



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

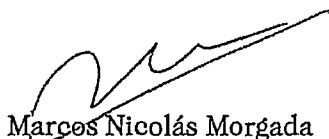
Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**Estudio Estructural e Interacción
Proteína-Proteína de Metalochaperonas
Mitocondriales**

Presentada por Marcos Nicolás Morgada

Rosario, Argentina
2016

“Estudio Estructural e Interacción Proteína-Proteína de Metalochaperonas Mitocondriales”



**Marcos Nicolás Morgada
Lic. en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Laboratorio de Metaloproteínas del Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2011 y el 12 de Febrero de 2016, bajo la dirección del Dr. Alejandro J. Vila.

MNH

Gracias Totales...

A Tato por haberme dirigido en este trabajo de tesis, preocuparse por mi formación científica y darme la libertad y aliento necesarios para alcanzar las diferentes metas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Formación Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a WWNMR por las becas y fondos para la realización de este trabajo.

A la facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, y al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) por facilitarme el lugar de trabajo y el uso de equipamiento.

A Jim por su buena onda constante y tener la solución a la mayoría de mis problemas.

A Dr. Daniel Murgida, Dr. Damián Alvarez-Paggi y Ulises Zitare por toda la ayuda desde la parte electroquímica de las proteínas. A la Prof. Lucia Banci, Dra. Chiara Cefaro, Dra. Karolina Gajda y Dr. Leonardo Gonnelli por la ayuda desde el CERM en los experimentos de transferencia de cobre. Al Dr. Carlos Brondino por la ayuda en la adquisición y procesamiento de los espectros de EPR. Al Dr. Kyle Lancaster por la adquisición y procesamiento de los experimentos de EXAFS.

Al copperteam Maru, Alcho, Andrés, a los que usan otro metal Rocío, Anto, Estefi, Agus, Leti, Guille, Lisandro, Mariano, Bruno, Pablo y a los vecinos, Paula, Irina Flor, Robi, Fito, Moshy. Gracias por la compañía, los afterlab y hacer que nunca pierda el poder de sorprenderme.

A los que se fueron pero compartimos buenos momentos Liana, Sory, Ogi, Nati, Georgette, Dani y Luciano. Gracias por darme una mano cuando lo necesitaba.

Un agradecimiento especial a Luciano por la ayuda en el arranque, las clases para adquirir espectros de RMN, pero sobretodo por haberme contagiado las ganas de trabajar con las proteínas de cobre y a Andrés por ser mi amigo y cómplice dentro del laboratorio.

A Anto por haberme bancado estos últimos años, escuchado mis problemas y darme fuerzas para continuar y terminar.

A mi familia, mis viejos, Belén, Martín, Juan Pablo, Mati, Lauri, tíos, primos y sobrinos, que a pesar de que nunca entendieron lo que hago, estuvieron y van a estar siempre conmigo así como yo con ellos.

A mis amigos de Sunchales que por suerte nunca preguntaron qué es lo que hago y siempre van a estar ahí cuando los necesite.

Y a los conocidos que me dio la vida con los que se armaron salidas, asados, partidos de fútbol, viajes que permitieron disfrutar la vida fuera del laboratorio.

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL COBRE EN LA CÉLULA	1
1.2. CITOCROMO C OXIDASA: ESTRUCTURA Y ENSAMBLADO	4
1.3. EL CENTRO Cu_A	7
1.4. ELECCIÓN DEL SISTEMA DE ESTUDIO	10
1.5. OBJETIVOS	12
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. PLÁSMIDOS, CEPAS, Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	14
2.1.1. <i>Plásmidos</i>	14
2.1.2. <i>Cepas</i>	15
2.1.3. <i>Medios de cultivo</i>	16
2.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	17
2.2.1. <i>Purificaciones de ADN plasmídico</i>	17
2.2.2. <i>Purificación de ADN a partir de geles de agarosa</i>	17
2.2.3. <i>Transformación de E. coli con plásmido superenrollado mediante tratamiento con CaCl_2</i>	17
2.2.4. <i>Transformación de E. coli con productos de ligación mediante tratamiento con CaCl_2</i>	18
2.2.5. <i>Digestión de ADN con endonucleasas de restricción</i>	18
2.2.6. <i>Reacciones de ligación</i>	19
2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO SOLUBLE DE LA SUBUNIDAD II DE LA COX BA3 DE THERMUS THERMOPHILUS, SILVESTRE O MUTANTE, EN FORMA METALADA O NO METALADA, SIN MARCA ISOTÓPICA.	19
2.3.1. <i>Sobreexpresión de proteínas TtCu_A y Tt3L</i>	19
2.3.2. <i>Purificación de proteínas TtCu_A y Tt3L en su forma Apo</i>	20
2.3.3. <i>Purificación de proteínas TtCu_A y Tt3L en su forma Holo</i>	21
2.3.4. <i>Expresión y purificación de la proteína TtCu_A y sus variantes mutagenizadas con marca isotópica uniforme en ^{15}N y/o ^{13}C o específica en ^{13}C Metil – L – Met.</i>	22
2.3.5. <i>Expresión y purificación del fragmento soluble de la proteína Sco1 de <i>Thermus thermophilus</i> sin marca isotópica</i>	22
2.3.6. <i>Expresión y purificación del fragmento soluble de las proteínas Sco1 y Sco2 humanas sin marca isotópica</i>	24

2.3.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	26
2.4. TÉCNICAS PARA EL MANEJO DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNA	26
2.4.1. Cuantificación de proteínas	26
2.4.2. Determinación del contenido de Cu de preparaciones de enzimas mediante PAR	27
2.4.3. Concentración de proteínas y cambios de solución amortiguadora mediante diafiltración	28
2.4.4. Titulaciones involucrando muestras de proteína con tioles libres	28
2.4.5. Titulaciones por pH	29
2.5. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	29
2.5.1. Espectros HSQC de correlación ^1H , ^{15}N	29
2.5.2. Experimentos y análisis de datos para la asignación de las resonancias de ^1H , ^{15}N y ^{13}C en Tt3L	31
2.5.3. Experimentos ajustados para la detección y asignación de señales paramagnéticas en ^1H	32
2.5.4. Experimentos ajustados para la detección y asignación directas de señales paramagnéticas ^{13}C	33
2.6. ESPECTROSCOPÍA ELECTRÓNICA	33
2.7. PROGRAMAS UTILIZADOS	34
CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE MODELO MÍNIMO DE COX II HUMANA	35
3.1. ANTECEDENTES Y ESTRATEGIA	35
3.2. PROTEÍNAS BASADAS EN EL ESQUELETO PROTEICO EUCARIOTA	39
3.3. PROTEÍNAS BASADAS EN EL ESQUELETO PROTEICO BACTERIANO	40
3.4. CLONADO DE LAS CONSTRUCCIONES	41
3.5. EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES QUIMÉRICAS DE COX II HUMANA	42
3.6. DISCUSIÓN	43
3.6.1. Sobre las quimeras inestables	43
3.6.2. Sobre la proteína Tt3L	44
CAPÍTULO 4. EFECTO DEL CAMBIO DE BUCLES EN LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DEL CENTRO Cu_A	46
4.1. ESTRUCTURA ELECTRÓNICA Y CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS SITIOS Cu_A	46
4.2. ESPECTROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE Tt3L	53
4.3. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA	56
4.4. EXAFS DE Tt3L	57

4.5. ASIGNACIÓN DE LAS SEÑALES HIPERDESPLAZADAS POR RMN.....	58
4.6. DEPENDENCIA CON LA TEMPERATURA DE LAS SEÑALES HIPERDESPLAZADAS.....	63
4.7. ELECTROQUÍMICA DE Tt3L.....	69
4.8. DISCUSIÓN.....	71
4.9. PERSPECTIVAS.....	73
4.9.1. Efecto de mutantes de primera esfera de Tt3L.....	73
4.9.2. Sobre la densidad electrónica en la Met axial.....	74
4.9.3. Sobre los caminos en las reacciones de TE.....	75
CAPÍTULO 5. EFECTO DEL PH EN LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DEL CENTRO CU_A.....	77
5.1. ESTRUCTURA ELECTRÓNICA EN FUNCIÓN DEL PH DE LA MUTANTE M160H DE TtCU _A	79
5.2. DEPENDENCIA DEL PH DE LAS SEÑALES DE HIS DE LA MUTANTE M160Q.....	82
5.3. DEPENDENCIA DEL PH DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE LA MUTANTE Tt3L.....	83
5.4. DISCUSIÓN.....	85
CAPÍTULO 6. ENSAMBLADO DEL CENTRO CU_A MITOCONDRIAL.....	87
6.1. ASIGNACIÓN DEL ESPECTRO HSQC DE LA PROTEÍNA Tt3L.....	91
6.2. TRANSFERENCIA DE CU(I) A PARTIR DE LA PROTEÍNA SCO1 HUMANA.....	95
6.3. TRANSFERENCIA DE CU(I) A PARTIR DE SCO1 DE <i>THERMUS THERMOPHILUS</i>	97
6.4. TRANSFERENCIA DE CU(I) DESDE LA PROTEÍNA SCO2 HUMANA.....	99
6.5. ACTIVIDAD TIOL DISULFURO-OXIDORREDUCTASA DE LAS PROTEÍNAS SCO.....	100
6.6. ACTIVIDAD OXIDORREDUCTASA Y METALOCAPERONA SEGUIDA POR RMN.....	104
6.7. DISCUSIÓN.....	106
6.7.1. De la actividad metalochaperona.....	106
6.7.2. De la transferencia de electrones.....	108
6.7.3. Del orden de interacción.....	109
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	110
CAPÍTULO 8. RESUMEN.....	112
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS.....	116
CAPÍTULO 10. PUBLICACIONES.....	142

Abreviaturas y Símbolos

COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
IP TG	Isopropil-Tio- β -D-Galactopiranosido
eq.	Equivalentes
TE	Transferencia electrónica
CT	Transferencia de Carga
S-S	Proteína con el par de Cys oxidadas formando puente disulfuro
2SH	Proteína con el par de Cys reducidos
λ	Energía de reorganización
ΔG°	Fuerza termodinámica impulsora de la reacción
H_{AB}	Acoplamiento electrónico entre A y B
IMS	Espacio intermembrana mitocondrial
σ_u^*	Orbital electrónico del centro Cu_A σ_u
π_u	Orbital electrónico del centro Cu_A π_u

Capítulo 1. Introducción

1.1. El cobre en la célula

El cobre es un metal de transición esencial para la supervivencia de la célula¹. Su esencialidad se debe a que es empleado por diferentes metaloproteínas para procesos fundamentales como la fosforilación oxidativa², la movilización del hierro intracelular^{3,4}, el *crosslinking* del tejido conectivo⁵, la formación de pigmentos⁶, la síntesis de catecolamina⁷ y como mecanismo de defensa en la respuesta oxidante bactericida. También tiene roles biológicos adicionales tales como participar en la respuesta inmune primaria⁸, y de hecho, su deficiencia en mamíferos favorece las posibilidades de infecciones bacterianas^{9,10} y de hongos¹¹. En las plantas, el cobre cumple un rol esencial en la fotosíntesis en cloroplastos como cofactor de plastocianina¹². Por estas razones, la deficiencia de cobre lleva a alteraciones muy graves en casi todos los organismos^{1,13}.

La posibilidad de adoptar dos estados de oxidación diferentes Cu(I) y Cu(II) con un potencial de reducción modulable en el rango de los eventos redox biológicos, lo hace un buen cofactor redox en muchas de las reacciones mencionadas^{14,15}. Sin embargo, esta misma propiedad hace que pueda desencadenar la producción de compuestos tóxicos, como los radicales hidroxilos, a través de la reacción de Fenton¹⁶⁻¹⁸. Por otro lado, los iones Cu(II) se encuentran por encima de otros metales dentro de la serie de Irving-Williams¹⁹, es decir que tienen el potencial de competir con otros cationes por sus sitios de unión nativos^{1,20}, propiedad compartida también con el Cu(I) que también presenta alta competitividad de unión a diversos sitios metálicos no nativos, con la concomitante pérdida de función de estas metaloproteínas²⁰. Por esta propiedad, el cobre es utilizado como un potente antimicrobiano, y algunas bacterias han desarrollado mecanismo de tolerancia a altos niveles de cobre^{21,22}.

En humanos, la ingesta de cobre en una dieta normal suele ser mayor a la cantidad necesaria para el cumplimiento de sus funciones. Debido a esta dualidad esencialidad/toxicidad, los niveles intracelulares de Cu tienen que estar extremadamente controlados de manera de que se disponga de los niveles

mínimos requeridos para la vida y al mismo tiempo minimizar los efectos tóxicos²³. A fines del siglo pasado, Valerie Culotta demostró que la Cu,Zn superóxido dismutasa (SOD) incorpora los iones cobre mediante la transferencia específica desde una proteína soluble, que denominó CCS (por sus siglas en inglés de *copper chaperone for SOD*)²⁴. Posteriormente, Culotta y Tom O'Halloran sugirieron que no existiría cobre libre en la célula, sino que el mismo se encontraría en todo momento unido a distintas proteínas o pequeñas moléculas que almacenan, transportan y entregan selectivamente este ion a las proteínas blanco²³. Estos estudios llevaron a la definición del concepto de metalochaperona²⁵.

A partir de estos hallazgos, se comenzaron a describir los mecanismos que regulan la homeostasis celular de distintos iones metálicos modulando la absorción, localización y excreción de los mismos de manera de minimizar las reacciones tóxicas¹. Estos mecanismos implican la regulación de los niveles de transportadores, compartimentalización de los iones²⁶⁻²⁸ y la síntesis de proteínas de unión a cobre como las metalotioneínas (capaces de unir el exceso de iones Cu(I))^{29,30}, o de proteínas metalochaperonas, cuyo papel es transportar los iones Cu(I) y llevar a cabo la activación de las proteínas blanco, que requieren cobre para su función^{31,32}.

En mamíferos en particular, el cobre es transportado a través del suero unido a albúmina o ceruloplasmina, de manera de asegurar que los niveles de cobre sean apropiados a nivel celular y de tejidos^{33,34}. Luego, el cobre ingresa a las células a través de los transportadores de tipo CTR (por sus siglas en inglés de *copper transporter family*) que lo reducen a Cu(I) mediante un mecanismo que todavía no es del todo comprendido (Figura 1)^{35,36}. Dentro de la célula, el cobre puede unirse como Cu(I) a glutatión (GSH), metalotioneínas (MT), o bien a las metalochaperonas CCS o ATOX 1, que tienen el rol de transportar el cobre a las proteínas blanco para su activación³⁷. CCS activa la Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD) al insertar el cobre en la proteína recientemente plegada, catalizando al mismo tiempo la formación de un puente disulfuro esencial para su función^{23,38}. ATOX1 entrega los iones Cu(I) a las ATPasas tipo P de Wilson y Menkes (ATP7A y

7B) que están localizadas en el trans-Golgi³⁹⁻⁴³. Estos transportadores transfieren los iones Cu(I) al lumen del Golgi empleando la energía de la hidrólisis de ATP⁴⁴. Dentro del Golgi, los iones cobre son incorporados a proteínas que se excretan como la tirosinasa⁴⁵, dopamina β -monooxigenasa⁷, superoxidodismutasa-3⁴⁶ o a proteínas de membrana como el transportador de hierro Fet3p^{47,48}. En caso de que haya un exceso de iones cobre estos transportadores también pueden ser translocados a través de la membrana para transportar iones fuera de la célula (Figura 1)⁴⁹.

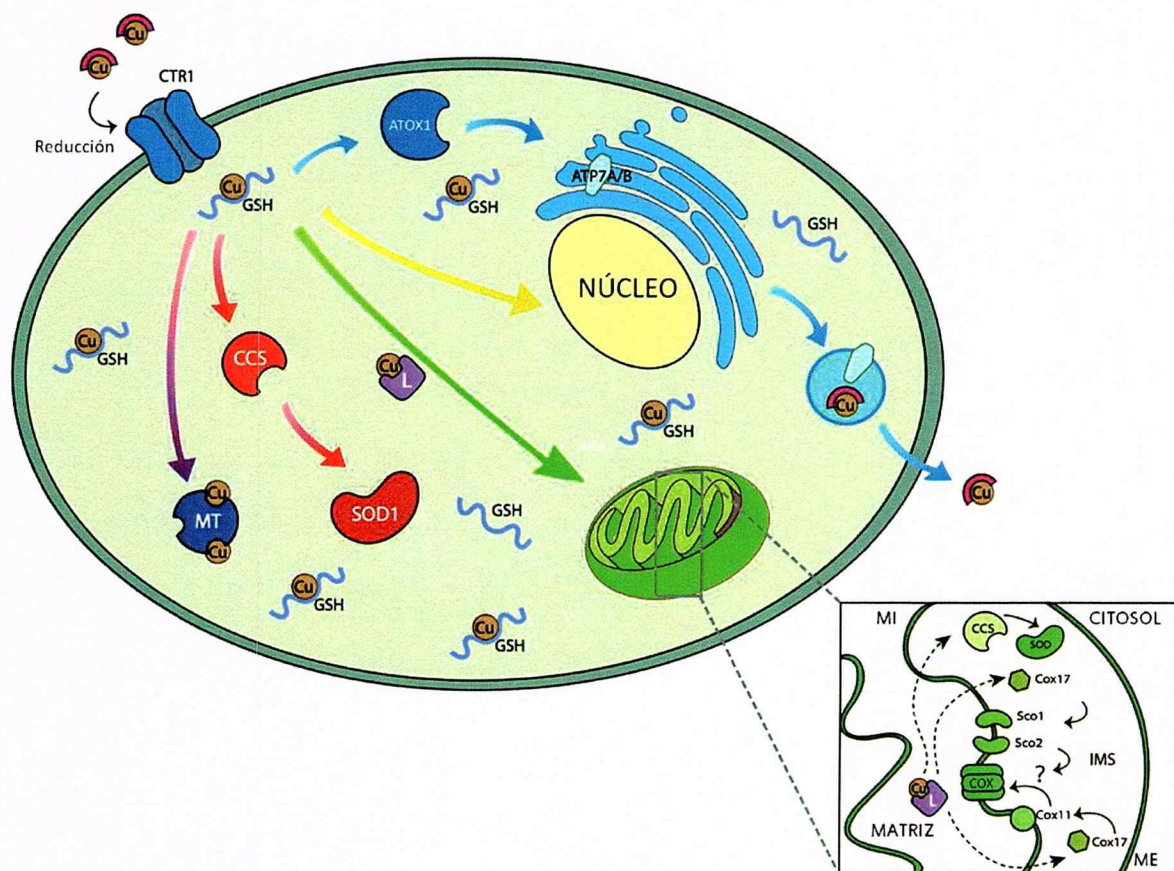


Figura 1. Diagrama que resume los mecanismos de transporte de Cobre intracelular en una célula de mamífero. En el recuadro se destacan los mecanismos de transporte de cobre mitocondriales para la incorporación de cobre a SOD y COX.

Dentro de la mitocondria, el cobre es necesario para la maduración de solamente dos enzimas: la Cu,Zn-SOD y la citocromo *c* oxidasa (COX)⁵⁰. SOD es encargada de eliminar el anión superóxido tóxico, que surge como subproducto no deseado de los procesos oxidativos; y la citocromo *c* oxidasa (COX) es la última

enzima (conocida como Complejo IV) de la cadena respiratoria mitocondrial, que realiza la reducción de oxígeno molecular a agua⁵¹.

Una particularidad de las metaloproteínas de unión a cobre, es que el ensamblado del sitio metálico no es co-transcripcional, sino que requiere el correcto plegamiento de las mismas para que ocurran los eventos de reconocimiento por parte de las metalochaperonas^{1,52}. Se ha propuesto que un pequeño complejo organometálico, CuL, sería el encargado de mover los iones cobre desde el citoplasma a la matriz mitocondrial para mantener el depósito mitocondrial necesario para su función (Figura 1)⁵³.

1.2. Citocromo c oxidasa: Estructura y ensamblado

La citocromo *c* oxidasa (COX) es una proteína integral de membrana, de complejidad variable de acuerdo al organismo. Las COX pueden comprender desde tres subunidades en bacterias^{54,55} hasta trece en el caso de eucariotas superiores (Figura 2)^{56,57}. Las subunidades COX I, COX II y COX III del complejo eucariota son de codificación mitocondrial y forman el centro catalítico del complejo (Figura 3)^{58,59}.

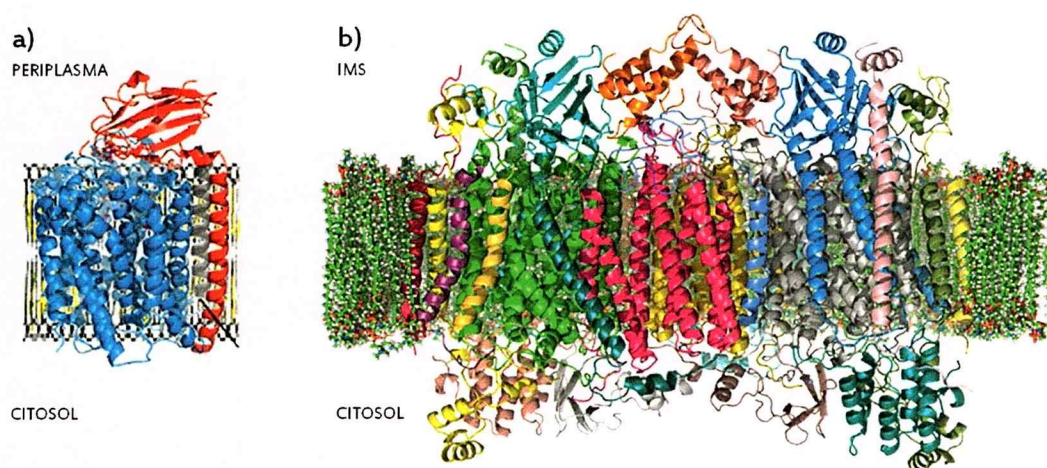


Figura 2. Comparación de las estructuras cristalográficas de los complejos COX de (a) *Thermus thermophilus* (PDB 1XME)⁶⁰ y (b) bovina (PDB 1OCC)⁵⁷.

Dos grupos hemo de tipo *a* y tres iones cobre están conservados dentro del dominio de COX I (*a*, *a*₃ y Cu_B) y COX II (Cu_A) (Figura 3)⁶¹, aunque en algunas oxidasas de otros organismos un hemo *a* está reemplazado por un hemo *b*^{54,60}. El sitio de cobre mononuclear Cu_B interactúa con el hemo *a*₃ formando un centro heterodimetálico hemo *a*₃-Cu_B que es el centro donde ocurre la reducción del oxígeno molecular en la oxidasa^{51,62}. El sitio Cu_A se encuentra en la subunidad COX II, y es un centro dimetálico con dos iones cobre unidos a puente mediante los tioles de dos residuos de cisteína (Figura 3). Este centro es el aceptor primario de electrones que provienen del citocromo *c* reducido, que luego son transferidos al hemo *a* presente en la subunidad COX I⁶³. Por lo tanto, la subunidad COX II está directamente involucrada en la interacción con el citocromo *c*, y el sitio Cu_A es esencial para la actividad de la citocromo *c* oxidasa, estando optimizado para llevar a cabo eficientemente reacciones de transferencia electrónica intra- e intermolecular⁶⁴.

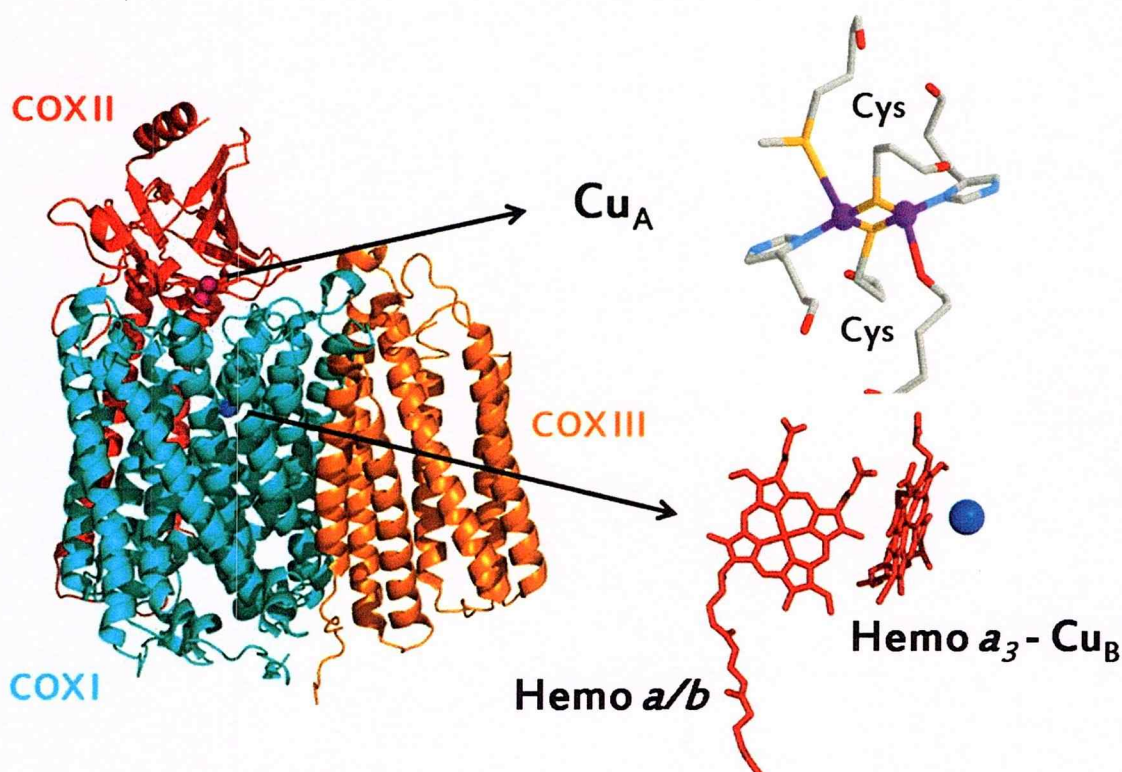


Figura 3. Subunidades mínimas funcionales de COX eucariota y cofactores metálicos esenciales para su función.

Este centro catalítico constituido por COX I, COX II y COX III está rodeado de otras subunidades de codificación nuclear que le brindan estabilidad al complejo y modulan su actividad⁶⁵. Las subunidades COX I y COX III están embebidas en la membrana, mientras que la subunidad COX II consiste en un dominio soluble expuesto anclado a la membrana mediante un segmento helicoidal (Figura 2 y 3). En el caso de COX mitocondriales, el complejo se inserta en la membrana interna mitocondrial, con la subunidad COX II orientada hacia el IMS (por las siglas en inglés de *Intermembrane Mitochondrial Space*). En cambio, en bacterias, este complejo se localiza en la membrana plasmática, con el dominio soluble de COX II orientado hacia el periplasma, de manera de acoplar la reducción del oxígeno molecular a la generación del gradiente protón-motriz para la producción de ATP^{57,66-68}.

Tanto SOD como las subunidades de citocromo c oxidasa mitocondrial requieren de mecanismos de transporte e inserción de cobre dentro de la mitocondria⁵⁰. El mecanismo de biogénesis y ensamblado de la COX en humanos requiere de al menos 40 genes que actúan en el proceso: 22 de ellos se requieren para la expresión e inserción a membrana de las tres subunidades catalíticas, cuatro para la biosíntesis e inserción de los grupos hemo, y nueve para el ensamblado de los sitios de cobre Cu_A y Cu_B, que codifican para distintas proteínas involucradas en este proceso⁵⁸.

Pacientes que sufren de deficiencia en citocromo c oxidasa presentan desordenes multi-sistémicos y tejido-específicos, principalmente en órganos con alta demanda energética, como el cerebro, corazón y el musculo esquelético⁶⁹⁻⁷³. Todos los genes involucrados en la inserción de hemo y cobre están conservados en levaduras y humanos. Esto ha permitido la identificación de estas proteínas mediante la comparación de estudios genéticos en levaduras, en pacientes con deficiencias en citocromo c oxidasa⁷⁴⁻⁷⁷. A pesar de esta conservación, las funciones de estas proteínas y su esencialidad no son las mismas en humanos y en levaduras^{75,78,79}.

Para el ensamblado del centro Cu_A se requiere la reducción de las Cys de unión a Cu para que luego una metalochaperona pueda transferir los iones cobre⁸⁰. En el sistema eucariota las proteínas esenciales para el ensamblado del sitio Cu_A son la proteína soluble Cox17, y las proteínas ancladas a membrana Sco1 y Sco2. Todas estas proteínas unen Cu(I) a través de residuos de Cys, Cox17 a través de dos Cys consecutivas y las proteínas Sco en un motivo Cys- X_3 -Cys, por lo que también pueden actuar como tiol-óxido-reductasas⁸¹⁻⁸³. Sin embargo, el papel específico de cada una de las mismas aún no está dilucidado.

