el Capítulo 4 advierte un panorama algo diferente, donde se observa una compensación entrópico/entálpica parcial lo que sugiere una contribución extra a los valores de ΔS_{Red}. Por otro lado, una fuerte correlación entre los valores de ΔS_{Red} con los valores de diferencia energética entre ambos estados electrónicos fundamentales alternativos, $\Delta E_{\sigma/\pi}$, indica que la contribución de la diferencia en la multiplicidad electrónica de ambos estados redox a lo largo del conjunto de proteínas estudiadas es no despreciable e impacta fuertemente en los valores de entropía, dando cuenta de su magnitud y su signo invariablemente negativo.[46,47]

Además, tal como se trató en el Capítulo 5, estudios de TE heterogénea como los abordados en este trabajo permitieron la formulación de una nueva teoría de TE heterogénea para proteínas.[21] Más aún, el estudio en función de la viscosidad, acoplamiento y temperatura variables en proteínas de cobre nos permitió validar el nuevo modelo, y extenderlo para dar cuenta de las observaciones experimentales en función de viscosidad del medio.[22] Se obtuvieron expresiones analíticas para el parámetro empírico γ utilizados previamente por Waldeck y Zusman[18,19] para describir el régimen de control friccional. Empleando la nueva teoría de Matyushov se demuestra que el valor de γ máximo, que corresponde al factor de decaimiento de k_{TE}^{o} con la viscosidad creciente, obtenido en la zona de la meseta de los gráficos de k_{TE}^{o} en función del acoplamiento, Figura 25-B del Capítulo 5, es equivalente al parámetro γ_t, que es aquel que se obtiene a partir de la dependencia del tiempo de relajación efectivo, τ_{ef}, con la viscosidad, verificando la siguiente igualdad, ecuación 47 del Capítulo 5:

$$\gamma_t \cong h\left(\tau_x, \tau_{R(\eta=1)}\right)$$

Es decir, no es otra cosa que la función que regula el peso relativo de los tiempos de relajación del corrimiento de Stokes, τ_x, y el tiempo de relajación difusional proteico, τ_R. Así mismo, se logró hallar una expresión que relaciona este parámetro γ_t con el parámetro γ no sólo para la condición límite de un comportamiento friccional puro, sino para todas las condiciones de

acoplamiento y viscosidad evaluadas, demostrando que la nueva teoría permite describir el entrecruzamiento de regímenes, según la siguiente expresión, ecuación 56 del Capítulo 5:

$$\left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma_t}\left(\frac{g\,(\eta,R')}{1+g\,(\eta,R')}\right)=\left(\frac{g_{\eta=1}\,(R')}{1+g_{\eta=1}\,(R')}\right)\left(\frac{\eta}{cp}\right)^{-\gamma(R')}$$

Del mismo modo, las implicancias en procesos de interés biológico quedan a la vista a lo largo de todo el análisis previo. Principalmente, la naturaleza modular de control de los parámetros estudiados a lo largo de este trabajo, que son aquellos que definen el mecanismo de la reacción de TE según distintos modelos, sugiere que la estrategia que aquí se plantea como de potencial uso en el diseño e ingeniería de proteínas podría estar llevándose a cabo de manera más general por la misma naturaleza mediante selección natural con cierto grado de independencia no prevista anteriormente. Esta es una observación no menor teniendo en cuenta que en el complejo entorno intracelular, las proteínas enfrentan diferentes condiciones de pH, atmosfera iónica, campo eléctrico, condiciones anisotrópicas, *crowding* molecular (y por ende alta viscosidad), y presentando diferentes requerimientos de complementariedad (topológicas, electrostáticas, especificidad de residuos superficiales, etc) entre superficies proteicas o de membrana. Todas esas variables indudablemente condicionan la magnitud del cambio permitido para sintonizar sus funciones a través de la selección natural. Bajo este escenario, poder identificar que la modulación de ciertos parámetros de TE pueden tener lugar de manera independiente permite proponerlo como un *truco bajo la manga* que posee la naturaleza para enfrentar satisfactoriamente tantas restricciones como las comentadas líneas más arriba y, aún así, permitir el cambio, y con él el proceso evolutivo. Un caso paradigmático lo representan aquellas proteínas que presentan funciones alternativas como en las llamadas proteínas *moonlightning*[48–54], que pueden llevar a cabo múltiples funciones no relacionadas sin la necesidad de aislar y asignar estas funciones a diferentes dominios de su estructura.[52] Dentro de ellas podemos destacar al citocromo *c*, que bajo niveles de estrés celular puede abandonar su función canónica de TE y adoptar actividad peroxidasa permeabilizando las membranas mitocondriales dando origen a los primeros pasos de la apoptosis celular.[55] En estos casos, claramente existe un fuerte solapamiento de presiones de selección de sus componentes y propiedades, donde la optimización de una de sus funciones puede tener repercusiones detrimentales en alguna de sus funciones alternativas, dado que ambas responden a la misma componente estructural/dinámica.[56]

Dentro de los procesos biológicos de relevancia el mecanismo estudiado en los centros de Cu_A representa un caso único en su clase. La existencia de un estado electrónico fundamental alternativo accesible térmicamente, el estado π_u, permite modular el acoplamiento entre este sitio metálico y aquel del citocromo *c* volviéndolo sumamente favorable para la reacción de reducción, mientras que el estado fundamental de más baja energía, estado σ_u^*, no permite un acoplamiento electrónico efectivo. Una vez el sitio de Cu_A se encuentra en estado reducido, el estado σ_u^* es el único posible y, mientras que la TE reversible de este estado y el citocromo *c* se desfavorece el acoplamiento rio abajo con el grupo hemo *b*

se torna favorable, dotando de unidireccionalidad al proceso de TE. Si bien se paga un costo energético durante el pasaje $\sigma_u^* \rightarrow \pi_u$, con un aumento del λ de 0,3 eV a 0,6 eV, el incremento en el acoplamiento electrónico, H_{DA}, es tal que sobrecompensa el incremento de la barrera energética permitiendo una TE eficiente.[57,58] En el Capítulo 4 se presentan resultados que apoyan este mecanismo, dado que la suma de pequeñas distorsiones geométricas relevantes para la coordenada de reacción de TE, emuladas aquí con la construcción de quimeras donde sólo se modificaron uno (quimeras *Tt*-1L) o los tres (quimeras *Tt*-3L) bucles nativos,[46] permiten la disminución de la diferencia energética entre ambos estados, $\Delta E_{\sigma/\pi}$, del mismo modo que lo haría la interacción con su compañero natural el citocromo *c* donde se presuponen distorsiones semejantes.[57]

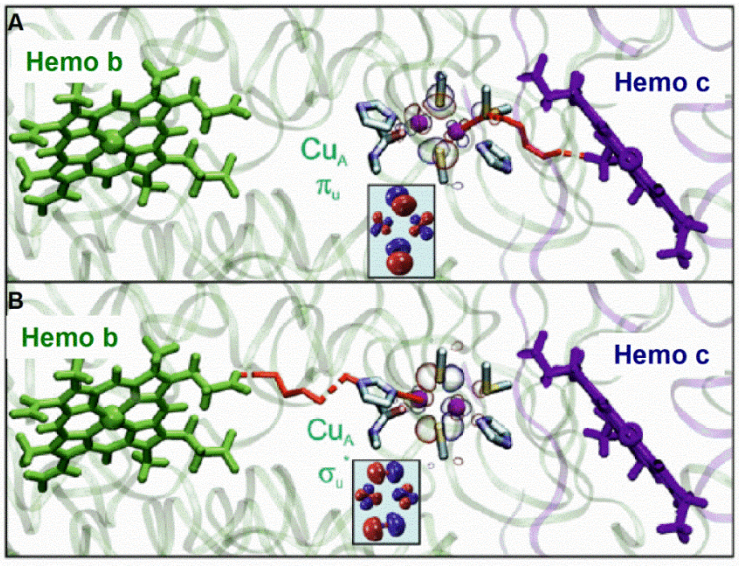


Figura 2: *(Figura adaptada de Abriata et al 2012*[57]*)* ***A.*** *Camino electrónico óptimo para la entrada del electrón al sitio de Cu$_A$ en el estado π_u,* ***B.*** *Camino electrónico óptimo para la salida le electrón del sitio de Cu$_A$ hacia el hemo b en el estado σ_u^*.*

La capacidad de poder controlar la facilidad con la que tiene lugar la reacción de TE también posee su relevancia en el ámbito tecnológico, específicamente en el campo de electrónica molecular, que es aquel en el que las moléculas son utilizadas como elementos activos (interruptores, sensores, etc) o pasivos (rectificadores de corriente, pasivantes superficiales) de los dispositivos.[59] Dentro del mundo de las máquinas moleculares un ejemplo sobresaliente son los cables moleculares. Si bien es posible emplear moléculas sintéticas rápidamente se comenzó a evaluar la factibilidad de la utilización de moléculas de origen biológico**.**[60] La elección de moléculas de ADN tomo vigor[61] siendo secundada por cables basados en proteínas.[62,63] En particular las proteínas con cofactores o grupos prostéticos que son capaces de llevar a cabo reacciones de TE reversibles fueron las más atractivas para estos estudios.[64,65] También se puede hacer la analogía con otros componentes de un circuito eléctrico con macromoléculas dependiendo de sus propiedades

particulares. El empleo de citocromos multihémicos representan un claro ejemplo.[65] Una variedad de este tipo de proteínas conocida como citocromos tetrahémicos pequeños, o STC por sus siglas en inglés ("*small tetraheme cytochromes*"), se encuentra comúnmente presente en estructuras supramoleculares bacterianas capaces de transportar electrones a distancias largas incluso superando las dimensiones celulares. Estas estructuras les permiten a las bacterias intercambiar electrones desde el interior celular a través de la envoltura bacteriana y la matriz extracelular circundante para alcanzar electrodos, nanopartículas o incluso otras bacterias. En estas estructuras se encuentran arreglos de STC las que a su vez están compuestas por un arreglo de cuatro grupos hemo con una orientación particular entre ellos, Figura 3-A, que permite la TE entre ellos y entre distintas STCs. Un estudio reciente empleo estas STC como fototransductores, donde posicionando convenientemente un complejo de rutenio en las vecindades de los distintos grupos hemos lograron que la energía lumínica pueda ser transformada en energía eléctrica, mediante un proceso de fotoreducción asistido por una molécula en solución dadores de electrones.[66,67] Sin embargo, dependiendo de las características de cada grupo hemo este proceso podía ser completo, pudiéndose ser empleados como cables moleculares que transporten corriente fotoinducida, o incompleto pudiendo ser empleados como resistencias en un circuito.