1.3. El centro Cu_A

Cu_A es un centro de cobre dinuclear que actúa en la transferencia de electrones en metaloproteínas. Al momento, se ha encontrado solamente en la subunidad COX II de las citocromo *c* oxidasas de distintos organismos, y en la óxido nitroso (N_2O) reductasa bacteriana^{84,85}. Los dos iones Cu se encuentran unidos a puente por dos átomos de azufre provenientes de los tioles de dos residuos de Cys que se encuentran en un mismo bucle de la proteína. Cada ion cobre está unido además a un residuo de His y un residuo axial de coordinación débil: el grupo carbonilo del esqueleto peptídico y el tioéter de un residuo de Met (Figura 3). Esta geometría de coordinación está conservada en todos los sitios Cu_A conocidos al momento^{66,86,87}.

Cu_A presenta dos estados de oxidación biológicamente activos. En la forma reducida, $\text{Cu}^{+1}\text{-Cu}^{+1}$, es un centro diamagnético ($S=0$), mientras que la forma oxidada posee un electrón menos, dando lugar a un centro paramagnético ($S=1/2$) de valencia mixta de tipo III, es decir, con un electrón desapareado deslocalizado entre ambos iones Cu, por lo que cada átomo tiene la misma carga formal: $\text{Cu}^{+1,5}\text{-Cu}^{+1,5}$ ^{88,89}. Esta estructura electrónica ha sido propuesta en base a estudios de EPR, que muestran que el electrón desapareado presenta el mismo acoplamiento hiperfino con ambos núcleos de cobre, que por lo tanto son equivalentes⁹⁰. En cambio, la forma oxidada con un par de valencia mixta localizada (es decir, $\text{Cu}^{+1}\text{-Cu}^{+2}$) solamente ha sido observada en mutantes del sitio Cu_A ⁹¹. Finalmente, la forma $\text{Cu}^{+2}\text{-Cu}^{+2}$ no es viable naturalmente en ninguna de las proteínas que unen los sitios Cu_A .

Este centro de cobre es imprescindible para la respiración celular, dado que es el aceptor primario de electrones provenientes del citocromo *c* y luego transfiere estos electrones al grupo hemo *a* ubicado en la subunidad COX I. Es decir que actúa en reacciones de transferencia electrónica (TE) inter e intraproteicas, de a un electrón por vez, siendo que cada ciclo de reducción de una molécula de oxígeno requiere de cuatro electrones en total⁹². Estas reacciones las realiza con alta eficiencia a pesar de que tienen lugar a grandes distancias y en un medio de baja constante dieléctrica como el interior proteico (Figura 4)⁹³⁻⁹⁵.

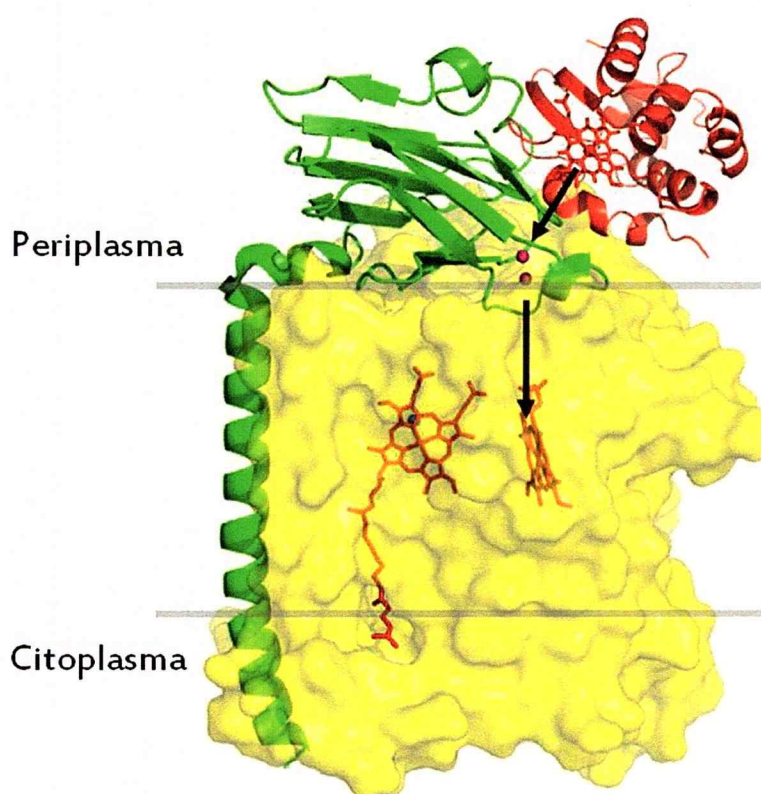


Figura 4. Reacciones de Transferencia Electrónica mediadas por el centro Cu_A . Transferencia desde el citocromo *c* soluble (Rojo) hacia COX II (verde) y de COX II hacia el grupo hemo *b* dentro de la región transmembrana de COX. Las líneas grises marcan los límites de la membrana.

Rudolph Marcus desarrollo una teoría que permitió describir mediante un enfoque semi-clásico la velocidad de las reacciones de transferencia electrónica (TE), lo que le valió el Premio Nobel de Química en 1992^{96,97}. Esta teoría ha sido aplicada con éxito para estudiar procesos de TE en sólidos, electrodos, pequeñas moléculas en solución y para reacciones de TE en sistemas biológicos⁹⁸⁻¹⁰⁰. De

acuerdo a esta teoría, la velocidad de transferencia electrónica (k_{TE}) se puede describir mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1-1

$$k_{TE} = \left(\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_B T} \right) |H_{AB}|^2 e^{\left[-\frac{(\Delta G^\circ - \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right]}$$

La k_{TE} depende de tres factores principales. H_{AB} representa el acoplamiento electrónico dador-aceptor a una determinada distancia. En el caso de proteínas, la transferencia electrónica a largo alcance no involucra solapamiento directo de orbitales entre el dador y el aceptor, por lo cual suele denominarse término de súper-intercambio^{101,102}. ΔG° es la fuerza termodinámica impulsora de la reacción, que depende de la diferencia en los potenciales de reducción entre el dador y el aceptor. λ es la energía de reorganización, vinculada con la energía libre de activación de proceso, que tiene en cuenta el reordenamiento de los núcleos cercanos al centro redox en los distintos estados de oxidación^{97,100}.

Según la Ecuación 1-1, la velocidad, k_{TE} , será máxima cuando $\lambda = -\Delta G^\circ$. Dado que las sucesivas reacciones de transferencia electrónica en una cadena tienen lugar con un $\Delta G^\circ \approx 0$, de modo de optimizar su eficiencia, la maximización de k_{TE} suele lograrse disminuyendo el valor de λ , lo que estructuralmente se traduce en la minimización de los cambios de geometría entre los estados oxidado y reducido del dador y el aceptor de electrones, es decir contando con sitios de TE rígidos. Por otra parte, un mayor acoplamiento electrónico (H_{AB}) también redundará en un aumento de la velocidad de transferencia electrónica.

En el caso del centro Cu_A , se ha postulado que el mismo tiene una alta eficiencia para la TE debido a una baja energía de reorganización (λ) y a su particular estructura electrónica. Harry Gray y colaboradores sugirieron que el valor bajo de λ es debido a que la estructura Cu_2-S_2 rómbica del sitio (Figura 3) provee una rigidez que resulta en una geometría idéntica en la formas reducida $Cu^{+1}-Cu^{+1}$ y oxidada $Cu^{+1,5}-Cu^{+1,5}$.¹⁰³ Por otro lado, el grupo de Ed Solomon ha sugerido que la estructura electrónica inusual del centro Cu_A en su estado oxidado

es debida a la alta covalencia de los enlaces S(Cys)-Cu, que favorecería un mayor acoplamiento electrónico (H_{AB}) a través de los ligandos de Cys para la transferencia electrónica a distancia^{102,104,105}. Sin embargo, el camino más corto para la transferencia electrónica a través del sitio Cu_A no tiene lugar a través de los residuos de Cys unidos a los iones cobre^{64,106,107}.

Nuestro grupo ha postulado recientemente que la estructura electrónica del sitio Cu_A en su forma oxidada puede ser descrita mediante dos niveles electrónicos de simetría σ_u y π_u^* en equilibrio a temperatura ambiente, que actuarían como dos estados fundamentales alternativos para la transferencia electrónica (Figura 5)¹⁰⁶. Hemos propuesto que este equilibrio, que puede modularse mediante ligeras perturbaciones, sería responsable de la alta eficiencia del centro en la transferencia electrónica a distancia^{106,108}. Este concepto se desarrollará en detalle en el Capítulo 4.

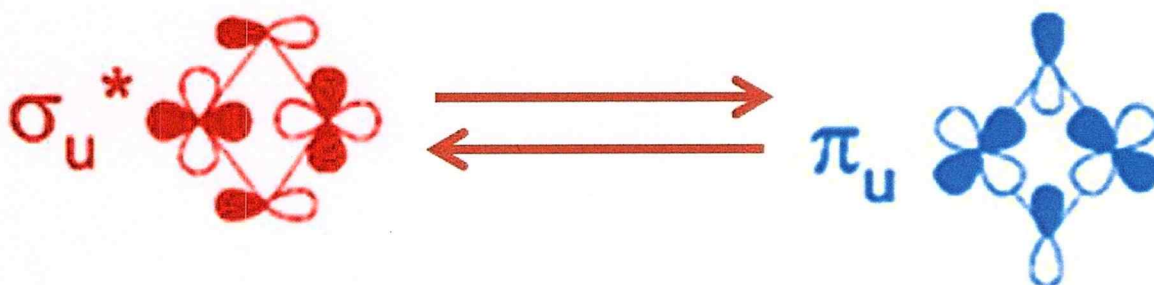


Figura 5. Diagrama esquemático de los orbitales atómicos del carozo Cu_2S_2 que dan lugar a los orbitales moleculares correspondientes a los niveles σ_u^* y π_u del centro Cu_A .

1.4. Elección del sistema de estudio

Los estudios espectroscópicos del centro Cu_A en las oxidasas completas se ven dificultados no solamente por tratarse de proteínas integrales de membrana, sino por el hecho de que la presencia de distintos cofactores metálicos, en particular los grupos hemo, oscurece las características de este sitio de cobre. Por otra parte, esto también dificulta la realización de estudios bioquímicos o biofísicos para estudiar *in vitro* el ensamblado del sitio metálico y la interacción con proteínas metalochaperonas. Este tipo de estudios, en cambio, pueden ser realizados si se dispone de una forma soluble y estable de la subunidad COX II,

que es relativamente pequeña (14-20 kDa) y posee solamente el cofactor metálico Cu_A. Sin embargo, casi todos los intentos de obtener una forma soluble de COX II provenientes de distintas oxidasas han sido fallidos.

Al momento solamente se ha logrado purificar en forma soluble las subunidades COX II de cuatro oxidasas bacterianas: *Bacillus subtilis*¹⁰⁹, *Paracoccus denitrificans*¹¹⁰, *Synechocystis* PCC 6803⁸⁶ y *Thermus thermophilus*⁶⁶. Nuestro grupo utiliza el dominio soluble de la subunidad COX II de la citocromo *c* oxidasa *ba₃* de la bacteria *Thermus thermophilus* como modelo de estudio del centro Cu_A. Esta subunidad ha sido utilizada para estudiar el efecto de mutaciones en la estructura electrónica y funcionalidad de este sitio metálico, el impacto del mismo en la estructura proteica, y el papel bioquímico de distintas metalochaperonas en su biogénesis^{66,80,106,111-119}. Esta proteína, al provenir de un organismo termófilo, presenta una alta estabilidad en solución y tolera un gran número de mutaciones.

Nuestro grupo, empleando este dominio soluble, pudo determinar que la proteína Sco1 de *Thermus thermophilus*, tiene actividad tiol-disulfuro oxidorreductasa sobre COX II y por lo tanto es la encargada mantener las Cys del centro Cu_A en su forma reducida, mientras que una proteína periplasmática PCu_AC es la encargada de transferir los iones Cu a la proteína COX II (Figura 6)⁸⁰. Se ha demostrado que las propiedades funcionales de las proteínas Sco se encuentran en sus dominios solubles y que la región transmembrana sólo tiene la función de anclaje de las mismas, por lo que trabajar con los dominios solubles de todas las proteínas involucradas en el proceso *in vitro* permite extrapolar los resultados al mecanismo *in vivo*⁷⁴.

Asimismo, la estructura electrónica del sitio Cu_A también ha sido estudiada en proteínas quiméricas en las cuales se ha reconstituido este sitio por ingeniería, como la quinol oxidasa de *Escherichia coli* (CyoA)¹²⁰, la proteína azul de cobre azurina de *Pseudomonas aeruginosa* (Cu_A-azurin)¹²¹, la proteína azul de cobre amicianina de *Paracoccus denitrificans*¹²² y de *Thiobacillus versutus* (Cu_A amicyanin)¹²³ y hasta en una proteína helicoidal¹²⁴. Sin embargo, solamente el

uso de subunidades solubles de oxidasas como sistema modelo permite estudiar interacciones con otras proteínas de manera confiable, y estas quimeras revisten valor solamente en función de la estrategia de ingeniería proteica de sitios metálicos. En este trabajo de Tesis, por lo tanto, se utiliza la subunidad soluble COX II de la oxidasa *ba₃* de *Thermus thermophilus*.

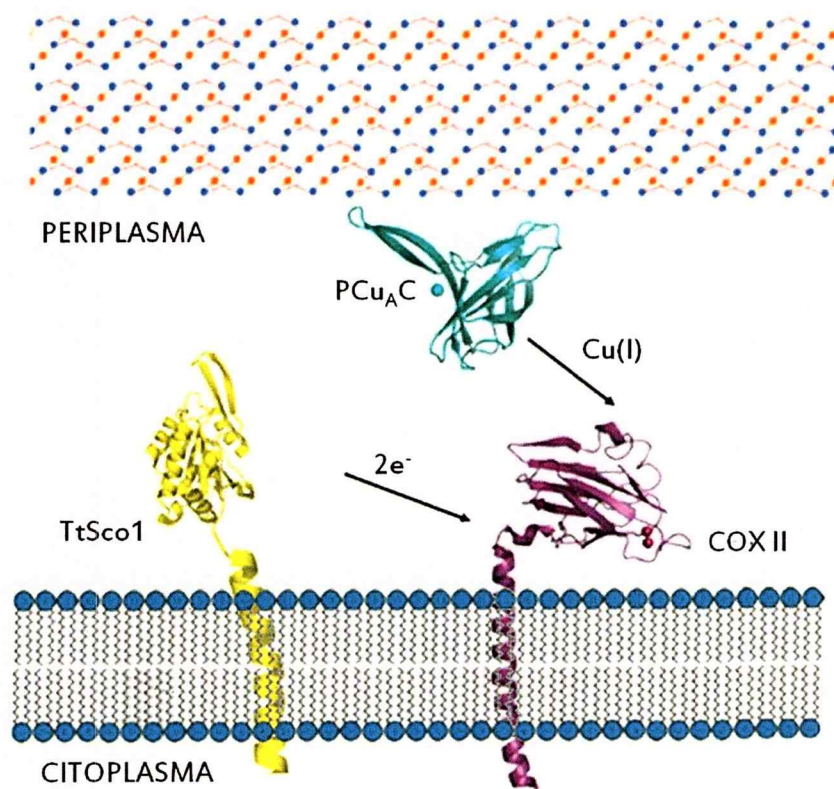


Figura 6. Diagrama del mecanismo de ensamblado del centro Cu_A en *T. thermophilus*. Sco1 tiene actividad tiol-disulfuro oxidorreductasa sobre COX II, para que PCu_AC pueda transferir los iones Cu(I) a la oxidasa.

1.5. Objetivos

El mecanismo bioquímico de ensamblado del centro Cu_A en bacterias pudo dilucidarse mediante el uso de la subunidad COX II de *Thermus thermophilus* (Figura 6). En cambio, el mecanismo de ensamblado del sitio Cu_A mitocondrial no había podido ser encarado debido a la ausencia de un sistema modelo que permitiera el estudio molecular de este proceso *in vitro*. Las proteínas Sco1 y Sco2 han sido identificadas como los últimos factores implicados en el

ensamblado del sitio Cu_A , pero su función específica, y por lo tanto el mecanismo bioquímico, es aún desconocido (Figura 7). Por lo tanto, en este trabajo de Tesis nos propusimos como **Objetivo Principal** dilucidar este mecanismo mediante el diseño de un sistema modelo que permita estudiar *in vitro* dicho proceso.

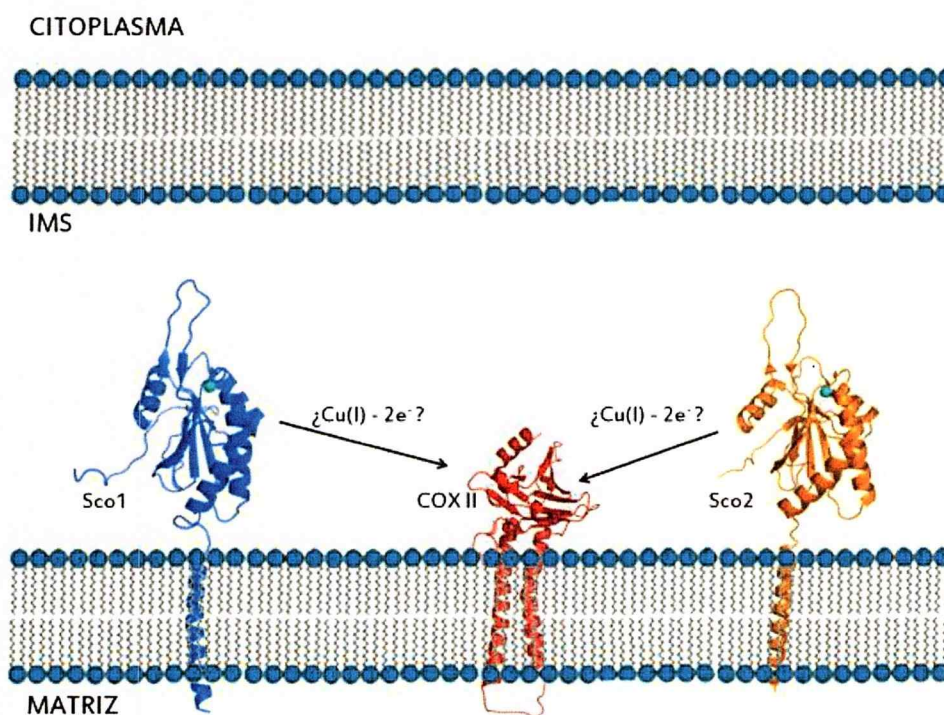


Figura 7. Posibles funciones de las proteínas Sco en el ensamblado del sitio Cu_A mitocondrial.

Para lograr el mismo, nos propusimos los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Obtener un modelo mínimo del dominio soluble de la proteína COX II humana, que se pueda expresar de manera soluble y estable;
- Estudiar por diferentes espectroscopías el centro Cu_A de esta proteína quimérica en su forma oxidada para evaluar su estructura electrónica; y
- Estudiar el rol de las posibles metalochaperonas Sco1 y Sco2 en el ensamblado del centro de Cu_A mitocondrial mediante técnicas bioquímicas y biofísicas a fin de poder asignar la función de cada una de ellas.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Plásmidos, cepas, y medios de cultivo utilizados

2.1.1. Plásmidos

- pET-9a-Cu_AWT-T9: Plásmido con cassette de resistencia a Kanamicina, presente en el laboratorio al comienzo de esta tesis, permite expresar el fragmento soluble de la subunidad II de la citocromo c oxidasa ba3 de *Thermus thermophilus* mediante un promotor específico para la ARN polimerasa del bacteriófago T7.

- Serie pET-9a-Cu_AM160X-T9: Plásmidos derivados del pET-9a-Cu_AWT-T9 que permiten expresar el fragmento soluble de la subunidad II de la citocromo c oxidasa ba3 de *Thermus thermophilus* con el residuo de Met160 sustituido por uno de los otros 19 residuos.

- pHisParallel2-*Tt*Sco1: Plásmido con cassette de resistencia a ampicilina, provisto por Dennis Winge (University of Utah), permite expresar el fragmento soluble de la proteína Sco1 de *Thermus thermophilus* mediante un promotor específico para la ARN polimerasa del bacteriófago T7. La proteína recombinante es expresada como fusión a una cola de His₆ seguida de un espaciador reconocido por la proteasa rTEV (del virus Etch de Tabaco). Esta cola de His₆ facilita la purificación y es eliminada por digestión con proteasa rTEV, disponible comercialmente y posible de producir en el laboratorio.

- Serie pUC-57-Quimeras: Plásmidos con cassette de resistencia a Ampicilina, conteniendo los genes sintéticos de las mutantes quiméricas comprados a la empresa GenScript.

- Serie pET-9a-Quimeras: Plásmidos derivados del pET-9a-Cu_AWT-T9 que permiten expresar las proteínas quiméricas correspondientes a los genes clonados dentro de los vectores pUC-57.

- Serie pET-G30a: Plásmidos con cassette de resistencia a Ampicilina provistos por el grupo de Lucia Banci (CERM-Universidad de Florencia), para la

expresión de los dominios solubles de las proteínas Sco humanas con fusión a GST-His₆ seguido de una secuencia de reconocimiento para la proteasa rTEV.

■ 2.1.2.Cepas

- *E. coli* JM109 (*recA1 endA1 thi hsdR17 (lacproAB)/F' traΔ36 (lacZ) M15 proAB*)

- *E. coli* DH5α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*)

- *E. coli* BL21(λDE3) (*fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS. λDE3 = λsBamHI ΔEcoRI-B int.:(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*). Esta cepa contiene el gen de la enzima ARN Polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por lactosa o por Isopropil-Tio-β-D-Galactopiranósido (IPTG).

Empleada para la sobreexpresión de las proteínas *TtCu_A*, *TtSco1* y proteínas quiméricas. Cuando esta cepa es transformada con un vector que contiene un promotor específico para la ARN Polimerasa de T7 se obtiene una cepa que puede expresar fuertemente el gen ubicado corriente abajo del promotor, de manera controlada: el experimentador decide en qué momento inducir la expresión, por agregado de IPTG o lactosa al medio de cultivo. En caso de trabajar con cultivos marcados con ¹³C, sólo debe utilizarse IPTG ya que la lactosa sería consumida por las bacterias introduciendo carbono no marcado a las rutas biosintéticas.

Debido a que el promotor utilizado es muy fuerte, una vez inducido éste, toda la energía de la célula se consume en la síntesis de la proteína recombinante. Por esto, la inducción debe ser realizada cuando el cultivo se encuentra en su fase exponencial de máximo crecimiento (dispersión óptica a 600 nm de entre 0,6 y 1 unidades, dependiendo de cada sistema).

- *E. coli* C41 (*F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)*) Cepa empleada para la sobreexpresión de la quimera Hs-i. Esta cepa contiene el gen de la enzima ARN Polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por lactosa o por IPTG.

- *E. coli* C43 (F – *ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm* (DE3)) Cepa empleada para la sobreexpresión de la quimera Hs-i. Esta cepa contiene el gen de la enzima ARN Polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por lactosa o por IPTG.

-*E. coli* Bl21-Gold (F- *dcm+ Hte ompT hsdS(rB- mB-) gal λ* (DE3) *endA Tet'*) Cepa empleada para la sobreexpresión de los dominios solubles de Sco1 y Sco2 humanas. Esta cepa contiene el gen de la enzima ARN Polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por lactosa o por IPTG.

-*E. coli* B834 (DE3) (*gal hsdS Bmet ompT*) cepa auxótrofa para Met empleada para la expresión de proteínas marcadas específicamente en ¹³C Metil – L – Met. Esta cepa contiene el gen de la enzima ARN Polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por lactosa o por IPTG.

2.1.3. Medios de cultivo

- Medio de cultivo líquido Luria-Bertani (Peptona de Caseína 1 %, Extracto de Levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %) y medio de cultivo sólido Luria-Bertani (Peptona de Caseína 1%, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %, 1 % agar-agar). Este medio fue utilizado para obtener muestras de proteína sin marca isotópica.

- Medio de cultivo líquido para marcaje uniforme con ¹⁵N y/o ¹³C: Se utilizó el medio mínimo M9 (KH₂PO₄ 84,4 g/L y KCl 6,32 g/L, llevado a pH 7,5 con NaOH) complementado con glucosa como fuente de carbono (4 g/L, marcada uniformemente en ¹³C cuando necesario) y ClNH₄ (1,0 g/L, marcado en ¹⁵N cuando necesario).

- Medio de cultivo líquido para marcaje uniforme con ¹³C Metil – L – Met: Se utilizó el medio mínimo M9, empleando glucosa sin marca isotópica como fuente de carbono (2 g/L) y (NH₄)₂SO₄ sin marca isotópica como fuente de nitrógeno (1,2 g/L), complementado con 50 mg/L de ¹³C Metil – L – Met.

- Métodos de selección: en cada caso, se agregó a los medios de cultivo el/los antibiótico/s correspondiente/s. Las concentraciones finales usadas fueron: ampicilina, 150 µg/ml; kanamicina: 50 µg/ml.

2.2. Técnicas de Biología Molecular y Purificación de Proteínas

2.2.1. Purificaciones de ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN plasmídico fueron realizadas utilizando el sistema comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification*[®] (Promega).

2.2.2. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Las purificaciones de ADN a partir de geles de agarosa fueron realizadas utilizando el sistema comercial *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

2.2.3. Transformación de *E. coli* con plásmido superenrollado mediante tratamiento con CaCl₂

La transformación de células de *E. coli* se realizó mediante el protocolo detallado a continuación:

1. Crecimiento durante 16hs a 37°C de una colonia de *E. coli* BL21(λDE3) en 2mL de medio líquido Luria-Bertani en agitación constante (180-250r.p.m.). (Cultivo 1)
2. Crecimiento durante 90 min a 37°C de dilución 1:100 de Cultivo 1 saturado en medio líquido Luria-Bertani fresco (10mL) en agitación constante (180-250r.p.m.). (Cultivo 2)
3. Fraccionado de Cultivo 2 en alícuotas de 1ml, usadas para transformaciones independientes.
4. Centrifugado durante 2 min a 1700r.c.f. a 4°C y descartado de sobrenadante
5. Resuspensión de pellet celular en 500μL de CaCl₂ 0,1M estéril, frío.
6. Centrifugado durante 2 min a 1700r.c.f. a 4°C y descartado de sobrenadante
7. Resuspensión en 100 μL de CaCl₂ 0,1M estéril, frío.
8. Agregado de 1μL de plásmido superenrollado (al menos 50ng/μL) e incubado en hielo durante 1h.
9. Choque térmico de 90 s a 42°C e incubado en hielo por 2 min.

10. Agregado de medio de recuperación SOC (300-1000uL (Tryptona 2%, Extracto de Levadura 0,5 %, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, Glucosa 20mM) e incubado por 1h a 37°C en agitación constante (180-250r.p.m.) para permitir la recuperación de las células.

11. Sembrado de 100 uL de las células en medio Luria-Bertani sólido suplido con el antibiótico correspondiente, de acuerdo al gen de resistencia presente en el plásmido con el que se transformó.

2.2.4. Transformación de E. coli con productos de ligación mediante tratamiento con CaCl₂

Se procede de igual manera que la para la transformación con plásmido superenrollado con sólo una diferencia en los pasos 7 y 8.

7'. Resuspensión de las células en 50uL de CaCl₂ 0,2M estéril, frío.

8'. Agregado de 50uL de producto de ligación e incubado en hielo durante 1h.

2.2.5. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Para la digestión de ADN plasmídico se emplearon enzimas de restricción de Promega o *FastDigest*[®] de Fermentas. Se utilizaron las condiciones de digestión recomendadas por cada proveedor.

Las reacciones de corte para chequeos se realizaron en un volumen final de 20 µL, utilizando 0,5 µL de la solución de enzima, 2 µL de ADN plasmídico (con una concentración aproximadamente 100 ng/µL) y 2 µL del medio de reacción 10X correspondiente.

Los cortes realizados con fines de clonado se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL, utilizando 10 µL de ADN plasmídico, 2 µL de solución de enzima y 5 µL del medio de reacción correspondiente. Para ambos casos, las digestiones se incubaron a 37°C durante 25 minutos (para las enzimas Fast Digest) o 2 horas (para enzimas Promega).

En el caso que fue necesario digerir una molécula de ADN con dos enzimas de restricción (*Bam*HI y *Nde*I), las mismas eran activas en el mismo medio de reacción, por lo que fue posible hacer un corte simultáneo con ambas enzimas

2.2.6. Reacciones de ligación

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Promega).

Se usó una concentración molar del fragmento 3 veces mayor a la del vector, para tratar de minimizar la religación del mismo, en un volumen final de 50 µl. Se realizaron controles de religación del vector, sin el agregado de inserto. Las reacciones se llevaron a cabo a 4 °C durante 16hs. En todos los casos se realizaron ligaciones direccionales. Para evaluar la eficiencia de corte de cada una de las enzimas de restricción empleadas y la eficiencia de la reacción de ligación, se realizaron pruebas de religado donde el vector se trató con una sola enzima de restricción. Este vector linealizado se sometió a la reacción de ligación y se realizó en paralelo un control sin ligasa.