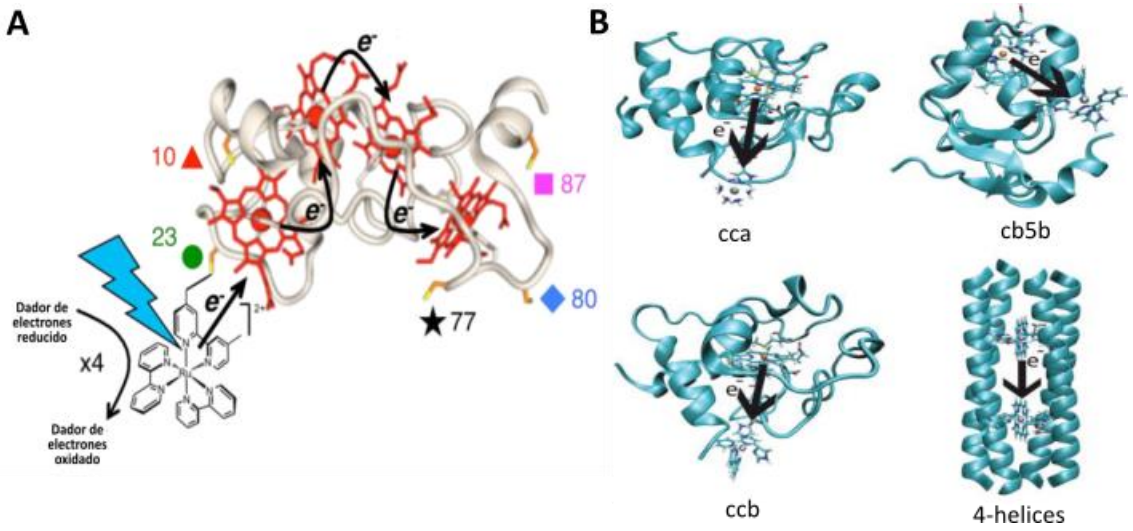


Figura 3: ***A.*** (Figura adaptada de van Wonderen *et al*[66]) *Representación esquemática de una molécula de STC modificada con complejos de Ru(bipiridin)$_3^{2+}$ posicionados en diferentes ubicaciones (indicadas con símbolos de colores en el esquema) para funcionar como un fototransductor en presencia de un dador de electrones externo. En rojo se representan los grupos hemo. Los símbolos indican las posiciones de los complejos introducidas en las diferentes construcciones.* ***B.*** *(Figura adaptada de Tipmanee et al*[68]*) Diferentes proteínas conteniendo grupos hemo y/o complejos de rutenio redox activos entre los que tiene lugar TE intraproteica: Ru(am)$_5$His33 / citocromo c (cca), Ru(bipi)$_2$(im)His33 / citocromo c (ccb), Ru(bipi)$_2$(im)His26 / citocromo b$_5$ (cb5b), y una superhélice que contiene dos complejos de Ru-difenilporfirina como cofactores (4-hélice).*

Aún teniendo en cuenta las múltiples diferencias entre los sistemas uno podría pensar en un sistema análogo, donde alguno de los grupos que llevan a cabo la TE sean proteínas conteniendo sitios de cobre u otro metal, en una suerte de cable molecular modular[69,70]. En particular, los sitios T1 estudiados en esta tesis presentan características interesantes con potencial aplicación en este tipo de diseños. Como se comentó previamente el reemplazo del bucle ligando nativo en la matriz de *Tt*-Cu_A por bucles de diferentes longitudes controla la exposición del sitio al solvente permitiendo la modulación del λ en un factor dos. Estos resultados tienen varios aspectos destacables como lo son (i) el hecho de que se logró hacer de manera independiente de la modulación del *E°´*, y (ii) cambiando de manera sistemática una variable estructural sencilla como lo es el largo del bucle (recordemos que construcciones quiméricas similares empleando la matriz de Azurina no permiten tal magnitud de cambio ni tampoco presentan una correlación sencilla con un parámetro estructural fácilmente modulable).[71] Si bien la modulación hacia abajo de la barrera cinética tiene, *a priori,* una potencial aplicación directa, volviendo el proceso de TE más eficiente, su modulación hacia valores mayores puede encontrar dificultades en su aplicabilidad dado que ralentiza el proceso. Sin embargo, este aspecto podría ser explotado para regular el flujo de electrones en un cable molecular de manera análoga a una resistencia eléctrica. Resultados de cálculos híbridos QM/MM sobre un conjunto de hemoproteínas modificadas con complejos de rutenio redox activos, Figura 3-B, apoyan este tipo de modulación sobre la λ para reacciones de TE intraproteica mediante la variación de la accesibilidad es posible incluso para hemoproteínas.[68]

Por otro lado, en el caso comentado de la STC modificada se postula que la diferencia en los entornos de los grupos hemos, que en última instancia regula el potencial de reducción de estos, es el parámetro que determina si la construcción puede funcionar como un cable o como un aislante. De manera análoga, se puede complementar el efecto de la barrera de activación modulando simultáneamente la fuerza impulsora controlando el valor de *E°´* de los sitios variando la identidad de los residuos no coordinantes en los bucles de las quimeras. Es aquí donde nuevamente se pone en evidencia la importancia del desacople entre ambos parámetros dado que permiten diseñar una combinación entre *E°´* y λ adecuada según se necesite. En este trabajo de tesis se cuentan con tres grupos de quimeras que poseen igual largo de bucle, y por ende valores de λ comparables, pero que difieren en la secuencia del bucle, que son para un bucle de once residuos CBP-*Tt*-Cu_A y Rc-*Tt*-Cu_A, con nueve residuos Pc-*Tt*-Cu_A y PAz-*Tt*-Cu_A, y con siete residuos Am-*Tt*-Cu_A y 2R2R-*Tt*-Cu_A. Estos pares permiten una modulación del *E°´* de 8, 20 y 120 mV, respectivamente, sin alterar el valor de λ dentro de cada pareja.