2.3. Expresión y purificación del fragmento soluble de la subunidad II de la COX ba3 de *Thermus thermophilus*, silvestre o mutante, en forma metalada o no metalada, sin marca isotópica.

2.3.1. Sobreexpresión de proteínas *TtCu_A* y *Tt3L*

Para la sobreexpresión y purificación de las proteínas *TtCu_A* y *Tt3L* en su forma Apo-Reducida se procedió en primer lugar a transformar la cepa de *E. coli* BL21(λDE3) con el vector pET-9a correspondiente, de acuerdo al protocolo descripto en 2.2.3

1. Inoculado en 10mL de medio líquido Luria-Bertani suplido con kanamicina 50 µg/ml de una colonia transformante aislada y crecimiento durante 16hs a 37°C con agitación constante (180-250r.p.m.)
2. Inoculado de Cultivo 1 en 1L (erlenmeyer de 5-6L) de medio líquido Luria-Bertani suplido con kanamicina 50 µg/ml.

3. Crecimiento a 37°C con agitación constante (180-220r.p.m.) hasta alcanzar valor de densidad óptica a 600nm de entre 0,6-0,8 u.a.
4. Agregado de IPTG, concentración final 1mM.
5. Crecimiento a 30°C con agitación constante (180-220r.p.m.) durante 12-16hs.
6. Centrifugado de cultivo a 4000r.c.f. y descartado de sobrenadante.
7. Resuspensión del pellet celular en Tris 50 mM pH 8 (típicamente entre 30 y 40 mL de volumen final).
8. Congelado de células resuspendidas a -20°C.

2.3.2. Purificación de proteínas TtCu_A y Tt3L en su forma Apo

A partir de los cultivos con proteína sobreexpresada congelados a -20°C se procedió a la purificación de las proteínas Apo-Reducida siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descongelado de células y sonicado de la células en frío mediante 5-10 pulsos de 30s a una potencia de 40 Watts (Sonicador Branson modelo 250), con pausas de 60s entre pulsos para evitar sobrecalentamiento del lisado.
2. Centrifugado del lisado durante 30 min a 20000r.c.f., a 4°C.
3. Precipitación por calor del sobrenadante en baño termostatzado a 50-55 °C, durante 15 min.
4. Centrifugado por 30 min a 20000r.c.f. para eliminar proteínas precipitadas.
5. Precipitación de ADN mediante agregado de sulfato de estreptomicina (10mg/mL final, en frío).
6. Centrifugado por 30 min a 20000 r.c.f. para eliminar el ADN de la solución.
7. Fraccionamiento del sobrenadante con (NH₄)₂SO₄ al 50% (3,03g/10mL de solución de proteína) y descarte del sobrenadante.
8. Resuspensión del pellet conteniendo proteína precipitada en Tris 50mM pH 8 (típicamente en volumen de 5 a 10 mL).

9. Diálisis de la solución contra buffer fosfato de potasio 50 mM pH7,5 con DTT 1mM por un período mínimo de 2hs.
10. Sembrado en columna cargada con resina *Q-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare®) previamente equilibrada en el buffer de diálisis.
11. Elución y fraccionamiento de la proteína en buffer de diálisis en el frente de corrida.
12. Chequeo de las fracciones por SDS-PAGE y concentrado de las fracciones menos contaminadas a un volumen final de 5mL.
13. Sembrado en columna de exclusión molecular *Hiload-Superdex 75 16/600* (GE Healthcare®) empleando como buffer de corrida fosfato de potasio 100mM, KCl 100mM, DTT 1mM, pH6,0.
14. Concentrado de fracciones purificadas (0,5-1mM), congelado en nitrógeno líquido y guardado a -20°C.

En caso de necesitar emplear a las proteínas en su forma Apo-Oxidada, se evita el uso de DTT en las soluciones a partir del punto 9 y el fraccionamiento por exclusión molecular se lleva a cabo cuatro días luego del punto 12 para permitir la oxidación de las Cys por exposición al aire y eliminar, de formarse, dímeros indeseados de las proteínas $TtCu_A$ o $Tt3L$. El rendimiento fue de 35mg/mL.

2.3.3. Purificación de proteínas $TtCu_A$ y $Tt3L$ en su forma Holo

Partiendo de las células con proteína sobreexpresada como se explica en 5.III.A se procede según el siguiente protocolo:

1. Descongelado de células y sonificado de la células en frío mediante 5-10 pulsos de 30 s a una potencia de 40 Watts (Sonicador Branson modelo 250), con pausas de 60 s entre pulsos para evitar sobrecalentamiento del lisado.
2. Centrifugado del lisado durante 30 min a 20000r.c.f., a 4°C.
3. Precipitación de ADN mediante agregado de sulfato de estreptomicina (10mg/mL final, en frío).
4. Centrifugado por 30 min a 20000r.c.f. para eliminar el ADN de la solución.

5. Agregado de CuSO_4 a una concentración final 1M.
6. Fraccionamiento del sobrenadante con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% (3,03g/10mL) de solución de proteína y descarte del sobrenadante.
7. Resuspensión del pellet conteniendo proteína precipitada en Tris 50mM pH 8 (típicamente en volumen de 5 a 10 mL).
8. Diálisis de la solución contra buffer Acetato de sodio 50 mM pH5,0 por un período mínimo de 2hs.
9. Centrifugado de la solución y concentrado a un volumen final de 5mL.
10. Sembrado en columna de exclusión molecular *Hiload-Superdex 75 16/600* (GE Healthcare) empleando como buffer de corrida fosfato de potasio 100mM, KCl 100mM, DTT 1mM, pH6,0.
11. Concentrado de fracciones purificadas (0,5-1mM), congelado en nitrógeno líquido y guardado a -20°C .

El rendimiento fue de 35mg/mL.

2.3.4. Expresión y purificación de la proteína *TtCu_A* y sus variantes mutagenizadas con marca isotópica uniforme en ^{15}N y/o ^{13}C o específica en ^{13}C Metil - L - Met.

El protocolo de expresión y purificación empleado para la producción de proteína uniformemente marcada fue igual al descrito en la sección 3.III.A-C excepto por la composición del último medio de cultivo en 3.III.A, que según el tipo de marcado que se quiso obtener fue detallado en la sección 3.1.3. El rendimiento fue de entre 15 y 20 mg/L.

2.3.5. Expresión y purificación del fragmento soluble de la proteína *Sco1* de *Thermus thermophilus* sin marca isotópica

Se transformaron células de *E. coli* BL21(λ DE3) con el vector pHisParallel2-*TtSco1*, de acuerdo al protocolo descrito en 5.II.B. La purificación se realizó según el siguiente protocolo:

1. Inoculado en 10mL de medio líquido Luria-Bertani suplido con Ampicilina 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de una colonia transformante aislada y

- crecimiento durante 16hs a 37°C con agitación constante (180-250r.p.m.)
2. Inoculado de Cultivo 1 en 1L (erlenmeyer de 5-6L) de medio líquido Luria-Bertani suplido con Ampicilina 150 µg/ml.
 3. Crecimiento a 37°C con agitación constante (180-220r.p.m.) hasta alcanzar valor de densidad óptica a 600nm de entre 0,6-0,8 u.a.
 4. Agregado de IPTG, concentración final 1mM.
 5. Crecimiento durante 6-8hs. a 37°C con agitación constante (180-220r.p.m.).
 6. Centrifugado de cultivo a 4000r.c.f. y descartado de sobrenadante.
 7. Resuspensión del pellet celular en Tris 50 mM pH 8 (típicamente entre 30 y 40 mL de volumen final).
 8. Congelado de células resuspendidas a -20°C.
 9. Descongelado de las células al día siguiente y agregado de 0,2mg de ADNasa, PMSF a una concentración final de 1mM, y MgCl₂ a una concentración final de 5 mM.
 10. sonicado de la células en frío mediante 5-10 pulsos de 30 s a una potencia de 40 Watts (Sonicador Branson modelo 250), con pausas de 60 s entre pulsos para evitar sobrecalentamiento del lisado.
 11. Centrifugado del lisado durante 30 minutos a 20000r.c.f.
 12. Precipitado por calor del sobrenadante en baño termostatzado a 50-55 °C, durante 15 minutos
 13. Centrifugado del lisado durante 30 minutos a 20000r.c.f.
 14. Precipitación de ADN mediante agregado de sulfato de estreptomicina (10mg/mL final, en frío).
 15. Centrifugado del lisado durante 30 minutos a 20000r.c.f.
 16. Sembrado en columna cargada con resina Ni-NTA (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer TRIS 50mM, NaCl 200 mM, Glicerol 10%.
 17. Lavado con buffer de equilibrado (5-10 volúmenes de columna).
 18. Elución y fraccionamiento en gradiente hasta 100% de buffer de equilibrado con Imidazol 400mM (10 volúmenes de columna).

19. Análisis de las fracciones por SDS-PAGE. Fracciones enriquecidas en la proteína de fusión fueron colectadas juntas y se agrega DTT a concentración final 1mM y EDTA a concentración final 0,5mM.
20. Cuantificación por espectros de absorbancia de 340 a 240nm, empleando $\epsilon_{280nm}=10555M^{-1}cm^{-1}$ y procesadas con 1:50mg de proteasa rTEV.
21. Fraccionamiento y purificación mediante un nuevo paso de cromatografía de afinidad en matriz Ni-NTA empleando buffer Tris 50 mM pH 8, NaCl 200 mM, glicerol 10%.
22. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones. Agregado de DTT 1mM y concentrado de las fracciones de mayor pureza.

El rendimiento de estos protocolos de purificación promedió los 50 mg de proteína por litro de cultivo.

2.3.6. Expresión y purificación del fragmento soluble de las proteínas Sco1 y Sco2 humanas sin marca isotópica

Se transformaron células de *E. coli* BL21(λ DE3)-Gold con el vector pET-G30A-Sco1/2, de acuerdo al protocolo descrito en 5.II.B. La purificación se realizó según el siguiente protocolo:

1. Inoculado en 10mL de medio líquido Luria-Bertani suplido con Ampicilina 150 μ g/ml de una colonia transformante aislada y crecimiento durante 16hs a 37°C con agitación constante (180-250r.p.m.)
2. Inoculado de Cultivo 1 en 1L (erlenmeyer de 5-6L) de medio líquido Luria-Bertani suplido con Ampicilina 150 μ g/ml.
3. Crecimiento a 37°C con agitación constante (180-220r.p.m.) hasta alcanzar valor de densidad óptica a 600nm de entre 0,6-0,8 u.a.
4. Agregado de IPTG, concentración final 0,7mM.
5. Crecimiento durante 12-16hs. a 30°C con agitación constante (180-220r.p.m.).
6. Centrifugado de cultivo a 4000r.c.f. y descartado de sobrenadante.

7. Resuspensión del pellet celular en Tris 20 mM, NaCl 500mM, Imidazol 6mM, pH 8 (típicamente entre 30 y 40 mL de volumen final).
8. Congelado de células resuspendidas a -20°C.
9. Descongelado de las células al día siguiente y sonication de las células en frío mediante 10 pulsos de 30 s a una potencia de 40 Watts (Sonicador Branson modelo 250), con pausas de 60 s entre pulsos para evitar sobrecalentamiento del lisado.
10. Centrifugado del lisado durante 30 minutos a 20000r.c.f.
11. Sembrado *Hi-Trap Chelating* cargada con Zn^{+2} (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer Tris 20 mM, NaCl 500mM, Imidazol 6mM, pH 8
12. Lavado con buffer de equilibrado (5-10 volúmenes de columna).
13. Elución y fraccionamiento en gradiente hasta 100% de buffer de equilibrado con Imidazol 400mM (10 volúmenes de columna).
14. Análisis de las fracciones por SDS-PAGE. Fracciones enriquecidas en la proteína de fusión fueron colectadas juntas y se adiciona DTT a concentración final 1mM y EDTA a concentración final 0,5mM.
15. Cuantificación por espectros de absorbancia de 340 a 240nm, empleando $\epsilon_{280nm}=66615$ y $65125M^{-1}cm^{-1}$ para Sco1 y Sco2 respectivamente y procesadas 2hs. A Temperatura ambiente con 1:100mg de proteasa rTEV por mg de proteína de fusión.
16. Diálisis durante 2hs contra buffer Tris 20 mM, NaCl 500mM, pH 8
17. Fraccionamiento y purificación mediante un nuevo paso de cromatografía de afinidad en matriz Ni-NTA empleando buffer Tris 20 mM, NaCl 500mM, Imidazol 6mM, pH 8.
18. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones. Agregado de DTT 5mM y concentrado de las fracciones de mayor pureza.

El rendimiento de estos protocolos de purificación promedió los 50 mg de proteína por litro de cultivo.

MM

2.3.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las muestras de proteína fueron incubadas en solución de siembra (glicerol 5%, SDS 2%, , azul de bromofenol 0,1mg/ml) con el agregado de β -mercapto-etanol 0,1% o DTT 10mM en los casos que se requerían condiciones reductoras.

Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a máxima velocidad en microcentrífuga a temperatura ambiente. Las muestras y el marcador de masa molecular se sembraron en cantidades tales que las bandas contuvieran aproximadamente 1 μ g de proteína, en calles separadas de un gel de concentración (Poliacrilamida 4,5 % en Tris:HCl 0,126 M, pH 6,8, SDS 0,26 % (p/v)), el cual era seguido por un gel de separación (Poliacrilamida 16 %, Tris:HCl 0,36 M, pH 8, SDS 0,26 % (p/v)). El sistema de electroforesis empleado fue el Miniprotean III, de Biorad. La corrida se realizó utilizando como solución tampón una solución de Tris 0,3 % (p/v), glicina 1,44 % (p/v), y SDS 0,1% (p/v), aplicando una corriente constante de 35 mA. Luego de la corrida, los geles fueron fijados durante 10 minutos con una solución de etanol:ácido acético:agua (25:10:75), y teñidos durante 30 minutos con una solución de azul de Coomassie R250 al 1 % (p/v) en etanol:ácido acético:agua (50:10:40). La decoloración del gel se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con etanol:ácido acético:agua (25:10:75)83 o mediante lavados con agua a 100°C.

2.4. Técnicas para el manejo de las muestras de proteína

2.4.1. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada a partir de espectros de absorción electrónica. Para muestras de Cu_A , el espectro se registró entre 240 y 1300nm sobre alícuotas de proteína metalada. Esto permitía controlar el estado de la proteína en lo que respecta al contenido de metal a partir de la relación de absorbancias a 280 nm y 480 nm (que debe ser de 7,5-10 según la proteína). Para muestras de TtCu_A y mutantes M160X se usó un $\epsilon_{280\text{m}}$ de 20000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para la proteína Tt3L 20065 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para muestras de proteína Sco, el espectro se registró entre 240 y 340 nm, y la concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm y aplicando un coeficiente de extinción molar de $10555 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para *TtSco1*, $20525 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para *Sco1* y $19035 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para *Sco2*.

Estos coeficientes fueron calculados a partir de la secuencia primaria de la proteína¹²⁵.

2.4.2. Determinación del contenido de Cu de preparaciones de enzimas mediante PAR

El 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR) es un compuesto quelante de cationes divalentes que posee la propiedad de modificar sus propiedades espectrales frente a la unión de metales.

En su forma libre posee un máximo de absorción a 414 nm, mientras que al estar unido a Cu(II) el mismo se ubica a 515 nm. Las muestras para la cuantificación de Cu se prepararon con una concentración final de proteína de 3 y $6 \mu\text{M}$ en un medio conteniendo cloruro de guanidinio 4M, PAR $100 \mu\text{M}$ y Hepes 10mM pH 7,5 .

Se realizó un blanco con la misma composición a excepción de la proteína. Luego de 5 minutos de incubación, se registró el espectro de absorción de cada muestra entre 300 y 600 nm, y a cada uno se le restó el espectro correspondiente a la solución blanco.

Para asegurarse que todo el Cu se encuentre en el estado de oxidación Cu(II), las muestras fueron hervidas durante 10min y se repitieron los espectros de absorción.

Para realizar la cuantificación se realizó una curva de calibración en el rango de concentraciones de Cu(II) de 0 a $20 \mu\text{M}$, a partir de la cual se interpoló la concentración de Cu correspondiente al valor de absorbancia diferencial observado a 515 nm para la muestra. Para calcular el número de iones Cu por molécula de proteína se dividió la concentración de éstos por la de la proteína empleada.

2.4.3. Concentración de proteínas y cambios de solución amortiguadora mediante diafiltración

Para concentrar soluciones de proteína se utilizaron dispositivos de diafiltración Centricon® (EMD Millipore) con un valor de corte de 10 kDa, en sus versiones de 4 o 15 ml según el volumen de trabajo.

Para cambiar los buffers de las distintas proteínas se procedió empleando cuatro alternativas diferentes según el trabajo a realizar.

1. Cambio de buffer mediante diálisis, empleando tubos de diálisis (Sigma-Aldrich) de corte 12kDa, empleando al menos 100 volúmenes de buffer de diálisis.
2. Cambio de buffer por diafiltración, empleando los concentradores amicon, las muestras se concentran hasta un volumen de 200-400uL y se agregan 10-20 volúmenes del buffer de experimentación. Este procedimiento se repite 3-4 veces para asegurar el correcto cambio de buffer.
3. Cambio de buffer por desalado, empleando columnas *PD-10 desalting* o *16/100 desalting* (GE Healthcare). Las columnas fueron equilibradas con el buffer de experimentación, luego se sembró la solución de proteína concentrada en un volumen adecuado según la columna (<2,5mL para PD-10 y <10mL para 16/100 desalting). La proteína eluye en el frente de corrida quedando en el buffer de experimentación.
4. Cambio de buffer por liofilizado y resolución en buffer de experimentación. Para realizar este procedimiento en primer lugar las muestras fueron pasadas a buffer acetato de amonio pH7.0 mediante desalado. Luego fueron liofilizadas y resuspendidas en el buffer de experimentación.

2.4.4. Titulaciones involucrando muestras de proteína con tioles libres

En las titulaciones que involucraron muestras de proteína con tioles libres, estas fueron siempre manipuladas en atmósfera reductora (mezcla de N₂:H₂ 95:5) dentro de una caja de anaerobiosis conteniendo 2 catalizadores de paladio para la

eliminación de cualquier traza de oxígeno presente en el ambiente por reacción con hidrógeno.

Las soluciones de trabajo fueron desoxigenadas mediante venteo nitrógeno gaseoso durante 12-16hs en agitación a temperatura ambiente, en botellas selladas con septos de goma.

2.4.5. Titulaciones por pH

Las titulaciones por pH fueron realizadas sobre muestras preparadas en buffer TAPS, que consiste en Tris, Acetato y Fosfato en concentración de 50 mM cada uno, con 100 mM de KCl como amortiguador de cambios en la fuerza iónica. Este buffer permite trabajar en un rango de pH de 3 hasta más de 11.

2.5. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) realizados en Rosario se registraron en un equipo Bruker Avance II 600 (frecuencia de protón de 600,13 MHz), mientras que los adquiridos en el Centro de Resonancia Magnética de Florencia, Italia, fueron obtenidos mediante equipos Bruker Avance II y Avance III con campos de 500, 600, 900 y 950 MHz (frecuencia de ^1H). Las muestras de proteína fueron siempre preparadas en el buffer apropiado para cada una, con una concentración total de sal de hasta 200 mM y entre 10% y 100% de D_2O .

2.5.1. Espectros HSQC de correlación ^1H , ^{15}N

El experimento HSQC (por sus siglas en inglés *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) resulta en un espectro bidimensional con un eje para el desplazamiento químico de ^1H y otro para el desplazamiento químico de un heteronúcleo, comúnmente ^{13}C o ^{15}N . El espectro presenta una señal para cada par de núcleos ^1H -X que se encuentren unidos por un enlace.

Básicamente, este experimento comienza con la excitación de las resonancias de ^1H , luego la magnetización es transferida mediante un INEPT modulado por 2J al heteronúcleo, donde evoluciona generando la dimensión

indirecta. Un segundo INEPT devuelve la magnetización a las coherencias detectables de ^1H y la dimensión directa es adquirida.

En particular, el experimento HSQC donde el heteronúcleo es ^{15}N y se ajusta los pasos de INEPT a un 2J de 90 Hz (igual a la constante de acoplamiento promedio entre H y N peptídicos) resulta en un experimento ^1H - ^{15}N HSQC que presenta la correlación entre el núcleo de ^1H y el de ^{15}N de cada enlace peptídico de la proteína. Si las moléculas de proteína de la muestra están bien plegadas y la proteína no es excesivamente grande, estos crosspeaks resultan relativamente angostos y dispersos, de manera que se observa prácticamente uno por cada residuo de la proteína (exceptuando los residuos de prolina que carecen de H amídico, y aquellos residuos de regiones muy móviles).

Los espectros ^1H , ^{15}N HSQC pueden registrarse sobre muestras de proteína enriquecidas en ^{15}N con buena resolución y alta relación señal:ruido en tiempos relativamente cortos, aún a concentraciones no muy altas, rondando los 10-40 minutos la adquisición de un espectro con buena resolución en la dimensión indirecta y alta relación señal:ruido sobre una muestra de proteína de concentración 300 μM en un equipo de 600 MHz sin criosonda. La posibilidad de extraer información a nivel de residuos y la velocidad con que se pueden adquirir y procesar estos espectros, sumado al relativamente bajo costo de producir proteínas enriquecidas en ^{15}N , hace de estos experimentos ideales para seguir titulaciones con ligandos pequeños e inclusive con otras proteínas, para estudiar el efecto del pH, temperatura o fuerza iónica sobre una proteína o sobre complejos de proteínas, para controlar el estado de las muestras antes de otros estudios más complejos, costosos y largos, etc.

Para registrar estos espectros se emplearon las secuencias HSQC ECHO / ANTIECHO (programa hsqcetf3gpsi de Bruker) implementadas en una sonda TXI con un pulso de ^1H de entre 9 y 11 μs a 10 W, se empleó un tiempo de espera entre repeticiones de 1 segundo con 128 – 256 puntos de resolución en la dimensión indirecta, y 1024 puntos en la dimensión directa. El número de acumulaciones varió entre 4 y 96 según la concentración de la muestra (Tabla 1),

típicamente entre 200 y 1000 μM . Para registrar y procesar estos espectros se utilizó el programa TopSpin de Bruker (versiones 1.3 a 2.1). El análisis fue llevado a cabo empleando mayormente el programa CCPNmr¹²⁶.

Tabla 1. Parámetros empleados para los espectros HSQC en las titulaciones con las proteínas Cu(I)-Sco

Espectro	Cu(I)-Sco	$^1\text{H}^{*\diamond}$	$^{15}\text{N}^{**}$	NS
1	0	16ppm, 1024 (1024)	30ppm, 256 (128)	8
2	0,5	16ppm, 1024 (1024)	30ppm, 256 (128)	16
3	1	16ppm, 1024 (1024)	30ppm, 256 (128)	48
4	2	16ppm, 1024 (1024)	30ppm, 256 (128)	96

*Se muestra el ancho espectral, los puntos reales adquiridos los empleados en el procesamiento del espectro entre (). $\diamond$ Centrado a 4,7ppm. **Centrado a 119ppm.

2.5.2. Experimentos y análisis de datos para la asignación de las resonancias de ^1H , ^{15}N y ^{13}C en Tt3L

Con el fin de asignar las señales de ^1H , ^{13}C y ^{15}N del esqueleto peptídico de Tt3L se adquirieron los espectros tridimensionales HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB, CBCA(CO)NH. Todos estos espectros fueron adquiridos a 298 K en un equipo de 600 MHz equipado con una sonda de triple resonancia TXI empleando los parámetros detallados en la Tabla 2. Para adquirir y procesar estos espectros se utilizó el programa TopSpin versión 2.1 de Bruker; y para analizarlos se utilizó el programa CARA¹²⁷.

Tabla 2. Parámetros de adquisición empleados para los espectros de asignación de la proteína Tt3L

Experimento	Secuencia de pulso	$^1\text{H}^*$	$^{15}\text{N}^*$	$^{13}\text{C}^*$	NS
HNCO	hncogp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 50 (128)	17ppm, 144 (256)	8
HN(CA)CO	hncacogp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 50 (128)	17ppm, 110 (256)	24
HN(CO)CA	hncocagp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 44 (128)	32ppm, 100 (256)	16
HNCA	hncagp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 40 (128)	32ppm, 96 (256)	16
CBCA(CO)NH	cbcaconhgp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 46 (128)	80ppm, 110 (256)	16
HNCACB	hncacbgp3d	16ppm, 1024 (1024)	32ppm, 46 (128)	80ppm, 128 (256)	32

*Se muestra el ancho espectral, los puntos reales adquiridos los empleados en el procesamiento del espectro entre ()

2.5.3. Experimentos ajustados para la detección y asignación de señales paramagnéticas en ^1H

Todos estos experimentos fueron realizados en un equipo de 600,13 MHz (frecuencia de ^1H) equipado con una sonda TXI, con un pulso de 90° en el canal de ^1H de entre 7 y 9 μs a 20 W. Los espectros de ^1H ajustados para la detección de señales paramagnéticas entre 35 y 10 ppm fueron adquiridos mediante presaturación de la señal de agua en una ventana de 48 kHz con un tiempo de reciclo total de 100-200ms.

Los espectros ajustados para la detección de señales de las señales más alejadas de la región diamagnética fueron adquiridos mediante la secuencia SuperWEFT¹²⁸ (*Water Elimination Fourier Transform*, cuya secuencia de pulsos $\text{D0} - \pi - \text{Drec} - \pi/2 - \text{Adquisición}$ intenta cancelar las señales de relajación lenta) en una ventana de 360 kHz con un período de recuperación (Drec) de 5 ms y un tiempo de reciclo total de 40 ms. En otras ocasiones se utilizó para adquirir estos espectros la secuencia PASE¹²⁹ (*PAramagnetic Signals Enhancement*, la cual preirradia con un pulso selectivo toda la zona diamagnética saturando estas señales) con una potencia de irradiación selectiva de alrededor de 0,25 W.

Los espectros ^1H , ^{13}C y ^1H , ^{15}N HMQC fueron adquiridos en ventanas espectrales de 50 kHz en la dimensión de ^1H (con 1024 puntos de resolución) y 100 kHz en la dimensión indirecta (64-128 puntos). El tiempo requerido para la transferencia de magnetización fue ajustado al T_2 efectivo ($1/\Delta\nu/2$) promedio de las señales de ^1H , es decir cerca de 2 ms, y el tiempo de relajación utilizado fue de 30ms¹³⁰. Varios experimentos fueron registrados, variando la frecuencia central de irradiación en el canal del heteronúcleo intentando excitar diferentes transiciones. Los experimentos de Transferencia de Saturación y de NOE sobre las señales de los protones β de Cys fueron realizados sobre muestras disueltas en soluciones amortiguadoras preparadas en D_2O al 100%. La proteína se encontraba totalmente oxidada para los experimentos de NOE y parcialmente reducida para los experimentos de transferencia de saturación (10% de proteína reducida mediante el agregado de una cantidad apropiada de ascorbato de sodio). Todos estos experimentos fueron adquiridos con el diseño experimental previamente

reportado^{110,131}, irradiando la señal de interés por 50 ms con una potencia de 5 mW. El tiempo de relajación fue ajustado a 10 ms.

2.5.4. Experimentos ajustados para la detección y asignación directas de señales paramagnéticas ¹³C

Todos estos experimentos fueron realizados en un equipo Bruker Avance II de 600,13 MHz (frecuencia de ¹H) equipado con sonda BBO sintonizadas a la frecuencia de cada núcleo estudiado. Se utilizó un pulso de excitación de 6,9 µs a 88,67 W de potencia. Las resonancias de los protones fueron desacopladas durante la adquisición de los espectros de ¹³C. Diferentes espectros fueron registrados localizando la frecuencia central de irradiación en diferentes posiciones, para lograr observar todas las señales. La ventana espectral y el tiempo de recuperación también fueron variados, resultando en tiempos de reciclo total de entre 35ms (para las señales más anchas) y 300ms. Los experimentos de transferencia de saturación en ¹³C fueron realizados sobre muestras disueltas en soluciones amortiguadoras preparadas en D2O al 100%. La proteína se encontraba totalmente oxidada para los experimentos de NOE y parcialmente reducida para los experimentos de transferencia de saturación (10% de proteína reducida mediante el agregado de una cantidad apropiada de ascorbato de sodio). Estos espectros fueron adquiridos con la misma secuencia de pulsos utilizada para protones, adaptada al canal de X de la sonda BBO, irradiando durante 40 ms con una potencia de entre 0,1 y 5 mW. El tiempo de relajación fue ajustado a 10 ms.

2.6. Espectroscopía Electrónica

Los espectros de absorción UV-Visible se realizaron en espectrofotómetros Jasco V-550, Jasco V-530 y Jasco V-670. Este último equipo permite barrer desde 200 hasta 2700 nm.

Los espectros de dicroísmo circular en la región UV se realizaron en un espectropolarímetro J 810 (Jasco). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm o 0,1 cm de paso óptico según la concentración de la muestra. Los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica de banda X fueron registrados en un equipo Bruker EMX-Plus equipado con una cavidad rectangular y un criostato de flujo continuo (Oxford Instruments), a Temperaturas de He líquido.

2.7. Programas utilizados

Todos los espectros de RMN fueron adquiridos y procesados con el programa TopSpin (versiones 1.3, 2.0 o 2.1) (Bruker). Los espectros paramagnéticos fueron analizados en este mismo programa mientras que los espectros ^1H , ^{15}N HSQC fueron analizados con Sparky y los experimentos 3D fueron analizados con CCPNmr.

El programa de ajuste a los datos de desplazamiento químico en función de la temperatura fue implementado en Matlab versión 7.0 (Mathworks). Los ajustes con una variable independiente y los gráficos numéricos fueron realizados utilizando Sigma Plot versión 10.0.

Los datos de EPR fueron analizados y simulados empleando el paquete de herramientas *Easy spin*¹³² basado en Matlab.

Los gráficos de moléculas de proteínas fueron creados con el programa PyMOL (versión 0.96).

3.1. Antecedentes y estrategia

La dificultad para obtener un modelo soluble de una COX II eucariota ha sido, hasta el momento, la limitante en la comprensión de la función e interacción de las proteínas Sco1 y Sco2 en el ensamblado del centro Cu_A mitocondrial. Como se mencionó en la Introducción, hasta el momento solamente se han obtenido las variantes solubles de subunidades COX II de oxidasas bacterianas, siendo la de *Thermus thermophilus* la más tolerante a mutaciones y estable para la realización de estudios bioquímicos y biofísicos.

La subunidad COX II comprende un dominio soluble con un plegamiento típico de barril β con motivo de llave Griega, conocido como plegamiento de cupredoxina, en el cual los ligandos de metal están ubicados en bucles en la parte superior del barril, altamente conservado en todas las oxidasas (Figura 8). La región de unión a metal de COX II incluye un bucle largo que contiene 5 de los 6 ligandos del sitio Cu_A , en un motivo con la secuencia $\text{CX(E/Q/W)XCX}_3\text{HX}_2\text{M}$ conservado en todas las especies. La mayoría de estas subunidades están ancladas a la membrana mediante dos hélices transmembrana en el extremo N-terminal. En cambio, en la oxidasa ba_3 de *Thermus thermophilus*, este dominio se ancla mediante una sola hélice transmembrana (Figura 9)⁵⁴. El motivo cupredoxina se encuentra expuesto al periplasma bacteriano. El dominio C-terminal puede expresarse en forma soluble, estable de 136 amino ácidos, eliminando los primeros 32 residuos hidrofóbicos en el extremo N-terminal¹¹⁵. La estructura de la subunidad soluble COX II de *Thermus thermophilus* ha sido resuelta por cristalografía de rayos X⁶⁶. Una comparación de la misma con aquella de la oxidasa completa^{133,134} indica que la estructura de este dominio se preserva en la versión soluble truncada, validando esta estrategia.

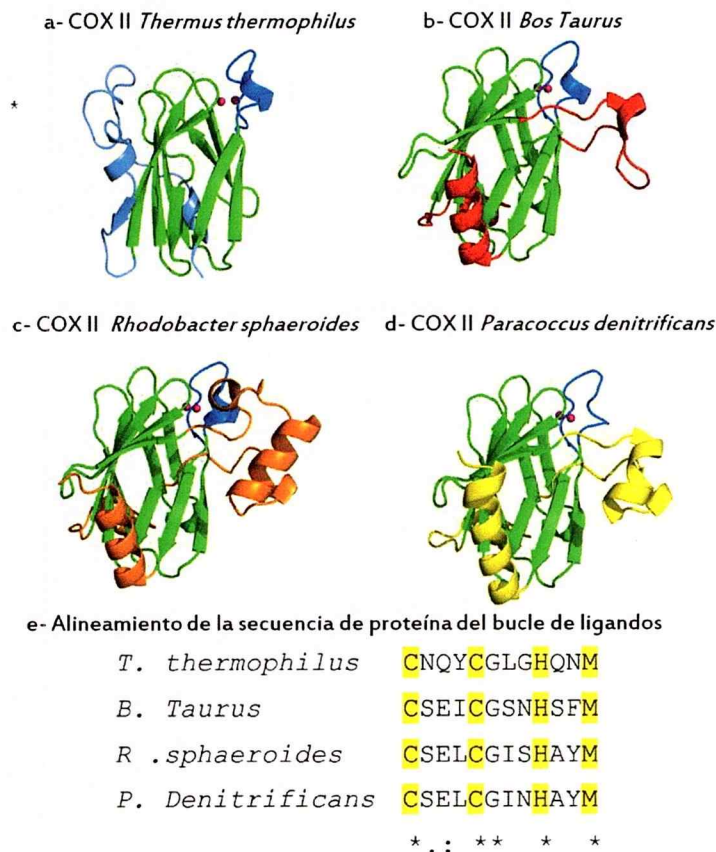


Figura 8. Plegamiento cupredoxina de los dominios solubles de COX II de varios organismos (a-d) Se destacan el plegamiento cupredoxina barril- β (Verde) y el bucle de ligandos (Azul). En otro color estructuras extras al plegamiento conservado. (e) Alineamiento de las secuencias del bucle de ligandos, mostrando que se conservan los ligandos del centro Cu_A (Amarillo)

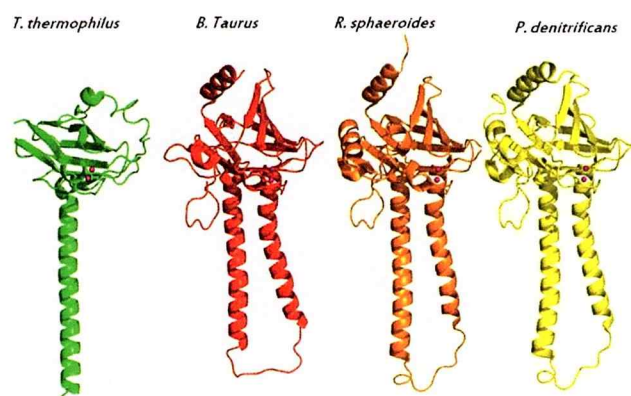


Figura 9. Diferencia en el anclaje a membrana de la subunidad COX II de *T. thermophilus*, respecto a otros organismos.

Muchos grupos han intentado expresar y purificar el dominio soluble de COX II de organismos eucariotas, sin resultados positivos hasta el momento. Nuestro grupo ha intentado expresar de manera soluble el dominio soluble de COX II humana salvaje empleando distintas estrategias de purificación. Sin embargo, los intentos no fueron satisfactorios, resultando en variantes que formaban cuerpos de inclusión que, cuando se trataron de solubilizar, daban lugar a una proteína con un espectro de dicroísmo circular típico de una proteína con alto porcentaje de estructura de hoja β , pero incapaz de unir iones cobre. Por lo tanto, nos propusimos la construcción de una subunidad COX II quimérica que preservara los elementos estructurales requeridos para la interacción con las posibles metalochaperonas.

La falta de estabilidad del dominio soluble de COX II humana podría deberse a que, en las oxidasas eucarióticas, el mismo interacciona fuertemente con las subunidades COX VIb, VIc, VIIb también orientadas hacia el IMS (Figura 10b), por lo cual presenta un gran número de residuos hidrofóbicos en su superficie. En cambio, el dominio bacteriano, proveniente de una enzima más sencilla, está expuesto en el periplasma y por tanto posee una superficie poco hidrofóbica, que favorecería su solubilidad (Figura 10).

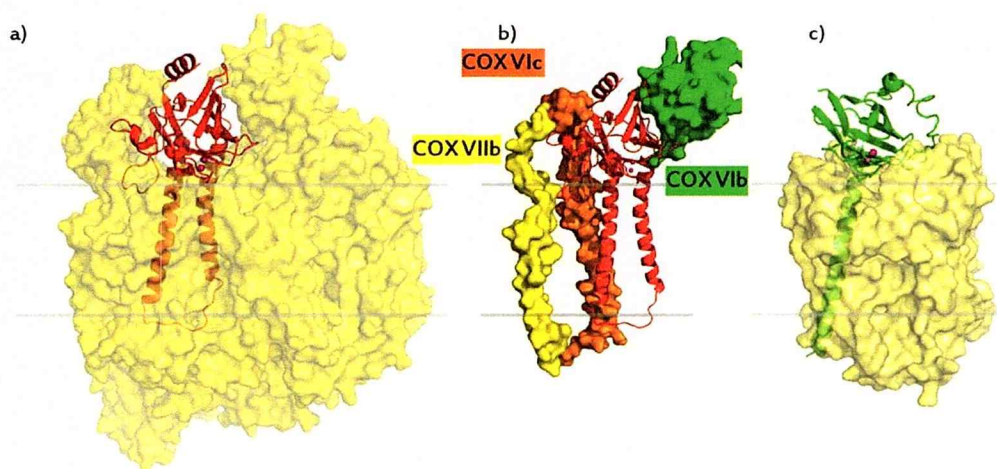


Figura 10. Diferente interacción de COX II Eucariota (a) y bacteriana (c). (b) Subunidades de COX que interactúan con el dominio soluble de COX II eucariota. Las líneas grises marcan los límites de la bicapa lipídica.

Con el propósito de obtener un modelo soluble de COX II humana, diseñamos un conjunto de mutantes basado en el alineamiento estructural del dominio soluble de COX II de *Thermus thermophilus* (TtCu_A), y un modelo de la proteína COX II de *Homo sapiens* (Figura 11), obtenido por homología con la estructura de COX II de *Bos taurus*, la única COX eucariota cuya estructura se conoce hasta el momento.⁵⁷ Esta comparación confirma la presencia de una superficie con varios parches hidrofóbicos en COX II humana, en contraste con TtCu_A.

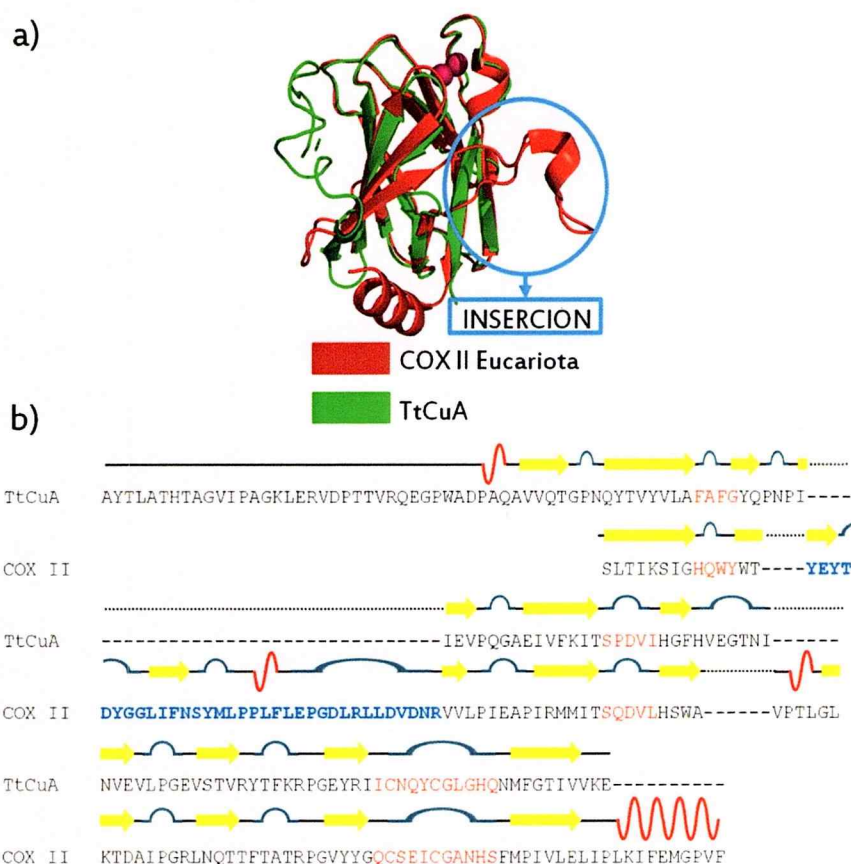


Figura 11. (a) Alineamiento estructural de la subunidad soluble de COX II bacteriana (PDB 2CUA) y modelo por homología del dominio soluble de COX II humana. (b) Alineamiento de secuencia según estructura de ambas proteínas. Se destacan los bucles que rodean al centro Cu_A (rojo) y la secuencia inserción presente en la proteína eucariota (azul).

A partir de este alineamiento estructural, nos propusimos crear unas quimeras basadas en el esqueleto de la subunidad COX II humana, y otras basadas en la subunidad COX II bacteriana.

3.2. Proteínas basadas en el esqueleto proteico eucariota

Esta estrategia está orientada a obtener variantes de la subunidad COX II humana que sean estables y solubles, por lo cual se procuro identificar las causas estructurales de la inestabilidad de la misma. Andrés Espinoza en nuestro laboratorio intentó expresar y purificar el dominio soluble de COX II humana sin éxito. El análisis de secuencia de la proteína humana reveló la presencia de un gran número de residuos hidrofóbicos que pueden afectar la estabilidad de la proteína.

La comparación estructural entre las dos subunidades COX II también muestra que la proteína eucariota contiene una región de proteína que no está presente en la proteína bacteriana a la que llamamos “inserción” (Figura 11-b). En el alineamiento estructural se evidencia como una inserción de 34 residuos. Su secuencia, **YEYTDYGGGLIFNSYMLPPLFLEPGDLRLLD**VDNR, contiene un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos (Rojo) y además presenta un bucle que sobresale del alineamiento estructural que, en la estructura de la oxidasa completa, se encuentra interactuando fuertemente con otras subunidades (Figura 12) y que podría ser uno de los principales causantes de la inestabilidad.

Se pensaron dos estrategias para estabilizar la proteína COX II humana eliminando dirigidas a eliminar la presencia de esta inserción. Por un lado se decidió truncar el bucle que sobresale del plegamiento cupredoxina, LPPLFLEPGDLRLLD, insertando un residuo de Gly en su lugar. El residuo de Gly al no tener cadena lateral, tiene una mayor flexibilidad conformacional que permitiría generar un bucle trunco. A esta mutante la llamamos *Hs-i*.

Por otro lado, se decidió reemplazar a toda la secuencia inserción, por la secuencia PNP presente en la proteína COX II bacteriana. Si se observa en detalle el alineamiento estructural de estas secuencias (Figura 12) las hojas β ubicadas corriente arriba y debajo de la secuencia de PNP alinean perfectamente con el

inicio y el final de la secuencia inserción, por lo que este reemplazo podría mantener el plegamiento cupredoxina y al mismo tiempo eliminar todos los residuos hidrofóbicos presentes en la secuencia inserción. A esta mutante la llamamos *Hs*-PNP.

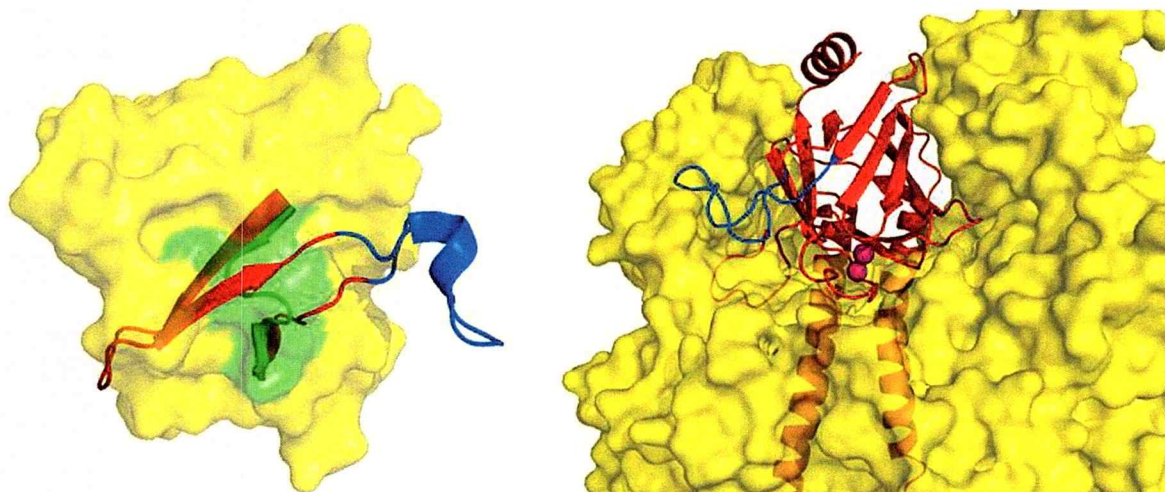


Figura 12. Izquierda: Alineamiento estructural de la región inserción eucariota (rojo) y la secuencia PNP bacteriana. Se destaca en azul, la posición del bucle eliminado en COX II en la mutante *Hs-i* con respecto al plegamiento cupredoxina (amarillo). Derecha: Posición de anclaje del bucle eliminado dentro de la estructura global de COX eucariota (PDB 1OCC).

3.3. Proteínas basadas en el esqueleto proteico bacteriano

Nuestro grupo recientemente demostró mediante RMN que el plegamiento de cupredoxina, considerado rígido, presenta una alta heterogeneidad conformacional en los bucles en ausencia de los iones cobre (forma apo)¹³⁵. Esta flexibilidad conformacional expondría los bucles en Apo-COX II para la interacción con las posibles metalochaperonas¹³⁵. Esta hipótesis está de acuerdo con estudios de modelado de la interacción de COX II humana con las proteínas Sco1 y Sco2 humanas.¹³⁶ Por lo tanto, decidimos construir una proteína quimérica utilizando el barril β de la proteína estable de *T. thermophilus* como armazón general, decorado con los bucles de la proteína COX II humana a la que decidimos llamar Tt3L.

El estudio del modelado de la interacción COX II – Sco1 sugiere dos regiones principales de interacción: los bucles que rodean al centro Cu_A y el bucle

que sobresale de la estructura dentro de la secuencia de la inserción (Figura 13)¹³⁶.

En base a estas hipótesis, se diseñó otra mutante donde se reemplazó la secuencia PNP por toda la inserción presente en la proteína eucariota en conjunto con el reemplazo de los tres bucles que rodean al centro Cu_A, por los presentes en la proteína humana, a la que llamamos variante Tt3L+i.

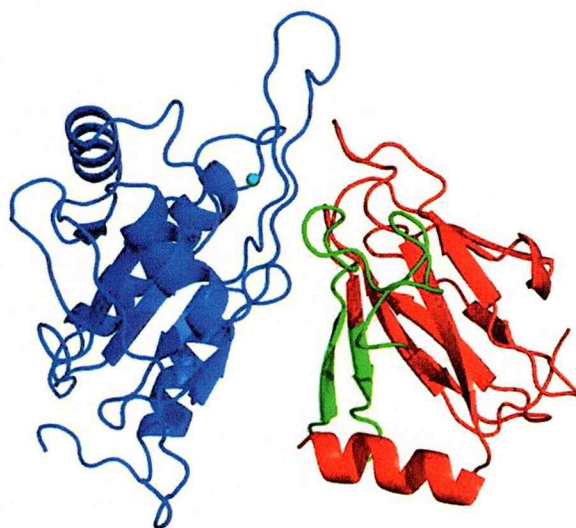


Figura 13. *Docking* de la interacción de Sco1-Cu(I) con COX II humana partir de las estructuras en solución de Cu(I)-Sco1 (PDB 2GQM)¹³⁷ y cristalográfica de COX II (1OCR)¹³⁸ reportado por Van Dijk, et al¹³⁶. En verde se resalta la región de la inserción completa que estaría interactuando con Sco1.

3.4. Clonado de las construcciones

Los genes de las distintas proteínas quiméricas con los sitios de clonado *NdeI* y *BamHI* en los extremos 3' y 5' respectivamente, fueron sintetizados por Genscript® en un plásmido pUC57, clonado en el sitio *EcoRV*.

Los genes fueron subclonados entre los sitios *NdeI* y *BamHI* del plásmido de expresión pET9a. Vector inducible por IPTG que permite la expresión de proteínas sin cola de afinidad para su purificación, empelado en nuestro laboratorio para la sobreexpresión de la proteína salvaje TtCu_A.

Para la obtención de los genes sintéticos se transformaron cepas de *E. coli* JM109 con los plásmidos pUC57 empleando el protocolo detallado en 2.2.3, y se purificó el ADN plasmídico como se detalla en 2.2.1.

Los genes fueron liberados mediante digestión empleando las enzimas de restricción *NdeI*-*Bam*HI. Los productos de la digestión fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1% como se detalla en la sección 2.2.2. y fueron ligados en el plásmido pET9a previamente digerido. Se transformaron cepas de *E. coli* JM109 con los productos de las ligaciones mediante el protocolo descrito en 3.II.D y las células transformantes se seleccionaron mediante crecimiento en placas de LB-Agar usando kanamicina como marcador de selección.

Cinco colonias de cada transformación de las ligaciones fueron crecidas para la obtención de plásmidos, los cuales se enviaron a secuenciar para verificar que la secuencia se encuentre en marco de lectura correcto y descartar la presencia de mutaciones indeseadas. De esta manera logramos obtener los genes para las proteínas *Hs-i*, *Hs*-PNP, *Tt3L+i* y *Tt3L* en el vector de expresión pET9a, listas para las pruebas de expresión de las mismas.

3.5. Expresión de las variantes quiméricas de COX II humana

Una vez obtenidos los vectores de expresión con los genes deseados, se procedió a hacer las pruebas de inducción y solubilidad de las distintas variantes. Se realizaron pruebas de inducción de las mismas a 20°C, de manera de obtener una expresión lenta y estable de las mismas. De las distintas variantes, sólo la proteína *Tt3L* presentó un 100% de proteína soluble, mientras que las otras tres variantes (*Hs-i*, *Hs*PNP y *Tt3L+i*) formaron cuerpos de inclusión (Figura 14).

La purificación de la proteína *Tt3L* mostró un espectro de dicroísmo circular típico de proteína con alto contenido de hoja β similar al de *TtCu_A*, mostrando que el plegamiento se mantiene en el caso de la mutante *Tt3L*.

Para intentar solubilizar a las demás proteínas quiméricas se plantearon dos estrategias. Por un lado se hicieron pruebas de expresión soluble de las demás proteínas quiméricas empleando distintas cepas de *E. coli overexpress* (C41, C43)

empleadas para la expresión de proteínas tóxicas¹³⁹ y por otro lado se intentó solubilizar los cuerpos de inclusión formados por las proteínas mediante el uso de agentes caotrópicos y posterior replegado de las proteínas mediante la eliminación del mismo.

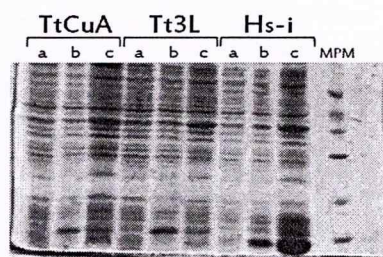


Figura 14. SDS-PAGE de la inducción de las mutante Tt3L y Hs-i en comparación con la proteína salvaje TtCu_A. (a) muestra de células sin inducir (b) Muestra de células inducidas (c) fracción no soluble de la inducción, mostrando que Tt3L se mantiene soluble al contrario de Hs-i que se va a cuerpos de inclusión insolubles.

La expresión en las cepas C41 y C43, da lugar a cuerpos de inclusión, y los intentos de replegado de los cuerpos de inclusión solubilizados no fueron satisfactorios.

3.6. Discusión

En el intento de generar quimeras estables y solubles que representen al dominio soluble de COX II humano, sólo la variante Tt3L se expresó de manera soluble. Intentos de obtener una variante con más residuos de superficie proveniente de la variante humana fueron infructuosos.

3.6.1. Sobre las quimeras inestables

Las variantes construidas sobre el esqueleto de barril β de la proteína humana, a pesar de estar truncadas o con la presencia de la secuencia bacteriana PNP, mantienen la presencia de muchos residuos hidrofóbicos en la superficie que siguen desestabilizando la estructura de la misma.

Por otro lado la inserción agregada a la proteína TtCu_A en reemplazo de la secuencia PNP puede desestabilizar la proteína termófila de muchas maneras. Por un lado, en el diseño de la quimera se eliminaron 27 residuos del extremo N-

terminal de $TtCu_A$ para evitar impedimentos en el plegamiento de la secuencia insertada en el entorno de la proteína termófila (Figura 15). En segundo lugar, la presencia de residuos hidrofóbicos en la superficie puede favorecer la agregación y formación de cuerpos de inclusión. Y a pesar de que se pudieron enriquecer los cuerpos de inclusión de la proteína, el replegado de los mismos no fue exitoso.



Figura 15. Entrecruzamiento en el alineamiento estructural de la secuencia Inserción eucariota con el extremo N-Terminal de $TtCu_A$.

3.6.2. Sobre la proteína Tt3L

La única variante que se logró expresar de manera soluble fue la proteína Tt3L (Figura 16). Esta proteína presenta la secuencia nativa de la proteína COX II humana en los tres bucles que rodean al centro Cu_A .

A pesar de que Tt3L no cuenta con la secuencia de la inserción, los estudios de modelado de la interacción con Sco1 reportados por los grupos de Bertini & Bonvin¹³⁶ fueron hechos con la estructura cristalográfica de COX II por lo que no tiene en cuenta las propiedades dinámicas y de variabilidad conformacional de el bucle de ligandos de esta proteína en la ausencia del centro Cu_A ^{135,137,140}. Este mapeo sugiere dos regiones involucradas en la interacción, la región de la inserción, que en realidad tendría una función de anclaje a otras subunidades del complejo COX, y los bucles que rodean al centro Cu_A tal como se propuso por nuestro grupo recientemente¹³⁵.

Es por esto que proponemos que nuestro modelo mínimo de COX II humana, es suficiente para poder evaluar el reconocimiento proteína-proteína con las posibles metalochaperonas, objetivo principal de esta tesis.

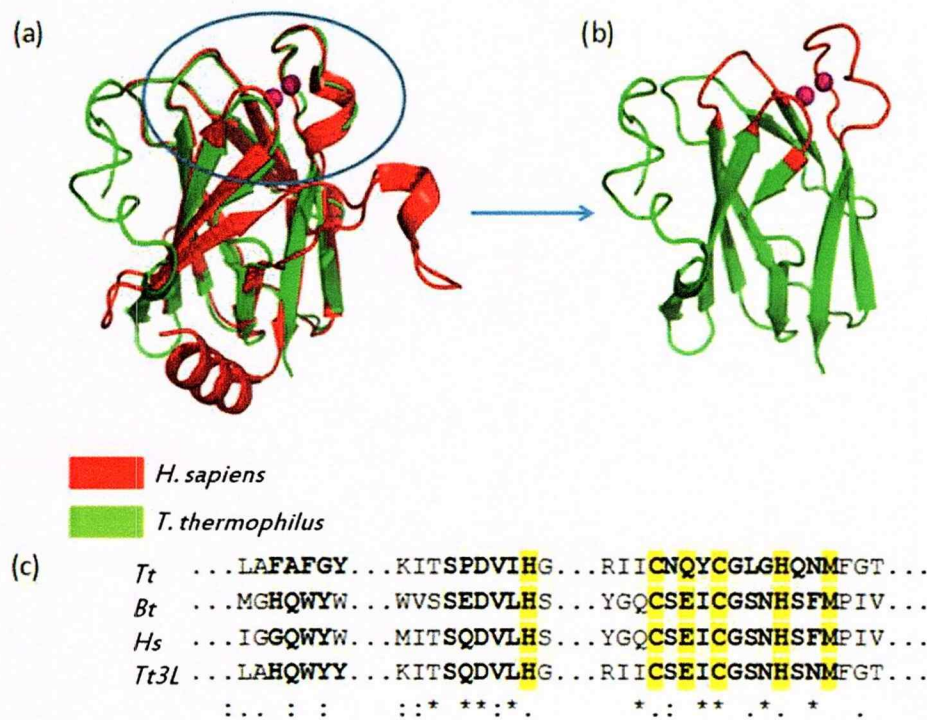


Figura 16. Representación de la proteína quimérica Tt3L, mostrando (a) alineamiento estructural de la variante bacteriana y eucariota de Cox II, (b) resultante quimérica Tt3L y (c) alineamiento de secuencia de los bucles mostrando que poseen la misma longitud y ligandos del centro Cu_A (resaltados en amarillo)

4.1. Estructura electrónica y características espectroscópicas de los sitios Cu_A

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es estudiar la estructura electrónica de sitios de cobre en proteínas involucrados en reacciones de transferencia electrónica a fin de comprender su impacto en la funcionalidad. Los sitios metálicos en proteínas poseen estructuras electrónicas distintivas, íntimamente relacionadas con su función biológica, que a su vez se reflejan en características espectroscópicas particulares, que suelen diferir de las estructuras de simples complejos de coordinación. El sitio Cu_A no es una excepción.