El empleo de sitios binucleares de Cu_A por otro lado, ofrecen nuevas herramientas en el campo de la bioingeniería de metaloproteínas con potencial uso en biodispositivos electrónicos. No solo permite modular λ seleccionando alternativamente el estado electrónico fundamental redox-activo (π_uo σ_u^*) mediante perturbaciones locales, de primera y segunda esfera de coordinación,[46,57,58,72] sino que garantiza la unidireccionalidad del proceso de TE debido a la inexistencia de un estado electronico π_u en el estado reducido, lo que lleva a un cambio a un estado σ_u^* con el consiguiente cambio en el acoplamiento electrónico río arriba de la reacción. En consonancia con los ejemplos previos, un sitio de Cu_A puede ser considerado como un centro donde los electrones son recibidos y entregados unidireccionalmente en un

ángulo de casi 90 grados, según indican cálculos de camino electrónico realizados cobre el complejo *Tt*-Cu_A/Cit-*c* la entrada se da por la metionina axial y la salida por la histidina-157 ecuatorial.[57] Tal característica podría ser conveniente para el diseño de distintas arquitecturas bioelectrónicas fijas para transferencia electrónica en estado sólido, donde el acoplamiento electrónico debe ser cuidadosamente regulado.[73–76]

La bioelectrónica naturalmente enmarca los sistemas de estudio bajo los lineamientos de la teoría de Marcus para TE, lo cual ya hemos demostrado que resulta insuficiente para dar cuenta de todas las observaciones experimentales bajo condiciones fisiológicas y tecnológicamente relevantes. De modo que se vuelve imperante la incorporación de nuevas estrategias que tengan en cuenta todos los aspectos dinámicos/estructurales comentados a lo largo de este trabajo. Y en ese sentido, comienza a aclarase el camino hacia un estudio sistemático de diferentes combinaciones de centros metálicos y matrices proteicas, incluso a gran escala, con el fin de dotarnos con nuevos ladrillos moleculares de los que disponer a la hora de enfrentar nuevos desafíos tecnológicos.

6.2- Referencias

[1] R. Guo, S. Zong, M. Wu, J. Gu, M. Yang, Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2, Cell. 170 (2017) 1247-1257.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050.

[2] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, Crowders and Cosolvents—Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses, ChemPhysChem. 18 (2017) 2951–2972. https://doi.org/10.1002/cphc.201700762.

[3] M. Feig, I. Yu, P. Wang, G. Nawrocki, Y. Sugita, Crowding in Cellular Environments at an Atomistic Level from Computer Simulations, J. Phys. Chem. B. 121 (2017) 8009–8025. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b03570.

[4] R.J. Ellis, A.P. Minton, Join the crowd, Nature. 425 (2003) 27. https://doi.org/10.1038/425027a.

[5] G. Rivas, A.P. Minton, Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between, Trends in Biochemical Sciences. 41 (2016) 970–981. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.013.

[6] R.J. Ellis, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, Trends in Biochemical Sciences. 26 (2001) 597–604. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01938-7.

[7] J. Gu, M. Wu, R. Guo, K. Yan, J. Lei, N. Gao, M. Yang, The architecture of the mammalian respirasome, Nature. 537 (2016) 639–643. https://doi.org/10.1038/nature19359.

[8] K. Henzler-Wildman, D. Kern, Dynamic personalities of proteins, Nature. 450 (2007) 964–972. https://doi.org/10.1038/nature06522.

[9] Y. Lu, S.M. Berry, T.D. Pfister, Engineering Novel Metalloproteins: Design of Metal-Binding Sites into Native Protein Scaffolds, Chem. Rev. 101 (2001) 3047–3080. https://doi.org/10.1021/cr0000574.

[10] J. Liu, S. Chakraborty, P. Hosseinzadeh, Y. Yu, S. Tian, I. Petrik, A. Bhagi, Y. Lu, Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers, Chem. Rev. 114 (2014) 4366–4469. https://doi.org/10.1021/cr400479b.

[11] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Occurrence of Copper Proteins through the Three Domains of Life: A Bioinformatic Approach, J. Proteome Res. 7 (2008) 209–216. https://doi.org/10.1021/pr070480u.

[12] Y. Zhang, J. Zheng, Bioinformatics of Metalloproteins and Metalloproteomes, Molecules. 25 (2020) 3366. https://doi.org/10.3390/molecules25153366.

[13] C. Andreini, I. Bertini, A. Rosato, Metalloproteomes: A Bioinformatic Approach, Acc. Chem. Res. 42 (2009) 1471–1479. https://doi.org/10.1021/ar900015x.

[14] J. Szuster, U.A. Zitare, M.A. Castro, A.J. Leguto, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, CuA-based chimeric T1 copper sites allow for independent modulation of reorganization energy and reduction potential, Chem. Sci. (2020). https://doi.org/10.1039/D0SC01620A.

[15] R.A. Marcus, On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions, J. Chem. Phys. 43 (1965) 679–701. https://doi.org/10.1063/1.1696792.

[16] R.A. Marcus, Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory, Annual Review of Physical Chemistry. 15 (1964) 155–196. https://doi.org/10.1146/annurev.pc.15.100164.001103.

[17] U.A. Zitare, J. Szuster, M.F. Scocozza, A. Espinoza-Cara, A.J. Leguto, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, The role of molecular crowding in long-range metalloprotein electron transfer: Dissection into site- and scaffold-specific contributions, Electrochimica Acta. 294 (2019) 117–125. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.069.

[18] H. Yue, D. Khoshtariya, D.H. Waldeck, J. Grochol, P. Hildebrandt, D.H. Murgida, On the Electron Transfer Mechanism Between Cytochrome c and Metal Electrodes. Evidence for Dynamic Control at Short Distances, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 19906–19913. https://doi.org/10.1021/jp0620670.

[19] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, M. Shushanyan, K.L. Davis, D.H. Waldeck, R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, PNAS. 107 (2010) 2757–2762. https://doi.org/10.1073/pnas.0910837107.