La disponibilidad de la subunidad soluble TtCu_A ha permitido el estudio del centro Cu_A mediante diferentes espectroscopías, sin la interferencia de los demás cofactores metálicos que se encuentran dentro del complejo COX^{63,115,116,141,142}. Como se indicó brevemente en la introducción, el centro Cu_A tiene dos átomos de cobre unidos a puente por dos Cys que forman un *core* rígido (Cu₂S₂). Además cada átomo de cobre está unido a un imidazol de residuos de His y un carbonilo del esqueleto proteico y el tioéter de la cadena lateral de un residuo de Met como ligandos axiales débiles (Figura 3). El sitio se caracteriza por una distancia Cu-Cu muy corta (2,4 -2,5 Å)^{119,143}.

El centro Cu_A en su forma reducida (Cu⁺¹-Cu⁺¹) posee dos iones cobre con configuración d¹⁰ de capa llena y es diamagnético, por lo cual no posee transiciones electrónicas en el rango visible ni propiedades magnéticas, y solamente puede ser estudiado espectroscópicamente por técnicas de absorción de rayos X (XAS). En cambio, la forma oxidada (Cu^{+1,5}-Cu^{+1,5}) es un par de valencia mixta totalmente deslocalizado y es paramagnético, con un electrón desapareado (S=1/2), presentando muchas características espectroscópicas particulares.

El centro Cu_A oxidado presenta un color púrpura intenso distintivo, que se debe a su espectro de absorción, dominado por dos bandas intensas centradas a 480 y 530 nm (20800 y 18870 cm⁻¹ respectivamente) (Figura 17). Su intensidad sugiere que se tratan de bandas permitidas, es decir, atribuibles a transiciones de

ANM

transferencia de carga, lo cual fue confirmado posteriormente mediante experimentos de espectroscopía Raman, que permitieron asignarlas a bandas de transferencia de carga (TC) $S(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}^{104,144}$. El espectro también incluye una banda relativamente intensa a altas energías a 360 nm (28000 cm^{-1}) asignada a una transferencia de carga $N(\text{His}) \rightarrow \text{Cu}^{104}$, y una en la zona de transiciones de campo ligando a 770 nm (13000 cm^{-1}), asignada por Raman como una “banda de Intervalencia” $\Psi \rightarrow \Psi^*$ (Cu-Cu)⁹¹. Esta banda refleja el solapamiento parcial de orbitales de los dos átomos de Cu, lo que fue interpretado como evidencia de un enlace covalente entre los dos Cu, representando el primer ejemplo de enlace metal-metal en una proteína¹⁰⁴. Estudios de deconvolución Gaussiana de estos espectros, complementados por la obtención de espectros de dicroísmo circular (CD) y dicroísmo circular magnético (MCD), que presentan distintas reglas de selección, permitieron encontrar otras bandas de menor intensidad oscurecidas por estas transiciones, tales como las bandas de campo ligando de los orbitales d de los cobre^{105,144,145}.

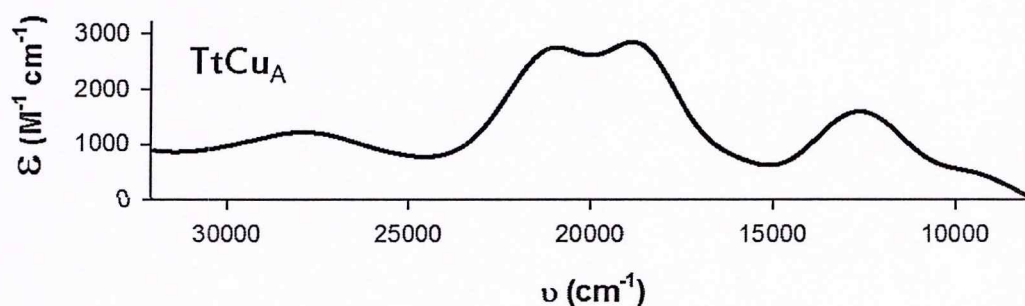


Figura 17. Espectro electrónico de la proteína $TtCu_A$.

Experimentos de EXAFS en sitios Cu_A de distintas proteínas naturales o “ingenierizadas” permitieron determinar una distancia Cu-Cu de 2,4-2,5 Å relativamente invariante en ambos estados de oxidación, confirmando la rigidez de este sitio^{105,145,146}. Experimentos de XAS dirigidos a bandas específicas de los átomos de S y Cu revelaron una alta covalencia en el *core* Cu_2S_2 de los enlaces entre los átomos de cobre y los $S(\text{Cys})$, compatibles con una función de onda del estado fundamental conteniendo un 44% de carácter Cu y un 46% de carácter

S(Cys), que resulta en una gran deslocalización de carga sobre los átomos de S del centro y explica la intensidad de las bandas de transferencia de carga presentes en el espectro de absorción^{104,105,143,147,148}. Cálculos de funcionales de la densidad (DFT) en este sitio metálico han confirmado esta descripción, asimismo identificando al estado fundamental del sitio como una función de onda del tipo σ_u^* , caracterizada por una interacción de tipo σ antienlazante entre los orbitales atómicos $d_{x^2-y^2}$ de los átomos de Cu, consistente con una distancia Cu-Cu de 2,4-2,5 Å (Figura 18)⁹⁰.

Por otra parte, estudios de complejos de coordinación sintéticos permitieron obtener modelos dinucleares del centro Cu_A , pero con una distancia Cu-Cu de 2,9 Å¹⁴⁹. Los mismos poseen un estado fundamental que se puede describir mediante una función de onda de tipo π_u , es decir con una interacción de tipo π_u enlazante entre los orbitales atómicos $d_{x^2-y^2}$ de los átomos de Cu (Figura 18).

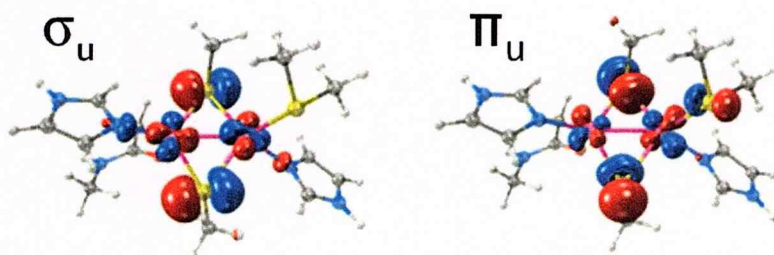


Figura 18. Distribución de densidad electrónica de los estados electrónicos fundamentales σ_u^* y π_u del centro Cu_A

Estudios de DFT luego revelaron que la superficie de energía potencial del sitio Cu_A oxidado puede describirse como un potencial de doble pozo con dos mínimos que corresponden a los estados fundamentales σ_u^* (a una $d_{\text{Cu-Cu}}$ de 2.49 Å) con valores de λ chicos y π_u (para una $d_{\text{Cu-Cu}}$ de 3.06 Å)¹⁴⁵ que además tiene valores de λ mayores ($\lambda_\pi=1,9\lambda_\sigma$) (Figura 19) lo que implica que las velocidades de TE del estado σ_u^* sean 15 veces superiores a las del estado π_u ¹⁴⁵. Debido a que estos sitios están caracterizados por un *core* rígido, se descartó que el estado π_u

estuviera poblado en los centros Cu_A presentes en proteínas, ya que requeriría una reorganización estructural grande, haciéndolo disfuncional^{150,151}.

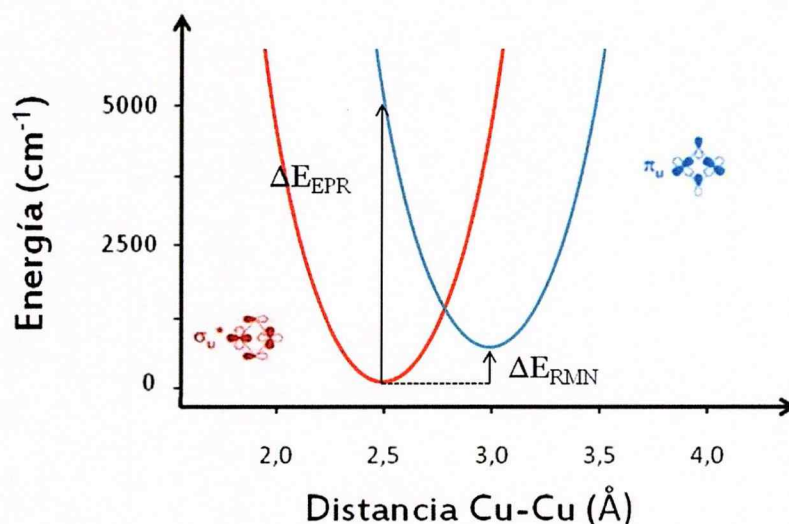


Figura 19. Modelo de doble pozo de potencial propuesto por Solomon para el centro Cu_A

Los espectros de EPR de los centros Cu_A en el estado oxidado presentan espectros correspondientes a una especie con un electrón desapareado con una estructura hiperfina de siete bandas en la región del $g_{\parallel}$ con intensidades relativas 1:2:3:4:3:2:1, resultante del acoplamiento del electrón ($S=1/2$) con dos iones Cu ($I=3/2$) equivalentes (Figura 20)^{88,142,152-154}. Sin embargo, estas siete bandas no son visibles en los espectros de todas las proteínas con centros Cu_A , dependiendo del ancho de las mismas. El septeto se observa claramente en el centro Cu_A de la proteína N_2O reductasa (en una mutante natural que posee solamente este sitio metálico), pero no siempre se detecta en las variantes de la proteína TTCu_A que utilizamos en este trabajo de Tesis. Sin embargo, la envolvente espectral en la zona de $g_{\parallel}$ puede simularse asumiendo este septeto. Los espectros de EPR de los sitios Cu_A también se distinguen por un valor de $g_{\parallel}$ de ≈ 2.19 , *i.e.*, menor al observado en proteínas de Cu(II) de Tipo 1 (azules) o de Tipo 2¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

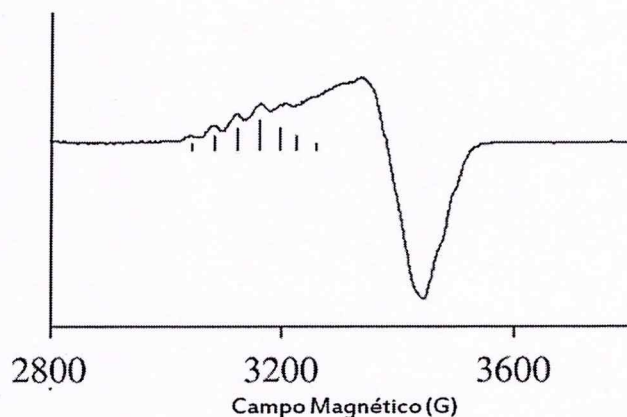


Figura 20. Espectro de EPR de banda X del centro Cu_A en N_2O reductasa. Se destacan con líneas el septeto en la región del $g_{\parallel}^{158}$.

Este valor de g puede explicarse asumiendo una contribución del acoplamiento spin-orbita entre el estado fundamental σ_u^* y el estado excitado π_u . Por tanto, el valor de $g_{\parallel}$ puede describirse mediante la ecuación^{145,154}:

Ecuación 4-1

$$g_{\parallel} = g_e + \frac{8\zeta_{3d}^{Cu} \alpha^2 \beta^2}{\Delta E_{\sigma/\pi}}$$

donde g_e es el valor de g del electrón libre (2,0023), ζ_{3d}^{Cu} es la constante de acoplamiento spin-órbita para la función de onda 3d del Cu(II) (828 cm^{-1}), α es la densidad de spin del Cu en el estado basal y β es la densidad de spin en el estado excitado, y $\Delta E_{\sigma/\pi}$ es la diferencia de energía entre los estados σ_u^* y π_u . A partir de los valores experimentales de $g_{\parallel}$, la $\Delta E_{\sigma/\pi}$ para distintos sitios Cu_A se estima en $\approx 5000 \text{ cm}^{-1}$, indicando que a temperatura ambiente sólo el estado σ_u^* estaría poblado, siendo el único activo en reacciones de TE¹⁴⁵.

Nuestro grupo realizó también estudios de RMN de la proteína TiCu_A en la forma oxidada, que muestra en los espectros de ^1H , ^{13}C y ^{15}N , señales con desplazamientos químicos influenciados por el paramagnetismo del centro metálico¹⁵⁹. Estas señales corresponden principalmente a núcleos de ligandos unidos a los iones Cu, que reflejan el efecto del paramagnetismo principalmente por deslocalización electrónica, y (en parte) a la anisotropía de g del sitio metálico

(que es muy pequeña en el caso de sitios Cu_A)^{141,160}. Los experimentos de RMN revelan la presencia de un equilibrio entre los dos estados fundamentales σ_u^* y π_u . Estos experimentos revelan un $\Delta E_{\sigma/\pi}$ de 600 cm^{-1} , lo que corresponde a una relación de poblaciones 95:5 a temperatura ambiente, en contraste con los datos de EPR¹⁵⁹. Esta discrepancia fue resuelta por el grupo de Ed Solomon mediante el modelo de potencial de doble pozo, asumiendo un equilibrio entre los dos estados fundamentales σ_u^* y π_u , con mínimos a distancias Cu-Cu de *ca.* 2,5 y 3,0 Å, respectivamente. La transición observada en los espectros de EPR $\Delta E_{\sigma/\pi} \approx 5000 \text{ cm}^{-1}$ correspondería al acoplamiento entre el nivel fundamental σ_u^* y el estado excitado π_u a una distancia de Cu-Cu de 2,5 Å, mientras que la transición informada por RMN, $\Delta E_{\sigma/\pi} \approx 600 \text{ cm}^{-1}$ se debería a un equilibrio entre el nivel fundamental σ_u^* 2,5 Å y el nivel fundamental π_u a 3,0 Å (Figura 19). Sin embargo, una interconversión rápida entre estos dos estados fundamentales tal como se observa en los espectros de RMN, es incompatible con la rigidez requerida para el sitio Cu_A ^{146,150}.

Nuestro grupo puso a prueba esta hipótesis generando una serie de mutantes de $Tt\text{Cu}_A$ en las cuales se modificaba la identidad del ligando axial Met160, que se estudiaron mediante distintas técnicas espectroscópicas. Dado que la interacción con el ligando Met160 es débil, todas las mutaciones indujeron pequeñas perturbaciones preservando la especie de valencia mixta del sitio Cu_A ¹¹². Mediante estudios de RMN, observamos que el cambio de la identidad del ligando axial permite la modulación fina de la estructura electrónica del centro metálico, ajustando los potenciales redox y el valor de $\Delta E_{\sigma/\pi}$. En particular, en la mutante $Tt\text{Cu}_A\text{-M160Q}$ el valor de $\Delta E_{\sigma/\pi}$ aumenta de 600 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , mientras que en la mutante $Tt\text{Cu}_A\text{-M160H}$, $\Delta E_{\sigma/\pi}$ se redujo a 200 cm^{-1} , resultando en poblaciones del estado electrónico π_u del 1% y 28%, respectivamente, comparados con un 5% presente en la proteína salvaje (Figura 21)¹⁰⁶. Asimismo, los espectros de absorción en el visible y de EPR eran consistentes con estos cambios en las poblaciones de los estados σ_u^* y π_u . En particular, un aumento de la población del estado π_u se refleja en una disminución de las bandas de transferencia de carga $\text{S(Cys)} \rightarrow \text{Cu}$ a 480 y 530 nm (20800 y 18850 cm^{-1}), y un aumento de la absorción

a 360 nm (28000 cm^{-1}) (Figura 21). Sorprendentemente, estudios de EXAFS revelaron que la mayor población del estado π_u no induce un aumento en la distancia Cu-Cu, como era de esperar en base al modelo propuesto por Solomon. Por lo tanto, podría suponerse que, en el esqueleto proteico, el sitio Cu_A es capaz de estabilizar una geometría en la cual el estado π_u está poblado sin alterar la distancia Cu-Cu^{106,111}.

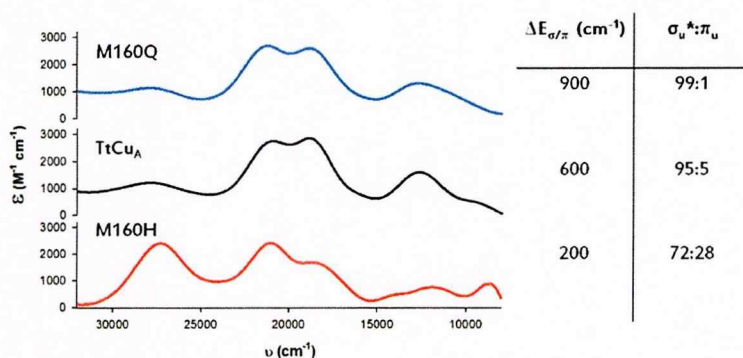


Figura 21. Espectros electrónicos de las mutantes de primera esfera M160X de la proteína $TtCu_A$ y la variación de poblaciones de los distintos estados electrónicos¹⁰⁶.

Estudios de DFT basados en los espectros de estas mutantes permitieron demostrar luego que la banda de TC $S(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}$ se corre a energías mayores en el estado π_u solapándose con las bandas de TC $N(\text{His}) \rightarrow \text{Cu}$ (Figura 22)¹⁰⁶. Por lo que el incremento del coeficiente de extinción de la banda a altas energías (28000 cm^{-1}) se corresponde a la contribución de una banda de TC $(S(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}) \pi_u$.

Sin embargo, estas mutantes de $TtCu_A$ afectan la primera esfera de coordinación y no se corresponden a sitios de coordinación presentes en proteínas nativas. Por lo tanto, decidimos estudiar la estructura electrónica de la variante Tt3L, en la cual se conserva la identidad de los ligandos y la longitud de los bucles que los contienen, y las perturbaciones sólo tienen lugar en la segunda esfera de coordinación del sitio metálico.

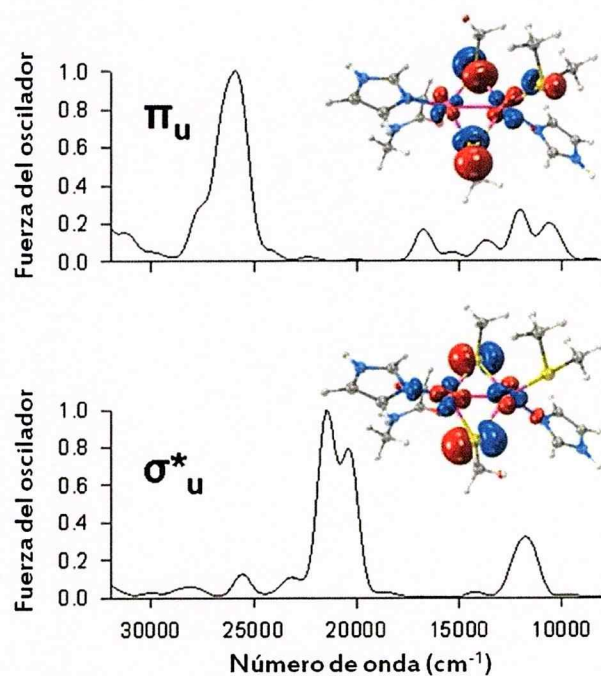


Figura 22. Espectros electrónicos de las distintas especies electrónicas puras calculados mediante DFT¹⁰⁶.

4.2. Espectroscopía electrónica de Tt3L

Como se ha visto en las mutantes estudiadas hasta el momento, el espectro UV-Vis de los centros Cu_A permite examinar rápidamente si se produjeron cambios en la estructura electrónica del mismo. Se procedió a purificar la proteína Tt3L en la forma Holo y oxidada como se detalla en la sección 2.2.3. Una vez purificada se realizó el espectro electrónico de la proteína (Figura 23 y Figura 24). El mismo muestra que la proteína tiene la capacidad de unir iones cobre y formar un centro Cu_A oxidado de color púrpura. Sin embargo, el espectro difiere con respecto al de la proteína salvaje. Las bandas de TC $\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}$ están ubicadas a 21300 y 18560 cm^{-1} , es decir apenas desplazadas con respecto a la proteína TtCu_A . Sin embargo, su intensidad relativa se ve alterada, así como también aumenta en intensidad la banda a *ca.* 28000 cm^{-1} , que se había atribuido a una transferencia de carga $\text{N}(\text{His}) \rightarrow \text{Cu}$. Como se mencionó anteriormente el aumento en intensidad de esta última banda es indicativo de TC $\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}$ π_u . Por lo tanto la población en el estado electrónico π_u se encuentra claramente aumentada en el caso de la mutante Tt3L, similar a lo observado con la mutante

M160H (Tabla 1). Por su parte, la banda de intervalencia Cu-Cu en el IR cercano se mueve de 12650 a 12570 cm^{-1} . Esta banda refleja el acoplamiento electrónico entre los iones Cu (H_{AB}), que disminuye solo en 80 cm^{-1} , lo que permite concluir que la distancia Cu-Cu no se encuentra alterada respecto a la proteína salvaje a pesar del aumento en la población del estado π_u .

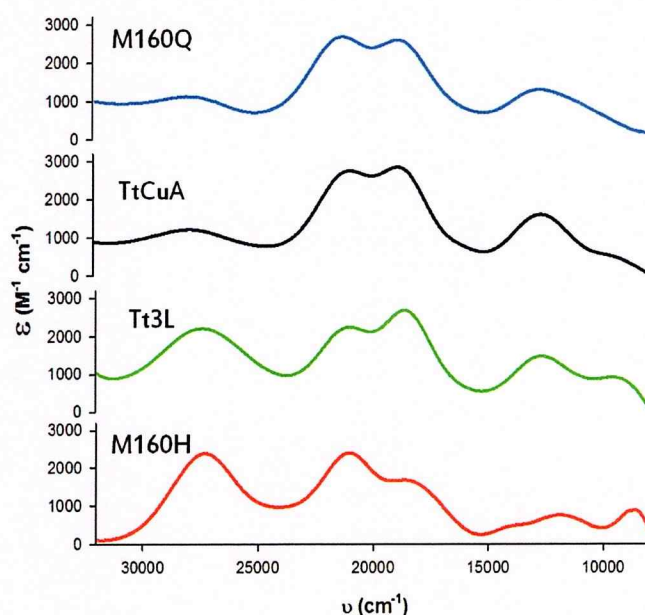


Figura 23. Espectro electrónico de la proteína Tt3L en comparación la proteína salvaje y sus mutantes M160X

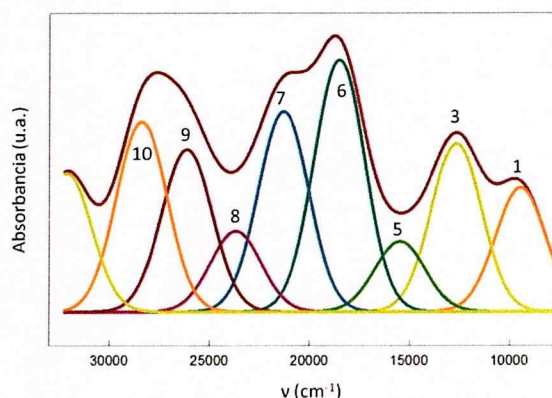


Figura 24. Deconvolución del espectro electrónico de Tt3L. Las número de onda ajustados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Deconvolución del espectro de absorción electrónico de la proteína Tt3L en comparación con la proteína salvaje y sus variantes.

Variante	M160Q		TtCu _A		Tt3L		M160H		Asignación
	ν (cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
10	28100	800	28000	800	28720	1500	27900	1500	CT N(His)→Cu
9	26000	500	25800	500	26150	1440	26500	1500	CT (S(Cys)→Cu) π_u
8	23200	300	23400	650	23700	800	23800	1000	CT N(His)→Cu
7	21500	2850	21270	2600	21300	1880	21150	2340	CT (S(Cys)→Cu) π_u
6	18550	2900	18700	3100	18560	2180	18300	1660	CT (S(Cys)→Cu) σ_u
5	15900	450	16050	645	15420	1140	16560	530	CT (S(Cys)→Cu) σ_u
4	--	--	--	--	--	--	14500	600	Campo Ligando
3	12750	1650	12650	1960	12570	1480	12100	1100	Campo ligando
2	--	--	--	--	--	--	10190	300	Intervalencia Cu-Cu
1	10250	550	9400	610	9300	1460	8600	1233	Campo Ligando

La dependencia de la temperatura del espectro de absorción registrado entre 276 y 312K muestra la presencia de cuatro puntos isobéuticos a 22000; 17000; 14000 y 11000 cm⁻¹, mostrando la presencia de un equilibrio entre dos especies. Al aumentar la temperatura, se observa un aumento de la intensidad de la banda a 28000 cm⁻¹ concomitante con una disminución de las bandas de TC S(Cys)→Cu a 21300 y 18560 cm⁻¹. Este comportamiento se asemeja al observado en la mutante M160H¹¹¹, confirmando que Tt3L tiene un $\Delta E_{\sigma/\pi}$ más chico que el de la proteína salvaje (Figura 25). Por otro lado la banda de Intervalencia se mueve ligeramente a energías menores, indicando que no se ve perturbado el sitio con el aumento de la temperatura.

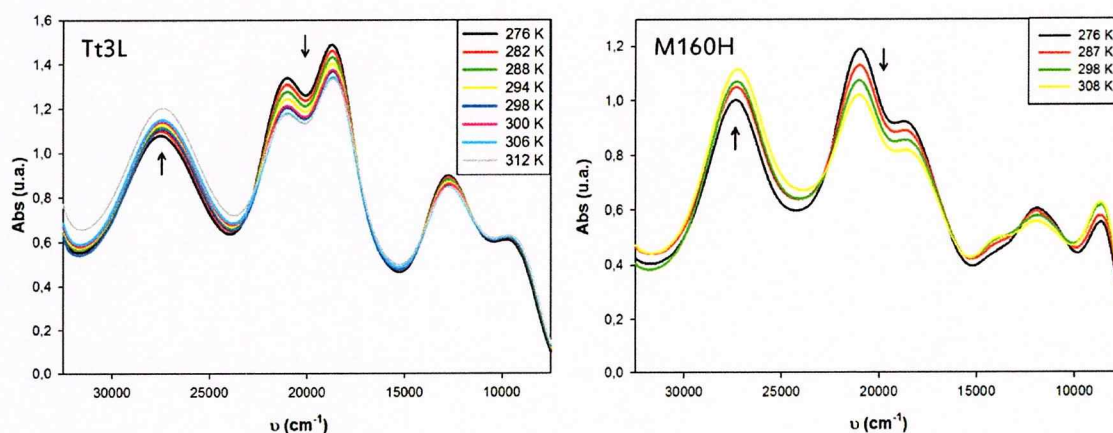


Figura 25. Dependencia con la temperatura del espectro electrónico de las proteínas Tt3L y M160H.

4.3. Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica

A pesar de que a partir del espectro electrónico de la proteína Tt3L se puede asumir que se forma un centro Cu_A nativo, la técnica que confirma la presencia del sitio de valencia mixta es la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Se realizó un espectro de EPR en banda X a 5K de la proteína Tt3L, que muestra un espectro típico de un centro Cu_A de valencia mixta (Figura 26). Dicho espectro se ajustó utilizando programa EASYSPIN, lo que permitió obtener los valores de $g_{\parallel}$ y $g_{\perp}$, que son típicos de centros Cu_A (tabla 2). Aunque la resolución del espectro no permite observar la estructura hiperfina del mismo, para el ajuste se emplearon valores de $A_{\parallel}$ y $A_{\perp}$ de 60 y 40 gauss respectivamente, típicos de proteínas con centros $\text{Cu}_A^{152,153,161}$. Este espectro además confirma la ausencia de otras especies, como pares de valencia mixta con cargas localizadas $\text{Cu}+2\text{-Cu}+1$ que suelen formarse por desestabilización del sitio nativo, que podrían quedar inadvertidos en los espectros de absorción debido a sus bajos coeficientes de extinción molares¹⁶².

En base a lo descrito anteriormente, el valor de $g_{\parallel}$ permite calcular la diferencia energética entre el estado electrónico basal estados σ_u^* y el primer estado excitado y π_u , que en este caso es de *ca.* 4250 cm^{-1} , es decir menor que en la forma nativa $Tt\text{Cu}_A$, lo que está de acuerdo con un aumento de la población del nivel π_u observada en espectroscopía UV-Vis.

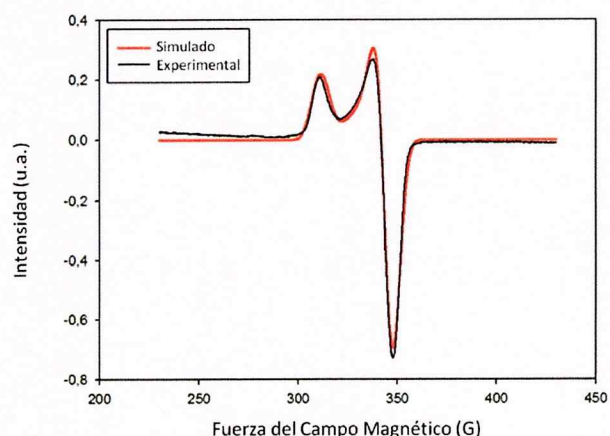


Figura 26. Espectro de EPR experimental (negro) y simulado (rojo) de la proteína Tt3L en su estado oxidado

Tabla 4. Resultado del ajuste de los espectros de EPR de la mutante Tt3L, en comparación con los obtenidos para la proteína TtCu_A y sus variantes.