[20] D.H. Waldeck, D.E. Khoshtariya, Fundamental Studies of Long- and Short-Range Electron Exchange Mechanisms between Electrodes and Proteins, in: N. Eliaz (Ed.), Applications of Electrochemistry and

Nanotechnology in Biology and Medicine I, Springer, New York, NY, 2011: pp. 105–238. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0347-0_2.
[21] D.V. Matyushov, Dynamical Effects in Protein Electrochemistry, J. Phys. Chem. B. 123 (2019) 7290–7301. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b04516.
[22] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Dynamical effects in metalloprotein heterogeneous electron transfer, Electrochimica Acta. 342 (2020) 136095. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136095.
[23] A. Espinoza-Cara, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, S. Klinke, L.H. Otero, D.H. Murgida, A.J. Vila, Engineering a bifunctional copper site in the cupredoxin fold by loop-directed mutagenesis, Chem. Sci. 9 (2018) 6692–6702. https://doi.org/10.1039/C8SC01444B.
[24] P. Hosseinzadeh, S. Tian, N.M. Marshall, J. Hemp, T. Mullen, M.J. Nilges, Y.-G. Gao, H. Robinson, D.A. Stahl, R.B. Gennis, Y. Lu, A Purple Cupredoxin from Nitrosopumilus maritimus Containing a Mononuclear Type 1 Copper Center with an Open Binding Site, J. Am. Chem. Soc. 138 (2016) 6324–6327. https://doi.org/10.1021/jacs.5b13128.
[25] J. Szuster, A.J. Leguto, U.A. Zitare, J.P. Rebechi, A.J. Vila, D.H. Murgida, Electrochemical characterization of an engineered red copper protein featuring an unprecedented entropic control of the reduction potential, Bioelectrochemistry. 146 (2022) 108095. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108095.
[26] G. Battistuzzi, M. Borsari, G. Di Rocco, A. Ranieri, M. Sola, Enthalpy/entropy compensation phenomena in the reduction thermodynamics of electron transport metalloproteins, J Biol Inorg Chem. 9 (2004) 23–26. https://doi.org/10.1007/s00775-003-0490-3.
[27] G. Battistuzzi, M. Bellei, M. Borsari, G.W. Canters, E. de Waal, L.J.C. Jeuken, A. Ranieri, M. Sola, Control of Metalloprotein Reduction Potential: Compensation Phenomena in the Reduction Thermodynamics of Blue Copper Proteins, Biochemistry. 42 (2003) 9214–9220. https://doi.org/10.1021/bi034585w.
[28] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Loschi, F. Righi, M. Sola, Redox Thermodynamics of Blue Copper Proteins, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 501–506. https://doi.org/10.1021/ja982126q.
[29] G. Battistuzzi, M. Borsari, M. Sola, Medium and Temperature Effects on the Redox Chemistry of Cytochrome c, European Journal of Inorganic Chemistry. 2001 (2001) 2989–3004. https://doi.org/10.1002/1099-0682(200112)2001:12<2989::AID-EJIC2989>3.0.CO;2-E.
[30] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Loschi, M. Sola, Redox properties of the basic blue protein (plantacyanin) from spinach, Journal of Inorganic Biochemistry. 69 (1998) 97–100. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)10026-5.
[31] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Loschi, M. Sola, Redox thermodynamics, acid-base equilibria and salt-induced effects for the cucumber basic protein. General implications for blue-copper proteins, JBIC. 2 (1997) 350–359. https://doi.org/10.1007/s007750050142.
[32] G. Battistuzzi, M. Borsari, M. Sola, Anion Binding to Cytochromec2: Implications on Protein–Ion Interactions in Class I Cytochromesc, Archives of Biochemistry and Biophysics. 339 (1997) 283–290. https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9862.
[33] F. Bogár, F. Bartha, Z. Násztor, L. Fábián, B. Leitgeb, A. Dér, On the Hofmeister Effect: Fluctuations at the Protein–Water Interface and the Surface Tension, J. Phys. Chem. B. 118 (2014) 8496–8504. https://doi.org/10.1021/jp502505c.
[34] M. Boström, D.R.M. Williams, B.W. Ninham, Specific Ion Effects: Why the Properties of Lysozyme in Salt Solutions Follow a Hofmeister Series, Biophysical Journal. 85 (2003) 686–694. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74512-3.
[35] M.G. Cacace, E.M. Landau, J.J. Ramsden, The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena, Quarterly Reviews of Biophysics. 30 (1997) 241–277. https://doi.org/10.1017/S0033583597003363.
[36] K.D. Collins, Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process, Methods. 34 (2004) 300–311. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.021.
[37] S.C. Flores, J. Kherb, P.S. Cremer, Direct and Reverse Hofmeister Effects on Interfacial Water Structure, J. Phys. Chem. C. 116 (2012) 14408–14413. https://doi.org/10.1021/jp3029352.