Variante	Parámetros de EPR			$\Delta E_{\sigma/\pi}$ (cm ⁻¹)
	$A_{//}$	$g_{\perp}$	$g_{//}$	
TtCu _A	3,1	2,01	2,195	4883
M160Q	4,2	2,02	2,19	5314
M160H	ND	1,96 2,02	2,219	3945
Tt3L	3,09	1,98 2,015	2,21	4251

4.4. EXAFS de Tt3L

La técnica de absorción de rayos X permite, entre otras cosas, determinar por análisis de la modulación de la estructura fina cerca del borde de absorción (EXAFS, por las siglas en inglés de *Extended X-ray Absorption Fine Structure*), las distancias metal-ligando en una metaloproteína. En el caso del sitio dinuclear Cu_A, también permite determinar la distancia Cu-Cu. Se realizaron experimentos de EXAFS en colaboración con el grupo de Kyle Lancaster (Cornell University), medidos en el SSRL (*Stanford Synchrotron Radiation Lightsource*). El ajuste confirma la presencia de dos átomos de S coordinados a los iones cobre y dos His, con distancias conservadas respecto a la proteína salvaje. Con una distancia Cu-Cu corta de 2,483 Å similar a la reportada para la proteína TtCu_A dentro del error (2,51 ± 0,03 Å).

Esto confirma, al igual que para las mutantes de $TtCu_A$, que la distancia Cu-Cu no se ve afectada por las mutaciones y que es algún otro tipo de distorsión del centro Cu_A lo que causa esta modulación fina de la estructura electrónica del mismo y, por lo tanto, el estado π_u en proteínas es compatible con una distancia Cu-Cu corta como la informada para el estado σ_u^* .

4.5. Asignación de las señales hiperdesplazadas por RMN

La resonancia magnética nuclear (RMN) proporciona una herramienta única para el estudio de la estructura electrónica de centros paramagnéticos ya que permite estudiar el sistema con resolución atómica y a temperaturas fisiológicamente relevantes^{163,164}. Esto permite, además, trabajar en solución y acceder a sistemas con estados excitados de baja energía poblados, a diferencia de otras técnicas magnéticas como EPR y ENDOR en las que se trabaja con muestras congeladas a temperaturas criogénicas y solamente se examina el estado fundamental¹¹³.

En el caso del centro Cu_A en su estado oxidado, los núcleos de los ligandos se encuentran bajo el efecto paramagnético del electrón desapareado. Este efecto produce ensanchamiento de las señales y desplazamientos químicos muy grandes, de los cuales se puede extraer información sobre la estructura electrónica del sitio. Esta técnica ya ha sido aplicada con éxito a la exploración de la estructura electrónica de grupos hemo^{165,166}, centros Fe-S¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ y centros de dinucleares de Cu(II) en proteínas^{170,171}, entre otras.

La técnica de RMN es altamente complementaria a las otras técnicas mencionadas, ya que en lugar de interrogar al ion metálico, examina a los ligandos del mismo, permitiendo mapear la distribución de densidad electrónica en los distintos núcleos de los ligandos¹⁶⁰. En el caso particular de los centros Cu_A , también permite examinar la población relativa de los dos estados fundamentales alternativos σ_u^* y π_u ¹⁵⁹.

En la Figura 27 se muestra el espectro de RMN de 1H de la proteína Tt3L oxidada, comparado con los espectros de otras variantes de $TtCu_A$ estudiadas previamente en el laboratorio¹⁰⁶. Las señales de los protones de todas las variantes

de Cu_A se pueden separar en 3 grupos, entre -3 y -7 ppm se encuentran la señal del HN del residuo de Gly 115 y el H α de la Cys 149, entre 10 y 50 ppm se encuentran las señales de los protones imidazólicos de los residuos de His sumado al H α de la Cys 153 y por último entre 100 y 300 ppm se encuentran las señales correspondientes a los cuatro H β de las Cys ligandos. Estas últimas señales, que sufren el mayor desplazamiento inducido por el centro paramagnético, son las más difíciles de detectar debido a su excesivo ancho de banda. Más aún, en algunas variantes, no se pueden identificar las 4 señales individualmente. De todos modos, su posición en el espectro revela una alta densidad de spin electrónico deslocalizada en el ligando de Cys, lo que provee una evidencia directa de la alta covalencia del enlace Cu-S(Cys). Por otra parte, estas señales son las que muestran una mayor variabilidad entre las distintas mutantes, que se ha atribuido a los distintos $\Delta E_{\sigma/\pi}^{106}$.

En la Figura 28 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C de la proteína Tt3L oxidada, comparado con aquellos del resto de las mutantes¹⁰⁶. Las señales también se pueden agrupar por analogía al resto de los espectros obtenidos anteriormente: entre -600 y -300 ppm se encuentran las señales de los C β de las Cys, entre 200 y 400 ppm las señales que corresponden a los carbonos de las His y cerca de los 1000 ppm la señal del C α de la Cys 153. Nuevamente, aquí se observa que las señales correspondientes a los ^{13}C del residuo de Cys experimentan los desplazamientos químicos más extremos. Sin embargo, la variabilidad de su posición en el espectro no es uniforme. Se puede observar que las señales de los C β no presentan mayores diferencias en los espectros de las distintas proteínas estudiadas, lo mismo que el C α de la Cys153. En cambio, la posición del C α de la Cys149 puede variar de 900 a 150 ppm (Figura 28).

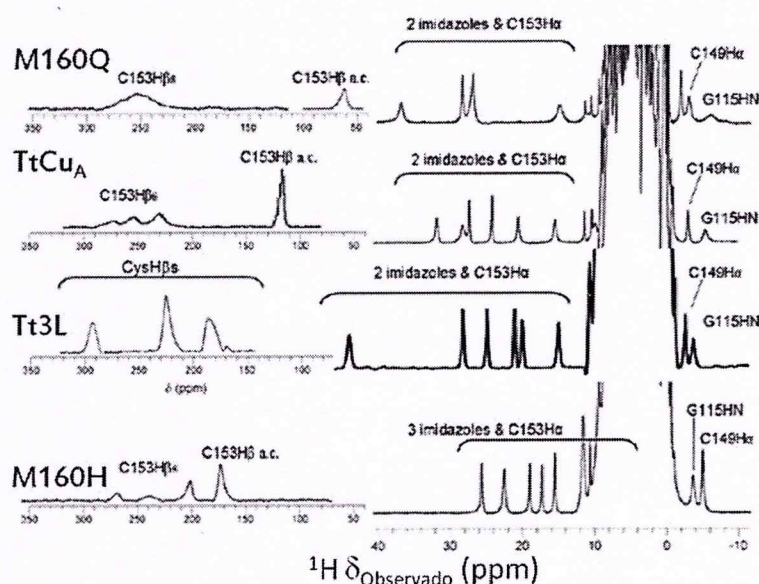


Figura 27. Espectro de RMN ^1H paramagnético de la proteína Tt3L, en comparación con los obtenidos para la proteína salvaje y sus variantes mutagenizadas.

La asignación de las señales (Tabla 4) se realizó utilizando una estrategia previamente informada por nuestro laboratorio¹⁵⁹. El H ϵ 2 de la His114 puede asignarse rápidamente por ser una señal intercambiable que desaparece al momento de adquirir el espectro en solución en D₂O (Figura 29), luego confirmada mediante una correlación de HMQC ^1H - ^{15}N que permite localizar la señal del N imidazólico unido (Figura 30). A partir de esta señal se pudieron asignar los protones H δ 2 y H ϵ 1 de la His 114 mediante espectros bidimensionales de NOESY (Figura 31). Finalmente, se asignaron por analogía las dos señales restantes al H δ 2 y H ϵ 1 de la His157 por comparación de la posición de las señales en el espectro de la mutante M160H que tiene un espectro electrónico similar a Tt3L indicando que la población en el estado π_u es similar. No se encontraron conexiones entre los protones pertenecientes a la His157, dado que el H ϵ 2 perteneciente a esta Histidina no se observa en el espectro debido a que se encuentra en una tasa de intercambio intermedia¹⁷².

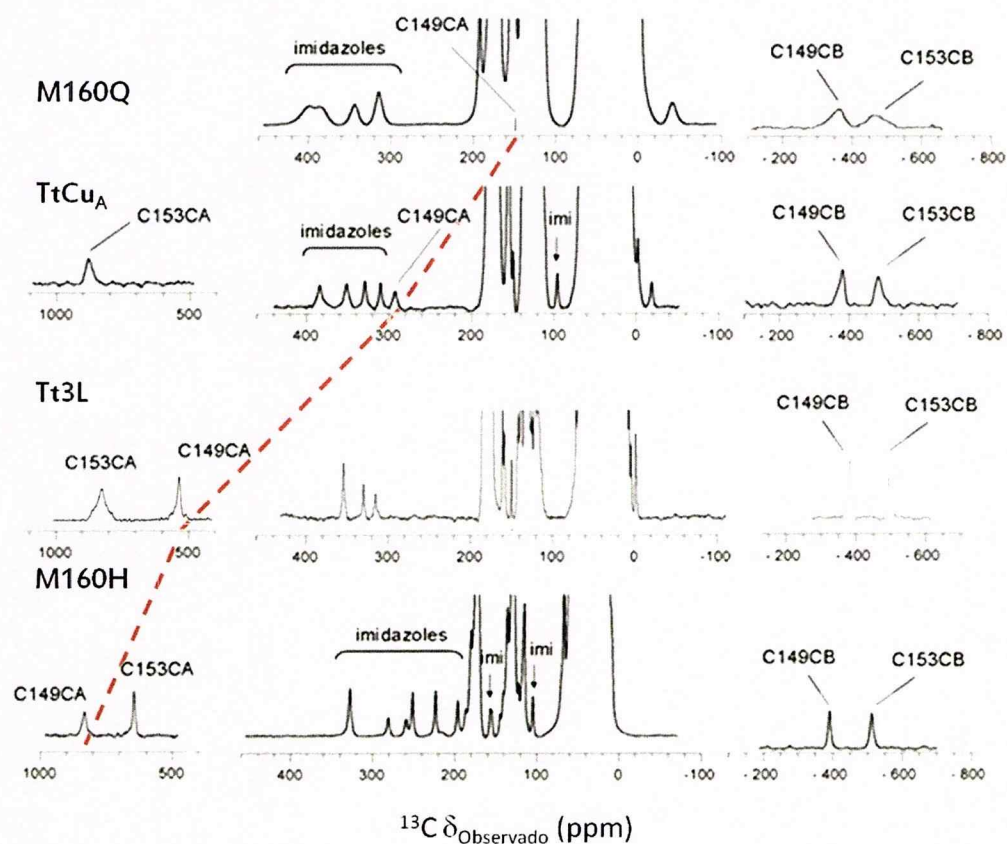


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C paramagnético de la proteína Tt3L, en comparación con los obtenidos para la variante salvaje y sus variantes mutagenizadas. En rojo se marca el corrimiento de la señal correspondiente al C α de la Cys149.

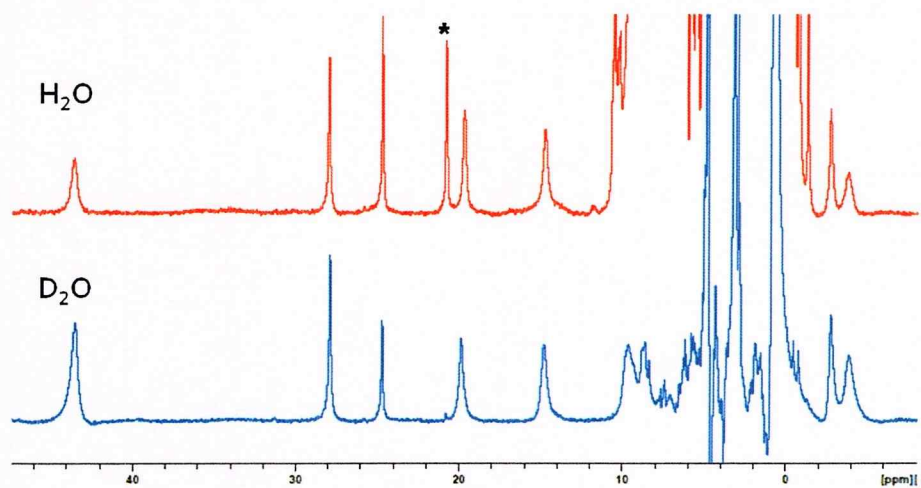


Figura 29. Espectros de ^1H paramagnético en agua (rojo) y en buffer preparado en D $_2$ O (azul) mostrando la desaparición de la señal correspondiente al H ϵ 2-His114 a 21ppm (*).

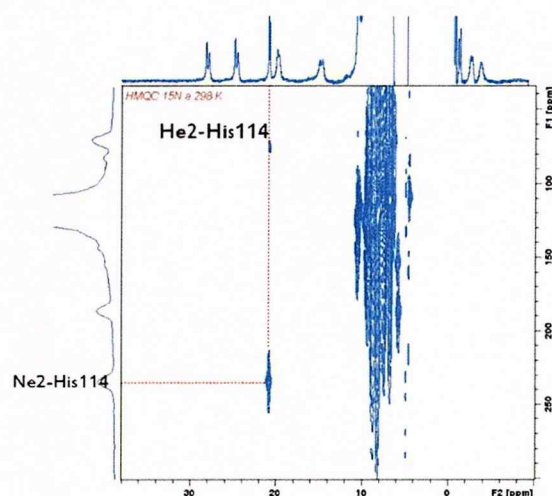


Figura 30. Espectro ^1H - ^{15}N HMQC de la proteína Tt3L en H_2O , confirmando que el protón intercambiable corresponde a un protón unido a nitrógeno.

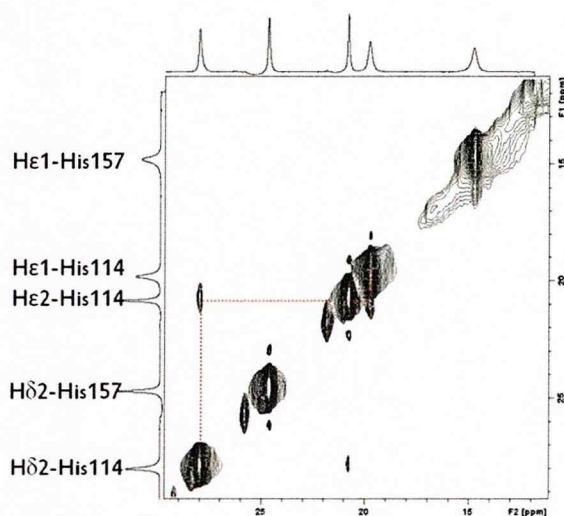


Figura 31. Espectro ^1H - ^1H NOESY de la proteína Tt3L mostrando las conexiones entre los protones pertenecientes a la His114.

Las señales de los carbonos pudieron ser asignadas mediante experimentos bidimensionales ^1H - ^{13}C HMQC del cual se asignaron específicamente los $\text{C}\delta$ y $\text{C}\epsilon$ de las dos His y el $\text{C}\alpha$ de la Cys 149. Debido a que las mutantes de TtCu_A preservan los desplazamientos de las señales, el resto de las señales fueron asignadas por analogía con las asignaciones de la proteína M160H, la cual posee una distorsión en la estructura electrónica similar a Tt3L (Figura 32).

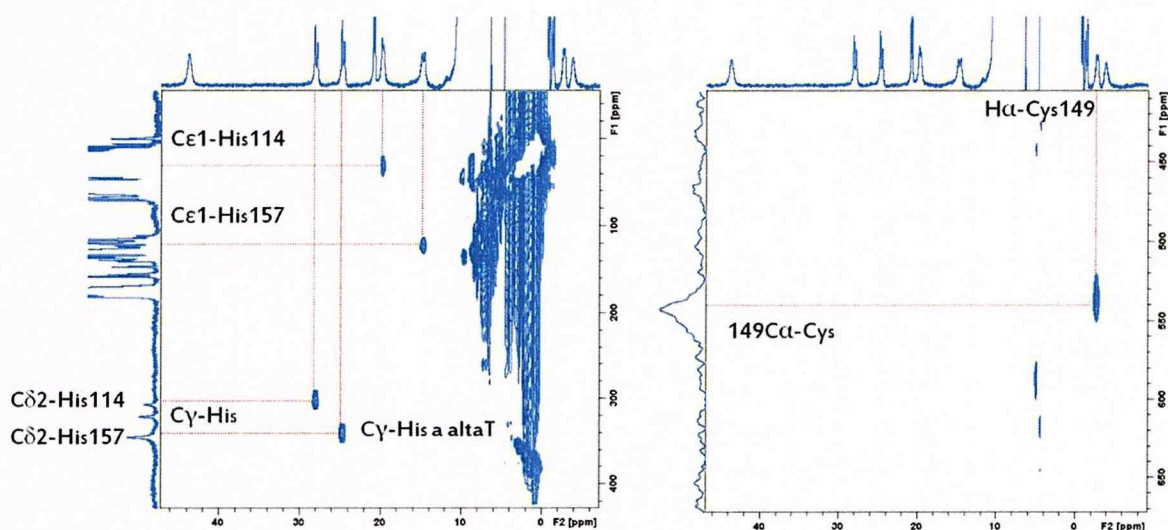


Figura 32. Espectros de asignación paramagnético ^1H - ^{13}C HMQC de la proteína Tt3L

Tabla 5. Resumen de la asignación de las señales hiperdesplazadas en la proteína Tt3L. Las señales marcadas con * fueron asignadas por analogía a las mutantes ya estudiadas.

Resonancia	Núcleo	$\delta_{\text{Observado}}$ (ppm)	Ancho a media altura (Hz)	Dependencia con la Temperatura
A	C α – Cys 153	832	4517	Hiper-Curie
B	C α – Cys 149	539	1130	Anti-Curie
C	C δ 2 – His 157	521	521	Hipo-Curie
D	C γ – His*	Aparece a alta T	ND	Hiper-Curie
E	C γ – His*	321	ND	T-indep
F	C δ 2 – His 114	306	407	Curie
G	C ϵ 1 – His 157	123	ND	ND
H	C ϵ 1 – His 114	32	ND	ND
Y	C β – Cys 149	-390	1573	Hiper-Curie
Z	C β – Cys 153	-500	1881	Curie
a	H α – Cys 153	43,72	236	Hipo-Curie
b	H δ 2 – His 114	28,01	86	Hipo-Curie
c	H δ 2 – His 157*	24,70	73	Hipo-Curie
d	H ϵ 2 – His 114	20,81	65	Hipo-Curie
e	H ϵ 1 – His 114	19,77	138	Hiper-Curie
f	H ϵ 1 – His 157*	14,75	164	Curie
g	H α – Cys 149	-2,67	121	Hiper-Curie
h	HN – Gly 115	-3,82	230	Hiper-Curie
i	H β – Cys *	293,3	5680	Curie
j	H β – Cys*	222,3	3496	Hiper-Curie
k	H β – Cys*	Aparece a alta T	ND	Anti-Curie
l	H β – Cys*	167,6	3641	Hiper-Curie

4.6. Dependencia con la temperatura de las señales hiperdesplazadas

El $\delta_{\text{observado}}$ de cada una de las señales resulta del acoplamiento hiperfino del espín nuclear en cuestión con el espín electrónico. Este acoplamiento (A/h ,

con unidad de MHz) resulta en una contribución “de contacto” o de Fermi al desplazamiento químico (δ_{Contacto}) de la correspondiente señal de RMN, proporcional a la densidad de espín electrónico presente sobre el núcleo. La relación matemática entre A/h y δ_{Contacto} está dada por¹⁷³:

Ecuación 4-2

$$\frac{A}{h} = \frac{3\gamma k_B \delta_{\text{Contacto}} T}{2\pi \bar{g} \mu_B S(S+1)}$$

donde γ es la constante giromagnética del núcleo, k_B es la constante de Boltzmann, $\bar{g}$ es el promedio de las componentes del tensor $\mathbf{g}$, μ_B es el magnetón de Bohr, S es el espín electrónico (1/2 para el centro Cu_A oxidado) y T es la temperatura absoluta. Esta ecuación es sólo válida para estados de espín aislados, lo cual no es el caso del centro Cu_A ya que existen dos estados fundamentales alternativos poblados a temperatura ambiente. Es por esto que hemos utilizado esta ecuación sólo para calcular valores de acoplamiento aparentes ($(A/h)_{\text{ap}}$).

El desplazamiento de contacto (δ_{Contacto}) puede ser calculado a partir del desplazamiento químico observado, el diamagnético, y el de pseudocontacto, según¹⁶⁰:

Ecuación 4-3

$$\delta_{\text{Contacto}} = \delta_{\text{Observado}} - \delta_{\text{Diamagnético}} - \delta_{\text{Pseudocontacto}}$$

Los $\delta_{\text{Diamagnéticos}}$ corresponden al desplazamiento de las señales en caso que el centro se encuentra totalmente reducido (Cu^{+1} - Cu^{+1}), mientras que los $\delta_{\text{Pseudocontacto}}$ pueden calcularse a partir de datos de EPR mediante la ecuación¹⁶⁰:

Ecuación 4-4

$$\delta_{pc} = \frac{\mu_0 \mu_B^2 S(S+1)}{4\pi 9k_B T r^2} (3\cos^2\theta - 1)(g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2)$$

donde μ_0 es la permeabilidad del vacío, r es el módulo del vector $\mathbf{r}$ que conecta el núcleo con el centro de coordenadas de los dos iones cobre, θ es el ángulo entre el

componente z del tensor $\mathbf{g}$ y el vector $\mathbf{r}$, y $g_{\parallel}$ y $g_{\perp}$ son las componentes paralela y perpendicular del tensor $\mathbf{g}$. Los $\delta_{\text{pseudocontacto}}$ resultan muy pequeños (aun menores que $\delta_{\text{Diamagnético}}$), debido a la baja anisotropía de $\mathbf{g}$ de los sitios paramagnéticos de Cu, incluido Cu_A , por lo que pueden ser considerados nulos para este tipo de cálculos¹⁵⁴.

Normalmente, el efecto paramagnético de un electrón desapareado disminuye con la temperatura, resultando en líneas más delgadas y más cercanas a la zona diamagnética. Esto resulta en una dependencia lineal del desplazamiento químico con la inversa de la temperatura, es decir, el sistema obedece la ley de Curie y, cuando $1/T$ tiende a 0, el desplazamiento químico tiende al valor diamagnético. La ocurrencia de tendencias “no Curie” como las mostradas en la Figura 33 indica que el sistema explora niveles electrónicos o conformacionales con distintos desplazamientos químicos, que se promedian a cada temperatura según cuan poblado está cada estado¹⁶⁶.

En todos los centros Cu_A estudiados hasta la fecha se ha observado que los desplazamientos químicos de casi todas las señales presentan una dependencia anómala con la temperatura (es decir, que se desvía de la ley de Curie) (Figura 33). Estos comportamientos indican la presencia de un estado alternativo al fundamental accesible a temperatura ambiente, por ejemplo una conformación alternativa o como en el caso del centro Cu_A otro nivel electrónico. En este caso como se muestra en la Figura 34 y en la Tabla 5, la proteína Tt3L presenta un gran número de señales de ^1H y ^{13}C que exhiben comportamientos desviados de la Ley de Curie.

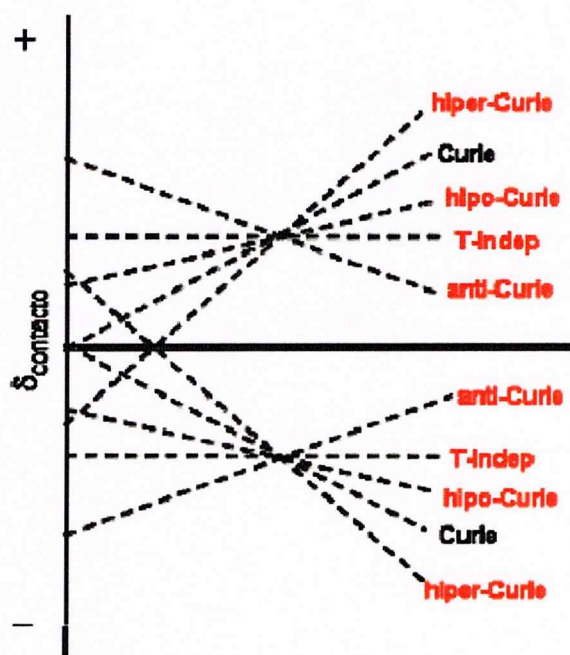


Figura 33. Comportamientos de los δ_{Contacto} que no siguen un comportamiento de tipo Curie (Negro) con la inversa de la temperatura indicándola presencia de niveles excitados accesibles

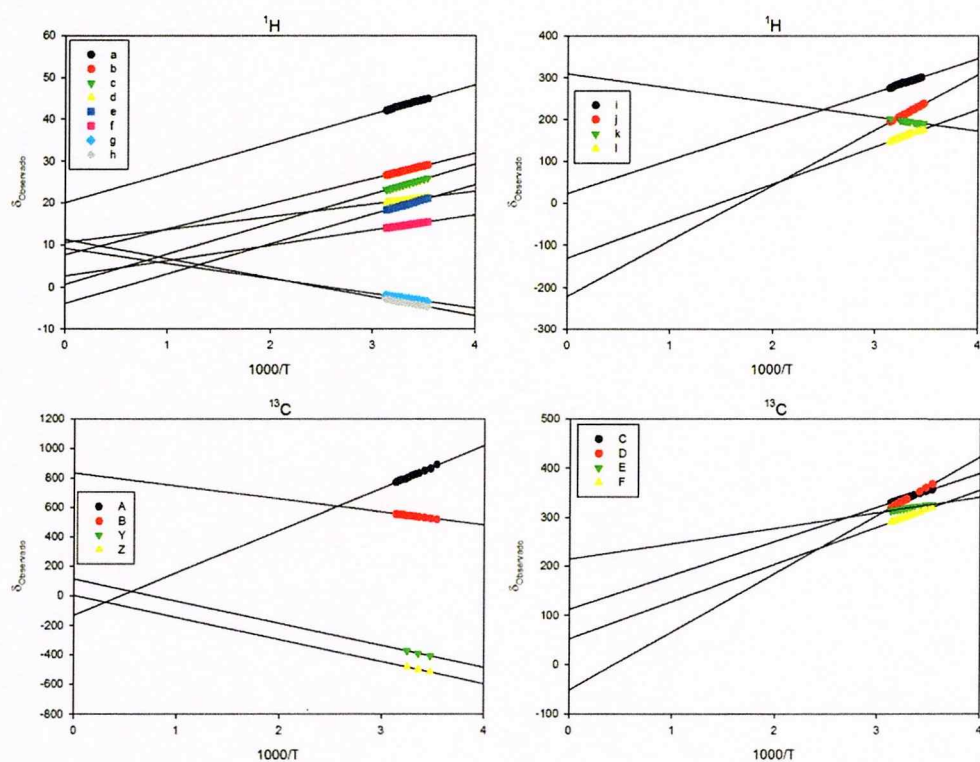


Figura 34. Dependencia de los $\delta_{\text{observados}}$ con la inversa de la temperatura.

En este caso, la rigidez del sitio permite descartar cambios conformacionales y el desvío de la ley de Curie ha sido explicado asumiendo la población de dos estados electrónicos alternativos a temperatura ambiente, cuya distribución puede ser descripta por la ley de Boltzmann. En base a esta suposición, el desplazamiento de contacto para el núcleo k en equilibrio entre dos estados se puede expresar de la siguiente manera^{160,174}:

Ecuación 4-5

$$\delta_{Contacto,k} = \frac{1}{T} \frac{f_{k,1} + f_{k,2} e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}}}{1 + e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}}}$$

donde $f_{k,i}$ es la contribución de cada estado ($i=1,2$) al desplazamiento químico de la señal k y ΔE es la separación de energía entre los dos estados, T es la temperatura absoluta y k_B es la constante de Boltzmann ($0,69 \text{ cm}^{-1} \text{ K}^{-1}$). La forma de esta ecuación es tal que, en el rango de temperatura factible de trabajar con soluciones de proteína termoestables los datos son prácticamente lineales. Esto conduce a una convergencia muy pobre del ajuste cuando no se utilizan datos de buena calidad, resultando en parámetros con errores grandes. La inclusión de la mayor cantidad posible de señales, preferentemente angostas, y la exploración del rango de temperaturas a intervalos pequeños, es necesario para lograr un ajuste estable con errores razonables en los parámetros obtenidos. Este enfoque fue empleado en distintas oportunidades para analizar el comportamiento de los sitios Cu_A , pero recurriendo a pocas señales e incorrectamente asignadas, lo cual dio lugar a valores inexactos de ΔE ^{109,141,175,176}. En nuestro laboratorio realizamos una asignación completa, residuo específica y estéreo-selectiva de todos los núcleos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N de la variante $T\text{Cu}_A$, que nos permitió no solamente poder determinar de manera precisa el ΔE , sino también confirmar que corresponde a la diferencia de energía entre los niveles σ_u^* y π_u mencionados anteriormente que no depende de la distancia Cu-Cu (Figura 35)^{106,159}.

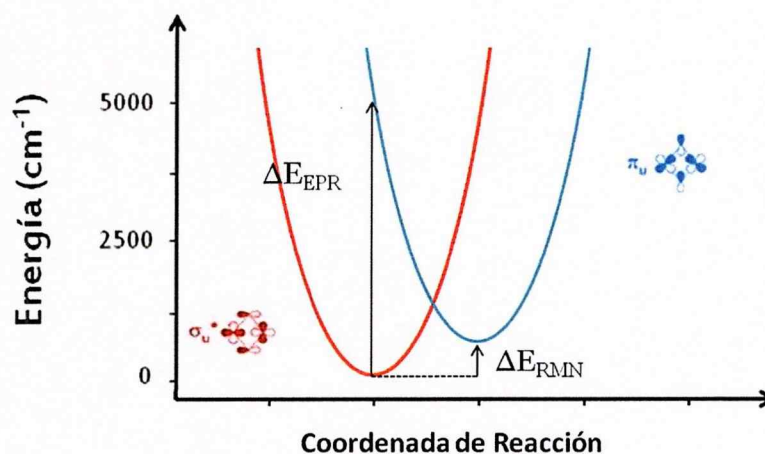


Figura 35. Perfil de potencial de los orbitales electrónicos del centro Cu_A a una misma distancia Cu-Cu, establecido a partir de los resultados con las mutantes de TtCu_A

Para proceder con el cálculo del $\Delta E_{\sigma/\pi}$ según la Ecuación 4-5, es necesario conocer los desplazamientos químicos diamagnéticos de las distintas señales. Varios de ellos ya eran conocidos a partir de los experimentos de asignación de la proteína Tt3L en su forma reducida (Ver 6.1.). Para el resto de las señales se realizaron experimentos de transferencia de la saturación, donde trabajando con un porcentaje de la proteína en el estado reducido, se pueden correlacionar los desplazamientos químicos de la forma oxidada en equilibrio con los del estado reducido. Sin embargo, no pudimos observar transferencias de la saturación efectivas en ninguna de las condiciones ensayadas, por lo que no se pudieron determinar los $\delta_{\text{Diamagnéticos}}$ de las señales no detectadas en los espectros de triple resonancia.

Como estrategia alternativa se emplearon los $\delta_{\text{Diamagnéticos}}$ promedio de los núcleos observados extraídos de la base datos BMRB (por sus siglas en inglés *Biological Magnetic Resonance Data Bank*) ($\delta_{\text{Diamagnéticos}}^*$)¹⁷⁷, como en el caso de los C γ de los residuos de His. Para controlar la calidad del ajuste se repitieron los cálculos excluyendo las dependencias de señales al azar de a uno o de a grupos, y se variaron dentro del rango permitido los $\delta_{\text{Diamagnéticos}}^*$, observando que el cálculo no se veía severamente afectado.

A partir del ajuste de todas las señales se estimó un $\Delta E_{\sigma/\pi}$ de $240 \pm 60 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde a una población de 76:24 de los niveles σ_u^* y π_u , confirmando la conclusión obtenida a partir del espectro electrónico de esta variante¹¹¹. Además, se el desplazamiento del C α de la Cys149, es un indicador de la población del estado π_u (Figura 28)¹⁰⁶. La deslocalización electrónica aumenta notablemente sobre este núcleo en el estado π_u , lo que produce mayores desplazamientos químicos. En el caso de la proteína Tt3L este núcleo se encuentra en una posición intermedia entre la proteína salvaje y la mutante M160H, actuando como sonda interna de la alteración de la estructura electrónica del centro Cu_A.

Este resultado llama la atención dado que en este caso, al contrario de la mutante M160H, se conservan todos los ligandos y la separación entre los mismos, sin embargo se observa una disminución del $\Delta E_{\sigma/\pi}$, indicando que cambios en la segunda esfera de coordinación pueden modular la estructura electrónica de centro Cu_A.

4.7. Electroquímica de Tt3L

Ulises Zitare del grupo colaborador del Dr. Daniel Murgida realizó las medidas para determinar los parámetros electroquímicos de la mutante Tt3L, para evaluar la capacidad de transferencia electrónica de la misma. Para la proteína TtCu_A y sus mutantes se determinaron las velocidades TE, el ΔG° y λ . Tanto las energías de reorganización, y la fuerza impulsora, que depende del potencial de reducción de las mismas, se ven afectadas en las distintas mutantes (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros electroquímicos determinados para la proteína TtCu_A y sus variantes mutagenizadas

Variante	$\lambda_{\text{experimental}}$ (eV)	E° (mV)	k_{TE} (s ⁻¹)
M160H	0,60	148	3600
TtCu _A	0,29	293	3200
M160Q	0,45	158	3100
Tt3L	0,62	281	2750

El potencial de reducción determinado por voltametría cíclica en solución fue de 281 ± 8 mV, ligeramente más bajo que el determinado para la proteína salvaje (293 mV)^{111,112}. Esto significa que la presencia de los mismos ligandos dentro de la estructura de la proteína mutante conserva el potencial de reducción. Este resultado es importante desde el punto de vista funcional, dado que todas las citocromo *c* oxidasas, comparten los mismos pares redox por lo que es de esperar que la fuerza impulsora de las reacciones redox en las que se encuentra involucrada se mantenga.

Por otro lado se determinó un $\lambda = 0.62 \pm 0.05$ eV, similar al de la mutante M160H y típico de proteínas con una población en el estado σ_p incrementada. Sin embargo la capacidad de transferencia electrónica se mantiene constante en el mismo orden que para el caso de la proteína salvaje al igual que el caso de la mutante M160H (Figura 36).

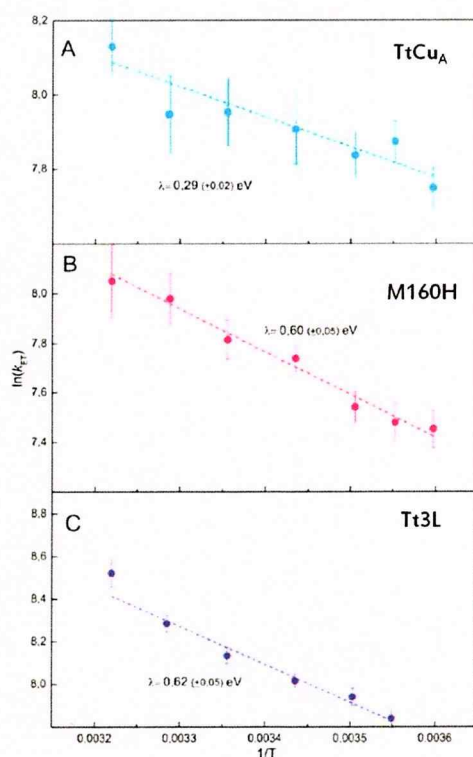


Figura 36. Diagrama de Arrhenius para las proteínas TtCu_A (A), M160H (B) y Tt3L (C) obtenidas a pH5,5.

Como se discutió anteriormente, según la teoría semiclásica de Marcus (Ecuación 1-1) para entender las reacciones de TE, para optimizar la transferencia se debe minimizar λ para optimizar la transferencia. Dado que la fuerza impulsora (ΔG°) para la reacción es la misma tanto para Tt3L como para TtCu_A, la conservación de la velocidad de TE en la mutante Tt3L se debería a un aumento en H_{AB} debido a la activación del estado π_u al igual que sucede con la proteína M160H.

4.8. Discusión

La estructura electrónica del centro Cu_A nativo puede ser descrita por dos estados fundamentales alternativos, σ_u^* y π_u , separados por una pequeña diferencia de energía ($\Delta E \sim k_B T$) y en rápido intercambio. Ambos estados coexisten con una estructura muy similar, lo que permite su interconversión con cambios nucleares mínimos. El estado σ_u^* suele ser el de menor energía, y por lo tanto es el más poblado, lo que ha llevado a cuestionar el papel del estado π_u ¹⁴⁵.

Las mutantes del centro estudiadas hasta el momento, implicaban cambios en el residuo de Met160, que es un ligando del sitio metálico. La modificación de la identidad de este ligando produce cambios en la estructura electrónica, modulando la población en el estado excitado π_u a temperatura ambiente. El estudio de estas mutantes permitió demostrar que un aumento en la población del estado π_u no es perjudicial para las reacciones de TE, a pesar de estar caracterizado por una mayor energía de reorganización (λ)¹⁰⁶.

El estudio de las mutantes en la posición Met160 es de interés, pero no representa ningún sitio presente naturalmente, ya que todas las proteínas con centros Cu_A conservan los mismos residuos de coordinación al metal. En este capítulo describimos el estudio de la estructura electrónica de la proteína quimérica Tt3L, que mantiene todos los residuos de coordinación y la longitud de los bucles de unión al metal con respecto a TtCu_A. No obstante, vemos que estas pequeñas perturbaciones son capaces de alterar la población de los estados σ_u^* y π_u .

El análisis de las distintas espectroscopías realizadas sobre la proteína Tt3L en su forma oxidada indica que a temperatura ambiente, tiene un 23% del estado π_u , valor comparable con mutante M160H (27%). En el espectro electrónico se observa un incremento de la banda a 28000cm^{-1} indicando la presencia de un aumento de la banda de TC (S(Cys) $\rightarrow$ Cu) π_u acoplado a la disminución de las bandas TC (S(Cys) $\rightarrow$ Cu) σ_u . Esta observación se condice con los datos de EPR y RMN, que efectivamente revelan que la diferencia de energía entre estos dos niveles es mucho menor que en la proteína nativa, de acuerdo con la mayor población del estado π_u . La Figura 37 muestra que tanto la espectroscopia de absorción como de RMN permiten estimar la relación de poblaciones con un alto grado de certeza. Por otra parte, el espectro de EPR confirma que esta perturbación tiene lugar sin que se pierda el carácter de valencia mixta deslocalizada. Finalmente, la espectroscopia EXAFS y la posición de la banda de intervalencia en el espectro de absorción indican que estos cambios ocurren sin que tenga lugar un aumento en la distancia Cu-Cu, es decir que los cambios geométricos son mínimos, sugiriendo un equilibrio con mínima o nula barrera de activación.

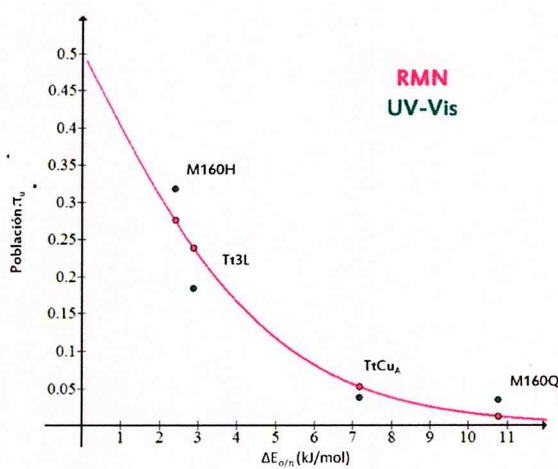


Figura 37. Correlación entre los $\Delta E_{\sigma/\pi}$ calculados por RMN y UV-Vis, asumiendo la presencia de dos estados.

La presencia de esta distorsión en la mutante Tt3L implica que cambios sutiles en la red de puentes de hidrógeno que rodean al centro metálico permiten modular la estructura electrónica del centro teniendo un efecto similar a la

mutante M160H, por lo que el centro Cu_A a pesar de ser rígido, tiene una estructura electrónica que se puede modular más finamente a partir de pequeños cambios, lo cual es compatible con el modelo aquí planteado.

Finalmente, vemos que el potencial de reducción no se ve severamente afectado por estas perturbaciones de segunda esfera, a pesar de que afecta las velocidades de transferencia impactando tanto en la energía de reorganización como en el acoplamiento electrónico donador-aceptor. En general, podemos concluir que el estado π_u posee una mayor energía de reorganización que el estado σ_u^* , pero que el mismo es activo en transferencia electrónica porque exhibe un mayor acoplamiento electrónico. Por lo tanto, ambos estados podrían cumplir roles importantes en la transferencia electrónica en las oxidasas. La observación de que sus poblaciones cambian sin mayor cambio energético ni geométrico global favorece la hipótesis de una rápida interconversión entre los mismos.

4.9. Perspectivas

4.9.1. Efecto de mutantes de primera esfera de Tt3L

Un próximo objetivo es aprovechar nuestra capacidad de modular la brecha de energía entre los dos niveles para generar variantes que posean los dos estados electrónicos degenerados, o invertir la relación de poblaciones, con un estado π_u mayoritario. El grupo de Yi Lu (Urbana-Champaign) en proteínas de cobre redox ha demostrado que la combinación de mutaciones de primera y segunda esfera presenta efectos aditivos sobre el potencial redox¹⁷⁸. Nosotros intentaremos explorar la combinación de mutaciones de primera y segunda esfera en el sitio Cu_A para verificar si esta aditividad también se cumple en la modulación del $\Delta E_{\sigma/\pi}$.

En este momento en el laboratorio se cuenta con una mutante de TtCu_A que presenta una marcada dependencia de las poblaciones en los distintos estados energéticos con el pH, logrando invertir los niveles energéticos a pH alto (población $\pi_u > 50\%$) y mutantes M160X sobre la base de Tt3L para estudiar el efecto de las mismas en la estructura electrónica de Tt3L.

4.9.2. Sobre la densidad electrónica en la Met axial

Estudios de RMN de nuestro grupo en la mutante M160H revelaron que el residuo His160 en la posición axial posee densidad electrónica, que atribuimos a una mezcla del orbital d_z^2 con el $d_{x^2-y^2}$ en el estado π_u ante la perturbación axial¹⁰⁶. Sin embargo, cálculos QM-MM realizados por el grupo de Solomon en la proteína quimérica Cu_A-Azurina, no predicen densidad electrónica sobre la Met axial en ninguno de los estados energéticos¹⁷⁹. Sin embargo, la proteína Cu_A-Azurina presenta una distancia Cu-S(Met) de 2.9 Å, mientras que los sitios Cu_A nativos en las subunidades COX II estudiadas presentan distancias más cortas, entre 2,4 y 2,6 Å, lo que podría explicar esta discrepancia. De todos modos no existe evidencia experimental que apoye alguna de estas hipótesis.

La RMN permite identificar la presencia de densidad electrónica en los núcleos de ligandos en el estado oxidado de Cu_A, como hemos discutido. Sin embargo, en casos en los cuales esta densidad sea pequeña (como esperamos que sea en el caso del ligando Met), las señales de RMN pueden estar ocultas en la región diamagnética, dificultando su localización. Por lo tanto, hemos preparado muestras de TtCu_A y Tt3L con el residuo de Met marcado con ¹³C en el ε-CH₃ mediante expresión en medio de cultivo mínimo suplementado con ¹³C Metil - L - Met.

Experimentos preliminares muestran que la señal del ε-CH₃ seguida mediante espectros ¹H-¹³C HMQC muestra corrimientos respecto a su posición diamagnética en las variantes Cu_A en forma oxidada. Sin embargo, los desplazamientos son muy pequeños como para asumir que el $\delta_{\text{pseudocontacto}}$ es despreciable, tal como se hizo para las otras señales (Figura 38). Por lo tanto, para poder determinar el aporte de pseudocontacto al $\delta_{\text{Observado}}$ es necesario obtener la estructura cristalográfica de ambas proteínas, por lo que nos proponemos obtener la estructura cristalográfica de Tt3L para poder determinar el δ_{Contacto} y establecer experimentalmente la densidad electrónica sobre el residuo axial de Met y si esta aumenta en el estado π_u .

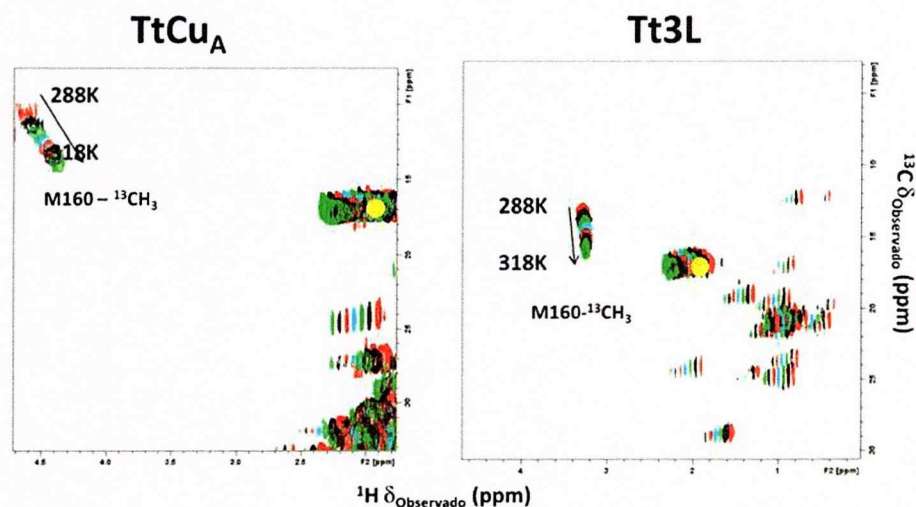


Figura 38. Espectros ^1H - ^{13}C HMQC de las proteínas TtCu_A y Tt3L marcadas específicamente con ^{13}C Metil – Met en su estado oxidado, paramagnético. En amarillo se marca la posición de la señal correspondiente al metilo en el estado diamagnético.

4.9.3. Sobre los caminos en las reacciones de TE

La presencia de dos estados electrónicos alternativos poblados a temperatura ambiente en los centros Cu_A nos ha llevado a sugerir es que los mismos permiten direccionalidad en la transferencia electrónica con un costo energético mínimo¹⁰⁶. La principal diferencia entre los estados σ_u^* y π_u es la presencia de densidad electrónica sobre el residuo de Met axial en el estado π_u , que facilitaría el acceso de los electrones a partir del citocromo c al centro Cu_A (Figura 39). La observación de que mutaciones de segunda esfera permiten modular la población relativa de los dos niveles sin perturbar el potencial redox, sugiere que este mismo fenómeno puede tener lugar frente a otras pequeñas alteraciones, tales como la unión del citocromo c a la oxidasa, que ocurre en un sitio de la superficie de COX II un sitio cercano al centro Cu_A . Esta perturbación podría favorecer un aumento transiente de la población del estado π_u , aumentando el acoplamiento para la reacción de TE $\text{Cit } c \rightarrow \text{Cu}_A$ (Figura 39). Luego, al disociarse la molécula de citocromo c , el centro Cu_A reducido presentaría un estado que favorece la TE hacia el grupo hemo dentro de la subunidad COX I (Figura 39)^{106,111}.

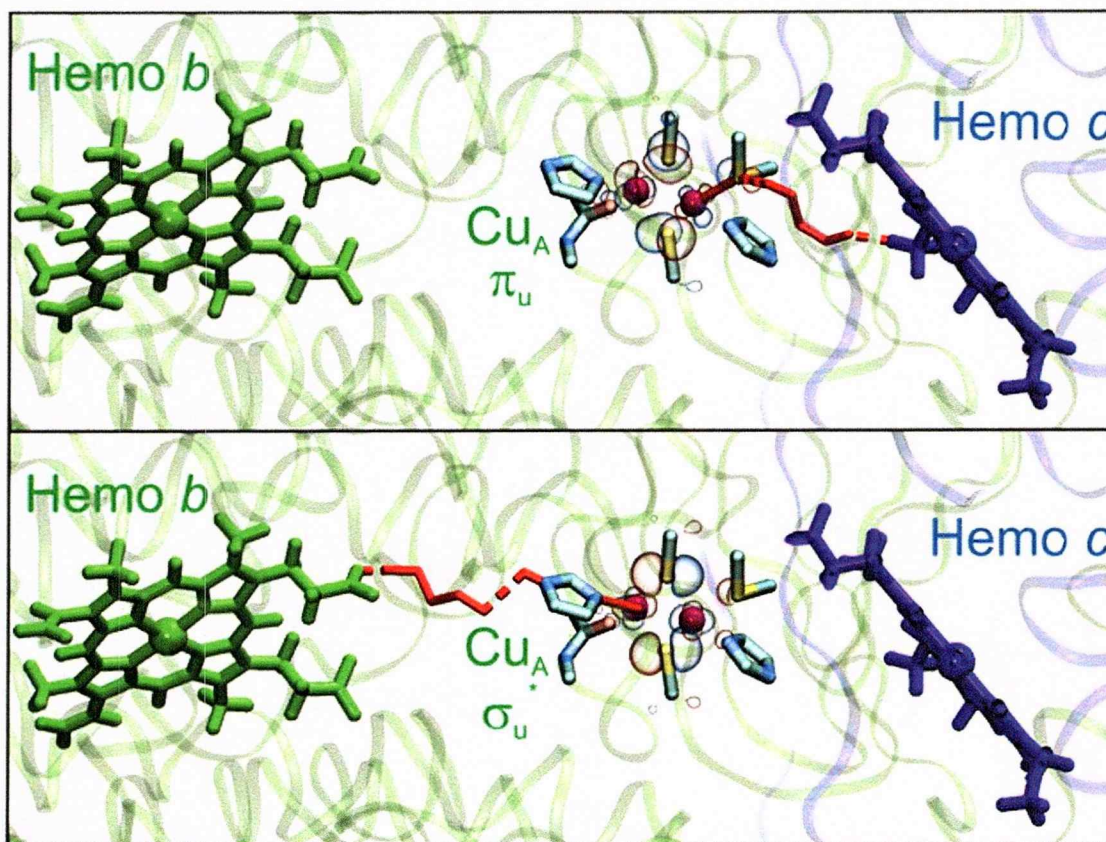


Figura 39. Caminos óptimos (Rojo) de TE desde el Cit *c* al centro Cu_A (Arriba) y desde el Cu_A al hemo *b* (abajo) en el complejo COX de *Thermus thermophilus*¹⁰⁶.

El mayor desafío del proyecto es realizar experimentos que permitan poner a prueba esta direccionalidad. Hasta el momento, todas las medidas electroquímicas se hicieron con muestras de proteína adsorbida sobre electrodos o en solución, es decir en un ensamble de distintas conformaciones adsorbidas. Para poder estudiar individualmente cada una de las reacciones de TE, nos proponemos anclar la proteína TiCu_A y sus mutantes a los electrodos de forma direccional, mediante ingeniería de residuos de Cys en la superficie de la proteína que permitan un anclaje orientado de la misma a los electrodos. Esta estrategia permitiría explorar la eficiencia relativa de los distintos caminos y estados electrónicos en la direccionalidad de la transferencia electrónica a distancia.

Capítulo 5. Efecto del pH en la estructura electrónica del centro Cu_A

La reducción del oxígeno molecular catalizada por COX es una de las principales reacciones que sostienen la vida en organismos aeróbicos. La reducción se encuentra acoplada a la producción de un gradiente de protones, que es luego utilizado para la síntesis de ATP, la fuente de energía para muchos procesos biológicos^{68,180}. Los electrones ingresan a COX a través del sitio Cu_A en COX II, luego son transferidos al hemo *a/b* según la especie, y por último son transferidos al centro hemo *a₃*-Cu_B donde se requieren cuatro e⁻ para la reducción del oxígeno molecular. Todas estas reacciones tienen fuerzas impulsoras muy bajas 20mV entre el citocromo *c* y el centro Cu_A^{110,181} y 10mV entre el Cu_A y el hemo *a/b*^{182,183}. Por lo tanto cualquier cambio en el potencial de reducción del centro puede afectar severamente las reacciones.

El gradiente de protones generado cuando se reduce la molécula de O₂ puede generar valores de pH extremos localmente cerca de la superficie de la membrana, los cuales pueden alterar la estructura electrónica del centro. El grupo de Yi Lu demostró que el potencial de reducción de la proteína quimérica Cu_A-Azurina presenta una fuerte dependencia con el pH, llegando a aumentar en 180mV a pH 4 con respecto al valor medido a pH 7⁹¹. Esta dependencia del potencial con el pH fue asignada a la protonación del ligando His120 (His157 en *TtCu_A*), que induce la disociación del mismo del metal al cual se encuentra coordinado. Esta observación fue tomada como base para sugerir que este residuo podría cumplir un rol regulatorio en las reacciones de transferencia electrónica del complejo COX frente a cambios de pH locales. En el caso que se encuentre deprotonada sería capaz de recibir los electrones del citocromo *c* y una disminución del pH localmente podría provocar la protonación de la misma, con el concomitante aumento del potencial de reducción que le permitiría reducir al hemo *a/b* con alta eficiencia.

Sin embargo, trabajos de nuestro laboratorio con la proteína *TtCu_A*, con un centro Cu_A nativo mostraron el pH tiene un efecto menor en el potencial de

reducción (incremento de 15mV a pH 4 respecto a pH 7), y pudimos descartar que tenga lugar una disociación de un ligando His del sitio metálico¹⁷².

Estudios electroquímicos realizados por Ulises Zitare con $TtCu_A$, sus variantes M160X y Tt3L mostraron que el potencial de reducción no es mayormente alterado por cambios de pH en ninguna de las mutantes tal como se observó para la proteína salvaje. Sin embargo hay cambios muy marcados en la velocidad de TE (k_{TE}), siendo la mutante M160H la que tiene el mayor incremento a pH neutro con respecto a la velocidad a pH ácido (Figura 40).

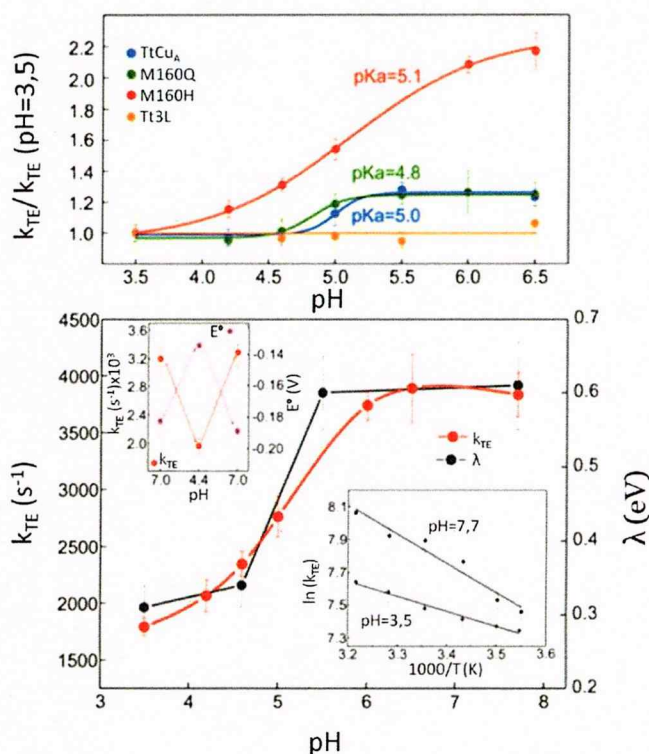


Figura 40. Incremento de la k_{TE} de las variantes Cu_A con el aumento del pH. Se destaca en el recuadro de abajo la dependencia de λ y k_{TE} con el pH de la mutante M160H.

Sorprendentemente en la mutante M160H el aumento en k_{TE} se da junto con un aumento de λ (0,34 a 0,60 eV), lo que en principio estaría contradiciendo la teoría de Marcus (Figura 40 abajo)⁹⁶.

Por lo discutido en el capítulo anterior, el cambio en λ indicaría que a pH ácido habría un aumento del $\Delta E_{\sigma/\pi}$ (aumento de población σ_u^*)¹⁴⁵, por lo que

decidimos estudiar por distintas espectroscopías la estructura electrónica del centro Cu_A en estas variantes en función del pH.

5.1. Estructura electrónica en función del pH de la mutante M160H de $Tt\text{Cu}_A$

Realizamos distintos estudios espectroscópicos en función del pH para analizar el efecto de la transición en la estructura electrónica del sitio metálico. Al bajar el pH, los espectros UV-Vis muestran la misma tendencia que se observa al bajar la temperatura (Figura 41): disminuye la relación de intensidades entre la bandas de altas energías a 28000 cm^{-1} correspondientes a la suma de las bandas de CT $\text{N}(\text{His}) \rightarrow \text{Cu}$ y $[\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}] \pi_u$ con respecto a la intensidad de las bandas alrededor de 20000 cm^{-1} de la TC $\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}$. No se observan cambios en la posición de la banda de intervalencia, indicando que se preserva la distancia Cu-Cu. En base a lo discutido en el capítulo anterior, estos resultados indican que al bajar en pH hay una menor población del estado π_u .