[38] M.C. Gurau, S.-M. Lim, E.T. Castellana, F. Albertorio, S. Kataoka, P.S. Cremer, On the Mechanism of the Hofmeister Effect, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 10522–10523. https://doi.org/10.1021/ja047715c.
[39] P. Jungwirth, P.S. Cremer, Beyond Hofmeister, Nature Chemistry. 6 (2014) 261–263. https://doi.org/10.1038/nchem.1899.
[40] E. Lee, J.-H. Choi, M. Cho, The effect of Hofmeister anions on water structure at protein surfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 20008–20015. https://doi.org/10.1039/C7CP02826A.
[41] H.I. Okur, J. Hladílková, K.B. Rembert, Y. Cho, J. Heyda, J. Dzubiella, P.S. Cremer, P. Jungwirth, Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions, J. Phys. Chem. B. 121 (2017) 1997–2014. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b10797.
[42] B.L. Vallee, R.J.P. Williams, Metalloenzymes: The Entatic Nature of their Active Sites, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 59 (1968) 498–505.
[43] J. Stanek, A. Hoffmann, S. Herres-Pawlis, Renaissance of the entatic state principle, Coordination Chemistry Reviews. 365 (2018) 103–121. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.009.
[44] R.J.P. Williams, The Entatic State, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 36 (1972) 53–62. https://doi.org/10.1101/SQB.1972.036.01.010.
[45] L.B. LaCroix, S.E. Shadle, Y. Wang, B.A. Averill, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, 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. 118 (1996) 7755–7768. https://doi.org/10.1021/ja961217p.
[46] U.A. Zitare, J. Szuster, M.C. Santalla, M.E. Llases, M.N. Morgada, A.J. Vila, D.H. Murgida, Fine Tuning of Functional Features of the CuA Site by Loop-Directed Mutagenesis, Inorg. Chem. 58 (2019) 2149–2157. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03244.
[47] D. Alvarez-Paggi, U.A. Zitare, J. Szuster, M.N. Morgada, A.J. Leguto, A.J. Vila, D.H. Murgida, Tuning of Enthalpic/Entropic Parameters of a Protein Redox Center through Manipulation of the Electronic Partition Function, J. Am. Chem. Soc. 139 (2017) 9803–9806. https://doi.org/10.1021/jacs.7b05199.
[48] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins, Trends in Biochemical Sciences. 24 (1999) 8–11. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01335-8.
[49] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks, Trends in Genetics. 19 (2003) 415–417. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00167-7.
[50] C.J. Jeffery, Why study moonlighting proteins?, Frontiers in Genetics. 6 (2015). https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00211 (accessed April 18, 2022).
[51] C.J. Jeffery, Protein moonlighting: what is it, and why is it important?, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 373 (2018) 20160523. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0523.
[52] D.H.E.W. Huberts, I.J. van der Klei, Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1803 (2010) 520–525. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.
[53] C. Gancedo, C.-L. Flores, Moonlighting Proteins in Yeasts, Microbiology and Molecular Biology Reviews. 72 (2008) 197–210. https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-07.
[54] G. Wang, Y. Xia, J. Cui, Z. Gu, Y. Song, Y.Q. Chen, H. Chen, H. Zhang, W. Chen, The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria, Current Issues in Molecular Biology. 16 (2014) 15–22. https://doi.org/10.21775/cimb.016.015.
[55] D. Alvarez-Paggi, L. Hannibal, M.A. Castro, S. Oviedo-Rouco, V. Demicheli, V. Tórtora, F. Tomasina, R. Radi, D.H. Murgida, Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog, Chem. Rev. 117 (2017) 13382–13460. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00257.
[56] S. Oviedo-Rouco, C. Spedalieri, M.F. Scocozza, F. Tomasina, V. Tórtora, R. Radi, D.H. Murgida, Correlated electric field modulation of electron transfer parameters and the access to alternative conformations of multifunctional cytochrome c, Bioelectrochemistry. 143 (2022) 107956. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107956.
[57] L.A. Abriata, D. Álvarez-Paggi, G.N. Ledesma, N.J. Blackburn, A.J. Vila, D.H. Murgida, Alternative ground states enable pathway switching in biological electron transfer, PNAS. 109 (2012) 17348–17353. https://doi.org/10.1073/pnas.1204251109.

[58] U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, M.N. Morgada, L.A. Abriata, A.J. Vila, D.H. Murgida, Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in CuA Sites of Cytochrome c Oxidase, Angewandte Chemie International Edition. 54 (2015) 9555–9559. https://doi.org/10.1002/anie.201504188.
[59] J.R. Heath, Molecular Electronics, Annual Review of Materials Research. 39 (2009) 1–23. https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-082908-145401.
[60] N. Robertson, C.A. McGowan, A comparison of potential molecular wires as components for molecular electronics, Chem. Soc. Rev. 32 (2003) 96–103. https://doi.org/10.1039/B206919A.
[61] M. Taniguchi, T. Kawai, DNA electronics, Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures. 33 (2006) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.physe.2006.01.005.
[62] L. Zhang, J.R. Lu, T.A. Waigh, Electronics of peptide- and protein-based biomaterials, Advances in Colloid and Interface Science. 287 (2021) 102319. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102319.
[63] N.L. Ing, M.Y. El-Naggar, A.I. Hochbaum, Going the Distance: Long-Range Conductivity in Protein and Peptide Bioelectronic Materials, J. Phys. Chem. B. 122 (2018) 10403–10423. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b07431.
[64] K.D. Bewley, K.E. Ellis, M.A. Firer-Sherwood, S.J. Elliott, Multi-heme proteins: Nature's electronic multi-purpose tool, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1827 (2013) 938–948. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.03.010.
[65] C.A. Salgueiro, J.M. Dantas, Multiheme Cytochromes, in: C.A. Salgueiro, J.M. Dantas (Eds.), Multiheme Cytochromes, Springer, Berlin, Heidelberg, 2016: pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-642-44961-1_1.
[66] J.H. van Wonderen, D. Li, S.E.H. Piper, C.Y. Lau, L.P. Jenner, C.R. Hall, T.A. Clarke, N.J. Watmough, J.N. Butt, Photosensitised Multiheme Cytochromes as Light-Driven Molecular Wires and Resistors, ChemBioChem. 19 (2018) 2206–2215. https://doi.org/10.1002/cbic.201800313.
[67] J.H. van Wonderen, C.R. Hall, X. Jiang, K. Adamczyk, A. Carof, I. Heisler, S.E.H. Piper, T.A. Clarke, N.J. Watmough, I.V. Sazanovich, M. Towrie, S.R. Meech, J. Blumberger, J.N. Butt, Ultra-Fast Light-Driven Electron Transfer in a Ru(II)tris(bipyridine)-Labelled Multiheme Cytochrome, J. Am. Chem. Soc. (2019). https://doi.org/10.1021/jacs.9b06858.
[68] V. Tipmanee, H. Oberhofer, M. Park, K.S. Kim, J. Blumberger, Prediction of Reorganization Free Energies for Biological Electron Transfer: A Comparative Study of Ru-Modified Cytochromes and a 4-Helix Bundle Protein, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 17032–17040. https://doi.org/10.1021/ja107876p.
[69] B. Zhang, E. Ryan, X. Wang, W. Song, S. Lindsay, Electronic Transport in Molecular Wires of Precisely Controlled Length Built from Modular Proteins, ACS Nano. 16 (2022) 1671–1680. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c10830.
[70] H.T.S. Boschker, P.L.M. Cook, L. Polerecky, R.T. Eachambadi, H. Lozano, S. Hidalgo-Martinez, D. Khalenkow, V. Spampinato, N. Claes, P. Kundu, D. Wang, S. Bals, K.K. Sand, F. Cavezza, T. Hauffman, J.T. Bjerg, A.G. Skirtach, K. Kochan, M. McKee, B. Wood, D. Bedolla, A. Gianoncelli, N.M.J. Geerlings, N. Van Gerven, H. Remaut, J.S. Geelhoed, R. Millan-Solsona, L. Fumagalli, L.P. Nielsen, A. Franquet, J.V. Manca, G. Gomila, F.J.R. Meysman, Efficient long-range conduction in cable bacteria through nickel protein wires, Nat Commun. 12 (2021) 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24312-4.
[71] S. Monari, G. Battistuzzi, C.A. Bortolotti, S. Yanagisawa, K. Sato, C. Li, I. Salard, D. Kostrz, M. Borsari, A. Ranieri, C. Dennison, M. Sola, Understanding the Mechanism of Short-Range Electron Transfer Using an Immobilized Cupredoxin, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 11848–11851. https://doi.org/10.1021/ja303425b.
[72] M.N. Morgada, L.A. Abriata, U. Zitare, D. Alvarez-Paggi, D.H. Murgida, A.J. Vila, Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations, Angewandte Chemie International Edition. 53 (2014) 6188–6192. https://doi.org/10.1002/anie.201402083.
[73] C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, DNA Tile Based Self-Assembly: Building Complex Nanoarchitectures, ChemPhysChem. 7 (2006) 1641–1647. https://doi.org/10.1002/cphc.200600260.

[74] D. Yang, M.J. Campolongo, T.N. Nhi Tran, R.C.H. Ruiz, J.S. Kahn, D. Luo, Novel DNA materials and their applications, Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2 (2010) 648–669. https://doi.org/10.1002/wnan.111.
[75] D.M. Cardamone, G. Kirczenow, Single-molecule device prototypes for protein-based nanoelectronics: Negative differential resistance and current rectification in oligopeptides, Phys. Rev. B. 77 (2008) 165403. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.77.165403.
[76] C.D. Bostick, S. Mukhopadhyay, I. Pecht, M. Sheves, D. Cahen, D. Lederman, Protein bioelectronics: a review of what we do and do not know, Rep. Prog. Phys. 81 (2018) 026601. https://doi.org/10.1088/1361-6633/aa85f2.

Agradecimientos

Habiendo llegado a este punto en una sola pieza después de tanto esfuerzo además de sentir una gran alegría (y cansancio obvio!!!) me siento más que agradecido y en deuda con muchas personas. Antes que a nadie te quiero agradecer a vos Daniel por darle a este biólogo que llegaba tarde a todas tus clases de tópicos y (de cara rota) participaba de la clase como si nada hubiese pasado, la oportunidad de dar los primeros pasos científicos en tu laboratorio. No solo tuviste que enseñarme cosas desde cero, pues biólogo…sino que tuviste la paciencia (no siempre jaja) de darme el tiempo que necesitaba para llegar, entender, hacer, escribir, presentar, hacer el "click" y poder seguir el hilo y no quedarme atrás, apostando a que lo iba a lograr. Espero no haberte decepcionado! Te agradezco no solo por haberme llevado por el mejor camino ético-profesional que te caracteriza dejando tu impronta científica, sino también por todos esos consejos, café de por medio, que tanto me ayudaron en lo personal. Gracias por no echarme al segundo día (ni al décimo…) que te caí a laburar después del medio día!!! ¡Qué mejor gesto de confianza que ese! Por garantizar siempre, cueste lo que cueste, todas las condiciones se necesarias para hacer un doctorado con todas las letras, por ocuparte y por estar siempre presente y adoptarme en el *Copper Team*. En serio, ¡muchas gracias!

Quiero agradecerle muy especialmente a Uli por haberme adoptado como su hermano científico, habiéndose hecho cargo de la enorme e importante responsabilidad de formarme directamente ahí en el campo de batalla, armando electrodos… rompiendo electrodos, midiendo y procesando como si no hubiera mañana, siempre compartiendo ideas científicas y planificando experimentos para hacer en el futuro y ayudándome con todo en mi tesis! Motivándome todo el tiempo. Respondiendo todas las preguntas que le hacía sin parar (que denso que fui!), por enseñarme siempre con la mejor todo lo necesario para funcionar en el labo. Por todas las charlas y los buenos momentos dentro y fuera del labo. Fuiste como un hermano mayor y claramente jamás hubiese llegado hasta acá sin vos, y no solo estoy súper agradecido, sino que quedo en deuda.

Claro que en el proceso no solo los moleste a Daniel y a Uli, sino a todos aquellos que habían llegado antes que yo y decidieron dejar un poquito de ellos en mí. Gracias a Dofi por mostrarme que la forma de llegar es nunca bajar los brazos y darlo todo, gracias por mostrarme que se podían usar todos los equipos del labo al mismo tiempo (me vino re bien!). A Marian, que no sólo me regalo unas hermosas estructuras de proteínas que no querían cristalizar, sino por ser como nuestra madre científica, siempre con una sonrisa y bien predispuesta a ayudarte escucharte y aconsejarte. Quiero agradecerle a Damián que se hizo cargo de mi cuando Dofi y Uli estaban escribiendo sus tesis y seguir enseñándome cosas, pero ya más metalera la cosa. Gracias por mostrarme que no todo es saber las 8008884479… fórmulas que hay por ahí dando vueltas, sino que hay que ponerle corazón, garra, empuje a la cosa, y que siempre siempre es cuestión de " encontrarle la vuelta" a las cosas…,muchas gracias, porque gracias a eso llegamos hasta acá!

Otra persona súper especial e increíble que me ayudó muchísimo (y más de la cuenta) con mi tesis es Celes. Nuestra *padawan* científica. Lo lindo de esta etapa es que se aprende tanto de los mayores como de los menores, y si bien una de mis tareas era enseñarle lo que había aprendido, con Celes más de una vez fue al revés, volviéndome yo el aprendiz y ella la maestra. Sin vos esta tesis tampoco hubiese sido lo que es.

Quiero agradecerles a los chicos del labo, Lean y Santi, con quienes compartimos bien de cerca los terrores de arrancar un doctorado con tooodo lo que eso implica, uniéndonos para sobrevivir…¡literal! unión que genero buenos momentos y asperezas, por supuesto, pero de todo eso aprendimos. Quiero agradecerles porque de ellos también aprendí muchísimo y me apoyé mucho durante todos estos años. ¡Gracias chicos! Quiero agradecerle al resto de las personas que forman o formaron parte del grupo, Flor y Ceci, y a los más nuevitos que se fueron sumando estos últimos años Magui, Juanma, Celi, Sebas, Fran, Freddy y Lu por la buena onda y la calidez humana que inundó el labo dejando su granito de arena en la tesis y en mí.

Por supuesto un agradecimiento especial a Alejandro "Tato" Vila y su grupo, Marcos Alcho y Maru, la otra pata del "*Copper team*" con quienes se instauró una colaboración muy rica de la que aprendí mucho también. A Marcos por haberse ocupado de recibirme durante las estadías en el IBR y enseñarme los protocolos de expresión y purificación, y por sufrirlos conmigo todos los días de 9 a 22hs, por haber hecho de mi estadía una linda experiencia, a Alcho por tenerme paciencia infinita y contestar todas mis dudas sobre el sistema, por los espectros y parámetros de EPR que complementaron perfecto nuestro análisis, y por supuesto por las tantas charlas no científicas que siguen después. A Guille por enviarme las muestras.

Quiero extender mis agradecimientos a la gente del INQUIMAE, Ceci, Celes, Lucy, Lili, Nico, Mati, Mar, Yeral, y podría seguir todo el día….con quienes nos compartimos a diario, los viernes de torta y futbol, la cervecita después! A Leito por ayudarme con la tan dura QM y por enseñarme sus trucos matemágicos, y la buena onda para responder mis dudas de fq. A Yeral por haberme adoptado como su compinche y haberme introducido a su grupo de amigos, gente increíble con quien la pase siempre muy muy bien. A Vero, Mar y Sol que jamás tuvieron problema en prestarme material para dar clases en la facu en materias que jamás había cursado. A mis compañeros docentes con quienes da tanto gusto trabajar. A Santi Herrera y Fede Davia por darme una mano con la técnica de Creager. A los profes de cuántica, termo, teoría de grupos, electroquímica, por mantener ese nivel altísimo y hacerlo de una forma tan amena, realmente fue un placer haber cursado sus materias. Quiero agradecerle especialmente a Gabriel Gordillo por la buena onda cada vez que iba a su oficina a molestarlo con dudas de electroquímica. A Laría por ayudarme con cuántica y sacarme un poco de la rutina de la facu cuando lo necesite, ahora competimos a ver quién hace el *sprint* más rápido. A Clau, Naty, Andre y Ale, unas GENIAS TOTALESSS!!! Me han salvado las papas más de una vez con burocracia y siempre con la mejor onda! Estoy en deuda! A los técnicos Leo e Ignacio que siempre me salvaban las papas con los equipos! A Pedro que me manufacturo las camisas térmicas de las celdas para medir versus T, un genio! Un agradecimiento especial al personal de seguridad de la FCEN, en particular al turno noche que jamás me hicieron problema para quedarme trabajando más de la cuenta, y siempre atentos a que yo seguía en el laboratorio. Aunque ustedes no lo crean gran parte de esta tesis se midió a altas horas de la noche.

Quiero agradecer especialmente a tres personas que siento que determinaron senderos en mi vida académica que me llevaron hasta las puertas del labo de Daniel. A mi profe de biología del secundario Virginia Bompezzi, quien ya desde chiquito me inculco el amor por la ciencia, también dándome clases fuera de horario, *ad honorem*, de gran nivel. Gracias a eso me iba tan bien en las materias de biología y tuve tiempo de chusmear qué onda las de química. A Fabio Cukiernik por detectar mi interés por la química de forma temprana e incentivar a que tome cursos de la carrera de química, consejo que tome, y aquí estamos. Y a Dani Montes de Oca, que fue la que me sentó en una computadora y me obligó (pero bien!) escribirle a Daniel para empezar a trabajar en su labo como como pasante de grado.

Quiero agradecerle a Jean y Millie por haberme dado tanto amor durante los años más difíciles del doctorado. Gracias por haber hecho de nuestro hogar mi lugar favorito.

Finalmente, a mi familia, Mica, Carlos, Ana y la abu Flora. Claramente soy lo que soy gracias a ustedes, gracias por su gran esfuerzo, constante, que me permitió dedicarme al 100% en este sueño. Así que esta tesis es para ustedes. Los quiero mucho.