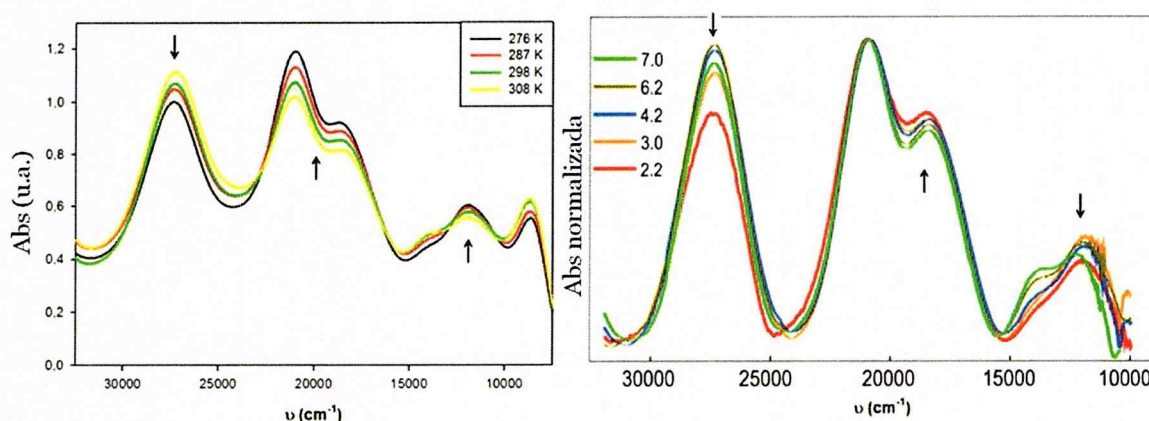


Figura 41. Dependencia de la temperatura (Izquierda) y del pH (derecha) del espectro electrónico de la mutante M160H. Los espectros dependiendo del pH fueron normalizados con respecto a la banda a 21000 cm^{-1} .

Se realizaron espectros de EPR de la proteína M160H en función del pH, que permitieron corroborar que el centro Cu_A se mantiene en estado de valencia mixta deslocalizada a los pH de trabajo (Figura 42). Los datos del ajuste de los experimentos se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 7. Resumen de los Ajustes de los espectros de EPR de la mutante M160H en función del pH

pH	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//}$	$A_{\perp}$	$\Delta E_{\sigma/\pi}$ EPR (cm^{-1})
7	2,219	2,02 1,96	60	40 40	4125
5	2,219	2,02 1,97	60	40 40	4125
4,5	2,212	2,01 1,96	60	40 40	4261
3,5	2,21	2,01 1,98	60	40 40	4302

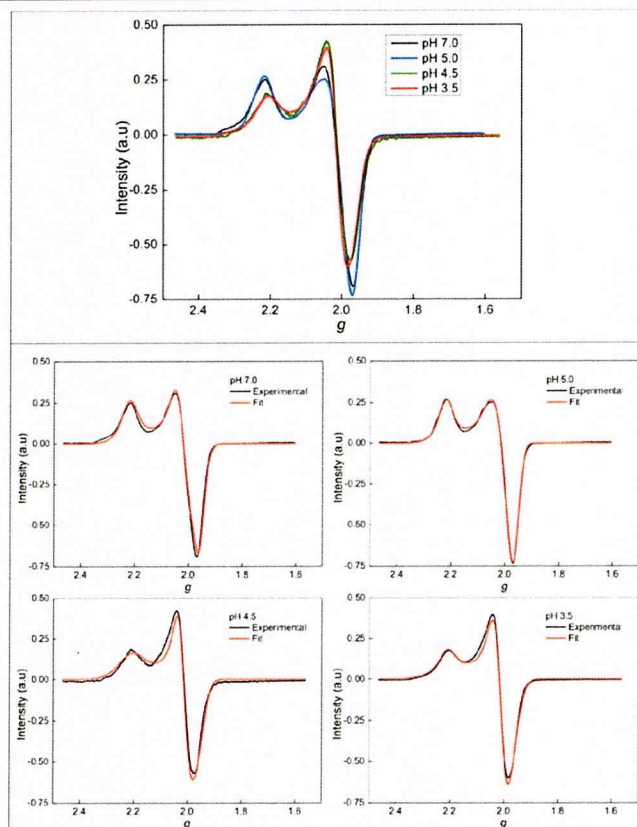


Figura 42 Espectros de EPR en función del pH de la mutante M160H de $TxCu_A$ Arriba. Panel inferior comparación de los datos experimentales con los simulados empleando Easyspin.

Los valores de $g_{//}$ disminuyen al aumentar el pH, sugiriendo un cambio en el $\Delta E_{\sigma/\pi}$. La diferencia de energía entre el nivel fundamental σ_u^* y el nivel excitado π_u es mayor a pH ácidos, a favor de la hipótesis de una mayor población del estado σ_u^* .

Finalmente, se adquirieron espectros de RMN de ^1H en la región paramagnética a bajo pH, siguiendo el desplazamiento de los $\text{H}\beta$ de los ligandos de Cys, que (como se discutió en el capítulo anterior) son las señales más sensibles a

cambios en la relación de poblaciones σ_u^* : π_u . Los experimentos se realizaron en solución en D₂O y a 283K para minimizar la precipitación de la proteína durante los tiempos de adquisición. Como se observa en la Figura 43, las señales correspondientes a los H β del ligando Cys153 sufren desplazamientos al disminuir el pH de la solución. Estos desplazamientos siguen la misma dirección que la observada al disminuir la temperatura (Figura 43), es decir equivalente a la población del estado de menor energía.

Por otra parte, a bajo pH se observan las señales correspondientes a ambos residuos de His en la región paramagnética, lo cual nos indica que las dos His continúan coordinadas al centro Cu_A, a diferencia de lo informado para Cu_A-azurina (Figura 44).

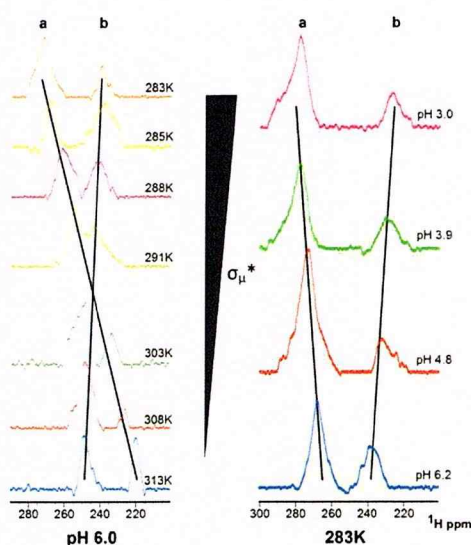


Figura 43. Dependencia de la Temperatura (Izquierda) y del pH (derecha) del desplazamiento de las señales correspondientes a los H β Cys153 de la mutante M160H de TxCu_A.

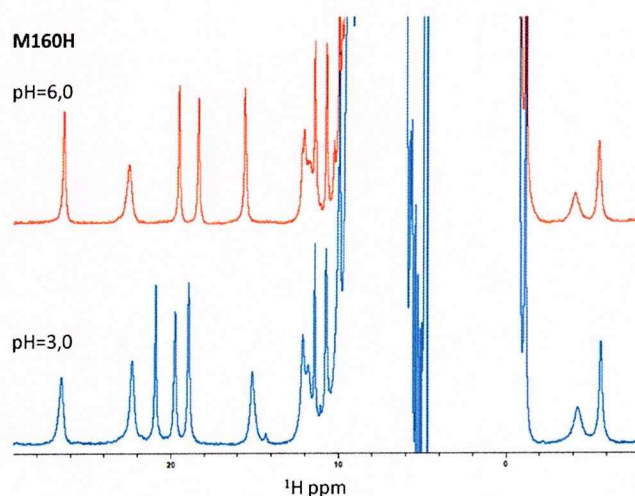


Figura 44. Dependencia del pH de la región de las His hiperdesplazadas de M160H.

Los espectros de RMN confirman que a bajo pH, la proteína M160H tiene un aumento en la población del estado σ_u^* . Concluimos por lo tanto que el estado σ_u^* se caracteriza por una menor energía de reorganización (λ) que el estado π_u . No obstante, el estado π_u se caracteriza por una mayor velocidad de transferencia electrónica a pesar del aumento de λ .

5.2. Dependencia del pH de las señales de His de la mutante M160Q

La transferencia electrónica de la mutante M160Q presenta un comportamiento similar de la k_{TE} con el pH que la mutante M160H. Sin embargo, el aumento en la velocidad es menos pronunciado que en la variante M160H, asemejándose más al fenómeno observado en la proteína $TtCu_A$ (Figura 40). Por su parte, el espectro UV-Vis no refleja grandes cambios en función del pH, sugiriendo que la diferencia de energía se mantiene a distintos valores de pH (Figura 45).

En el caso de esta mutante, las señales de los residuos de Cys en los espectros de RMN de 1H son de más difícil detección debido a los mayores anchos de banda, por lo cual no se pudieron realizar espectros a bajo pH. Sin embargo, los espectros en la región de las His muestran que ambas se mantienen unidas al centro Cu_A a lo largo de la titulación (Figura 46).

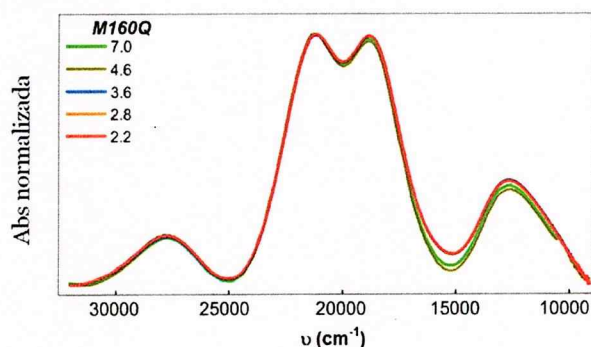


Figura 45. Dependencia del pH del espectro electrónico de la mutante M160Q. Los espectros normalizados respecto a la banda a 21000 cm^{-1} .

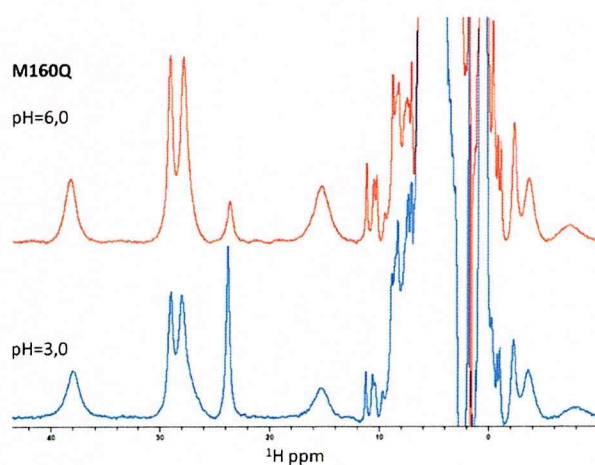


Figura 46. Dependencia del pH de la región de las His hiperdesplazadas de M160Q.

5.3. Dependencia del pH de la estructura electrónica de la mutante Tt3L

En el caso de la proteína Tt3L, la k_{TE} es insensible a cambios en el pH, a diferencia de las otras variantes analizadas de $TtCu_A$ (Figura 40). Por su parte, el espectro UV-Vis tampoco evidencia grandes cambios con el pH (Figura 47). Del mismo modo, las señales de los H β de los ligandos Cys en el espectro de RMN tampoco son sensibles a cambios en el pH (Figura 48), indicando que no se alteran las poblaciones de ambos estados electrónicos.

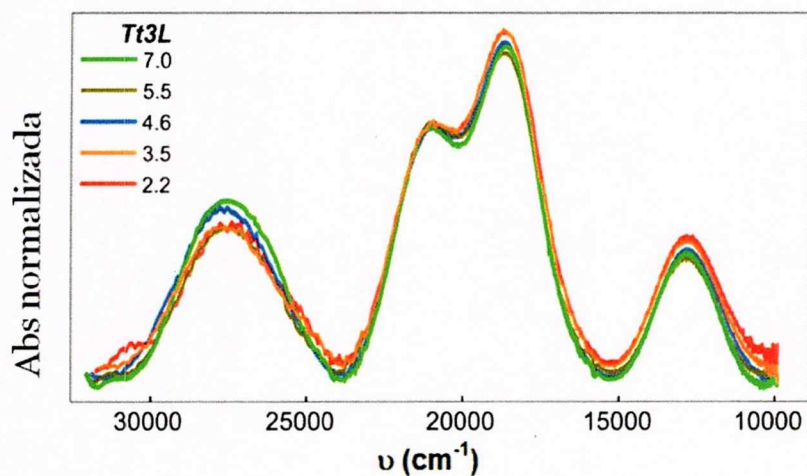


Figura 47. Dependencia del pH del espectro electrónico de la mutante Tt3L. Los espectros normalizados respecto a la banda a 21000 cm^{-1} .

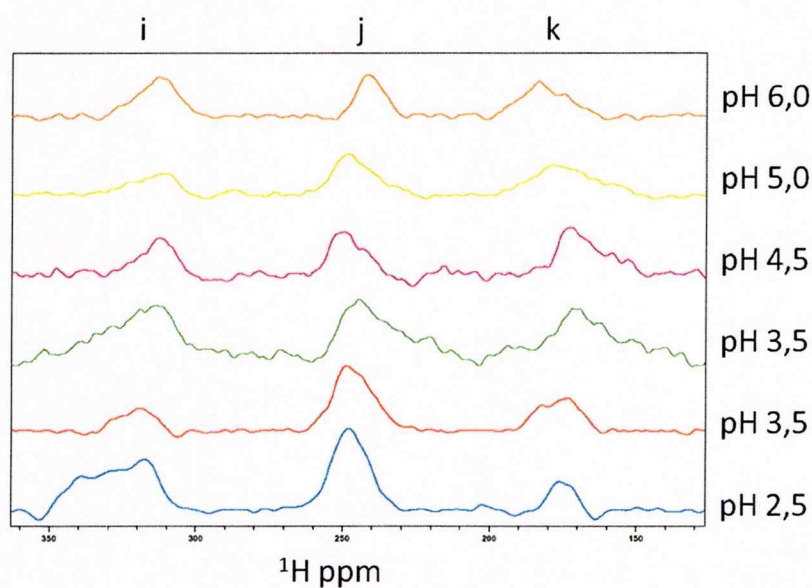


Figura 48. Dependencia del pH de la posición de los H β Cys (señales i,j,k Tabla 5)

Para comprobar la coordinación de las His al centro en el rango de pH utilizado, se realizaron los experimentos de dependencia del pH, registrando los espectros en esta región, mostrando que las señales se conservan a lo largo de la titulación

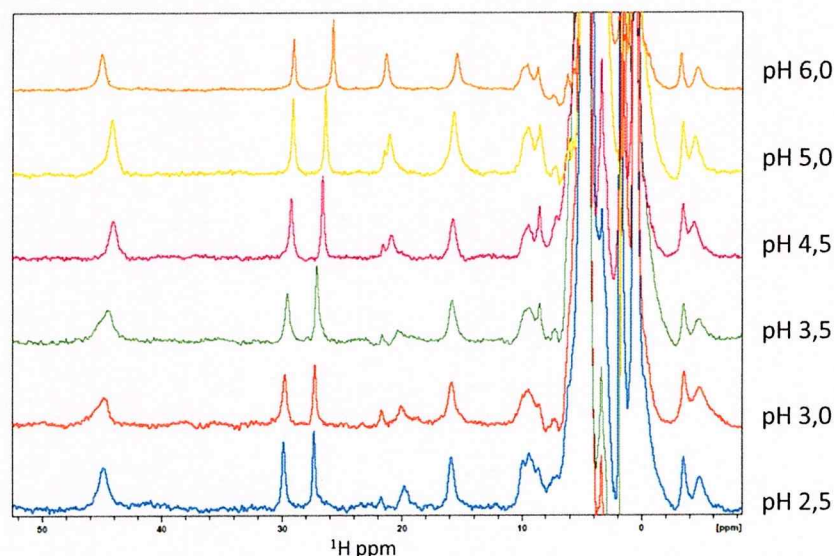


Figura 49. . Dependencia del pH de la región de las His hiperdesplazadas de Tt3L.

5.4. Discusión

A diferencia del trabajo con $\text{Cu}_A\text{-Azurina}^{91}$, la proteína TtCu_A y sus variantes, no muestran un comportamiento similar frente a cambios en el pH, recalcando la importancia de la matriz proteica como regulador de las propiedades redox y electrónicas de centro Cu_A^{172} .

El efecto marcado en la k_{TE} de la mutante M160H es contraintuitivo, ya que el mismo ocurre en paralelo a un aumento en λ . Aplicando la teoría de Marcus, este efecto se puede explicar asumiendo una activación del estado electrónico π_u que debido a un aumento de 7,5 veces el H_{AB} , que de este modo contrarresta el efecto negativo del aumento de λ .

Debido a los valores de observados λ observados para la mutante M160H en los dos extremos de pH, podemos suponer que estaríamos observando una disminución de la población en el estado π_u a pH bajo, lo que fue confirmado a partir de la posición de los $H\beta$ de la Cys153 en los espectros de RMN y los cambios en el espectro electrónico de la proteína.

Por otro lado los cambios en la velocidad de TE al disminuir el pH las proteínas TtCu_A y M160Q se pueden explicar por cambios en las cargas superficiales que causan que adsorciones al electrodo en orientaciones

ligeramente diferentes según el pH. La observación de que la mutante Tt3L (a pesar de tener un $\Delta E_{\sigma/\pi}$ similar al de M160H) no se ve afectada por el pH confirma esta sugerencia, ya que en la misma se han cambiado los bucles en la superficie de la proteína, lo que podría resultar en una interfase de unión distinta a la presentada por las otras variantes.

Estos resultados confirman no solamente que los sitios de Cu_A presentan dos estados electrónicos alternativos, también revelan que los mismos están en un equilibrio dinámico que puede ser regulado por cambios en el pH, siendo ambos activos para la transferencia electrónica. El aumento de la velocidad de transferencia en el estado π_u a pesar de la mayor energía de reorganización del mismo sugiere que los dos estados pueden alternarse en disponibilidad, con cambios en la distribución de densidad electrónica que no afectan la estructura geométrica del centro. Esta característica podría explicar la alta eficiencia del sitio Cu_A en la transferencia de electrones bidireccional a largo alcance en las oxidasas.

Capítulo 6. Ensamblado del Centro Cu_A Mitocondrial

En la Introducción describimos la necesidad de que las células regulen sus niveles internos de cobre, por lo cual la carga necesaria de estos iones en metaloproteínas requiere de la acción de metalochaperonas específicas y otras proteínas asociadas. El cobre entra en la célula en su forma reducida, Cu(I) y es transportado por distintas proteínas metalochaperonas que se encargan de la distribución a los distintos compartimentos celulares (Figura 1)¹. Este mecanismo de transporte implica un reconocimiento específico y de baja afinidad proteína-proteína^{38,184-186}. Este tipo de interacción permite que los contactos sean transientes, para que la efectividad de transferencia sea la óptima.

En el caso particular del centro Cu_A, los mecanismos específicos de transporte y carga del cobre en esta enzima aún no son completamente comprendidos^{75,187,188}. El sitio Cu_A posee dos iones cobres unidos fuertemente a puente por dos tioles de Cys en la subunidad COX II. Debido a que esta subunidad está ubicada en ambientes oxidantes, tales como el periplasma bacteriano o el espacio intermembrana mitocondrial^{189,190}, el ensamblado del sitio metálico requiere, además de una metalochaperona específica, de un mecanismo que mantenga reducidos los tioles de estas Cys, que (por su cercanía) tienden a formar con facilidad un puente disulfuro.

Hace unos años, nuestro grupo dilucidó el mecanismo bioquímico de ensamblado del centro Cu_A en la oxidasa bacteriana de *Thermus thermophilus*. En ese caso particular, establecimos que la proteína *TtSco1*, una proteína anclada a membrana, actúa como tiol-disulfuro oxidorreductasa de COX II manteniendo reducidos los grupos tioles. Por su parte, la metalochaperona periplasmática soluble, PCu_AC (*Periplasmic Cu_A Chaperone*) es la encargada de la transferencia de los iones Cu(I) de manera secuencial para formar el centro Cu_A⁸⁰ (Figura 50).

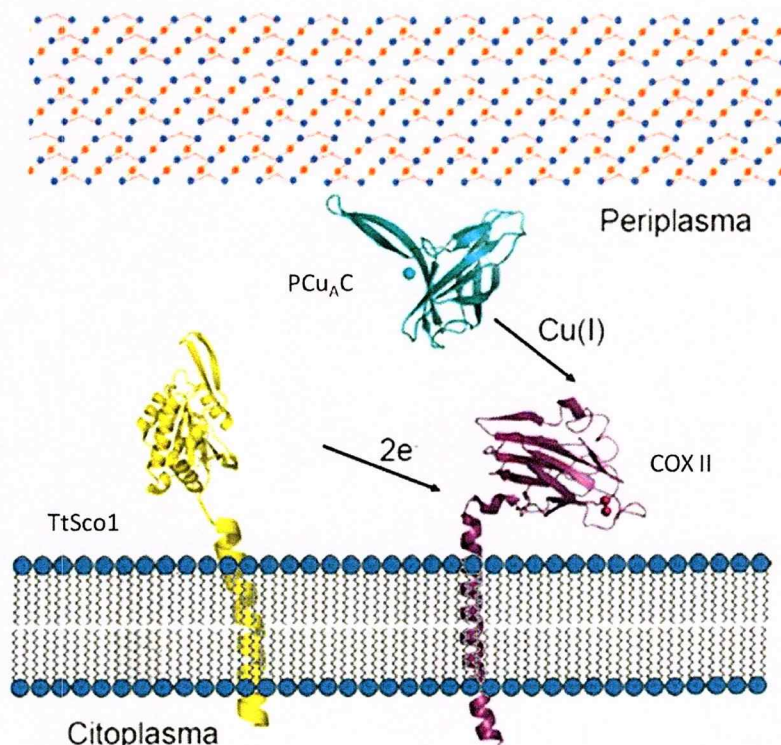


Figura 50. Mecanismo de ensamblado del sitio Cu_A en COX II en el sistema bacteriano.

En el caso de eucariotas, el sistema es mucho más complejo. Por un lado, no existe un homólogo eucariota de PCu_AC y dentro del espacio intermembrana mitocondrial hay un número mayor de proteínas que se encuentran involucradas en el ensamblado de una COX funcional^{58,59}.

Estudios genéticos han determinado que la formación del complejo COX tiene lugar a través de la formación de complejos involucrando varias subunidades. Cuando la formación del centro Cu_A se ve comprometida, se observa la acumulación de un complejo de ~100kDa que contiene a las subunidades COX I y IV¹⁹¹, lo que permite determinar qué proteínas se encuentran involucradas en la formación de un centro Cu_A funcional^{58,192-194}. De esta manera se identificaron tres proteínas de unión a cobre directamente involucradas en la formación de este centro metálico Cox 17, Sco1 y Sco2^{73,75,195-197}.

Cox 17 es la encargada de transferir iones cobre a las proteínas Sco1/2 y a Cox 11, donando los iones cobre a través de reconocimientos transientes

mediadas por interfaces específicas^{76,82,198}. Sco1 y Sco2 fueron identificados como supresoras de Cox 17 en levaduras, sin embargo su funcionalidad varía entre organismos⁷⁷. En levaduras y plantas sólo Sco1 es esencial para el ensamblado del centro Cu_A^{195,199}. En cambio, mutaciones en cualquiera de estas proteínas en humanos producen deficiencia en COX que resultan en el desarrollo temprano de enfermedades letales^{73,196}. Pacientes con mutaciones en el gen *Sco2* presentan problemas en el encéfalo y el miocardio, mientras que pacientes *Sco1* presentan fallas hepáticas^{62,163}. Esta diferencia entre ambas mutantes, sin embargo, no depende de la expresión tejido-específica de las proteínas ya que tanto Sco1 como Sco2 están presentes en todos los tejidos. Estudios en fibroblastos inmortalizados muestran la acumulación de los mismos subcomplejos de la formación de COX, sugiriendo que Sco1 y Sco2 tienen funciones complementarias en el ensamblado de COX⁷⁵.

Sco1 y Sco2 están ancladas a la membrana interna mitocondrial por una simple hélice transmembrana con los dominios globulares hacia el IMS²⁰⁰. Ambas tienen un sitio de unión a cobre que consiste en dos residuos de Cys dentro de un motivo Cx3C y un residuo conservado de His¹³⁷. Mutaciones en cualquiera de estos residuos anulan la capacidad de unión a cobre de estas proteínas y resultan en deficiencia en ensamblado de COX²⁰⁰. El sitio de unión a cobre está expuesto al solvente, favoreciendo las reacciones de transferencia del mismo. El bucle que contiene el residuo de His en las proteínas Sco es la única región que sufre rearrreglos conformacionales importantes tras la unión a Cu(I)^{201,202} (Figura 51). Ambas proteínas también tienen capacidad de unión a Cu(II) *in vitro*, pero se desconoce la funcionalidad *in vivo* de esta forma redox⁷⁴.

Los sitios de unión a Cu(I) de las proteínas Cox 17, Sco1, Sco2 y COX II deben mantener reducidas las Cys de unión a cobre durante las reacciones de transferencia de Cu(I) dado que el IMS es un ambiente oxidativo¹⁹⁰. Mutaciones que alteran el estado redox de estas proteínas también afectan la formación de una COX funcional⁸¹. Las mutaciones deletéreas más ubicuas en las proteínas Sco: (P174L en *Sco1*, y E140K, R170W y S225F en *Sco2*) se encuentran cerca del motivo Cx3C o del residuo de His esencial (Figura 52). Estudios en tejidos de

pacientes y fibroblastos muestran una disminución en la formación de COX funcionales empleando las versiones P174L de *Sco1* o E140K de *Sco2*^{73,203,204}. En cambio, no se han descrito mutantes de Cox 17 en humanos. Ensayos *in vitro* mostraron que estas mutaciones disminuyen la capacidad de unión a Cu(I) y Cu(II) y que la mutante P174L muestra una capacidad disminuida de metalación por parte de Cox 17²⁰⁵, mientras que la mutante E140K, muestra una menor estabilidad²⁰⁶, compatible con los estudios *in vivo* que muestran niveles menores de expresión.

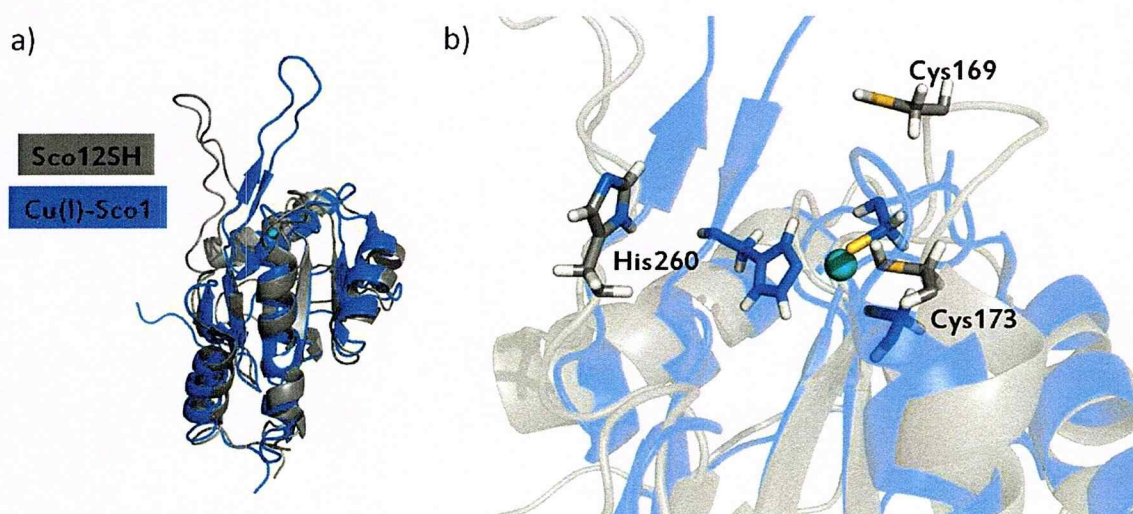


Figura 51. (a) Reordenamiento del bucle de His de la proteína Sco1 tras la unión de Cu(I). (b) Reordenamiento de los ligando por la unión de Cu(I) a la proteína Sco1.

En cultivos celulares humanos, se llevaron a cabo un gran número de experimentos para determinar la función de cada una de las proteínas, sin embargo la imposibilidad de seguir el grado de metalación tanto de las proteínas Sco como de COX II no permitió determinar fehacientemente el rol de las mismas^{75,81,187,188}.

La principal limitante para realizar experimentos biofísicos y bioquímicos que permitan poner a prueba las distintas hipótesis funcionales de estas proteínas ha sido la imposibilidad de obtener un dominio soluble de COX II humana. En este trabajo de Tesis, hemos logrado obtener el modelo mínimo de COX II humana, Tt3L, que tiene los residuos de superficie involucrados en el sitio de reconocimiento putativo de las proteínas Sco, que usaremos con estos fines.

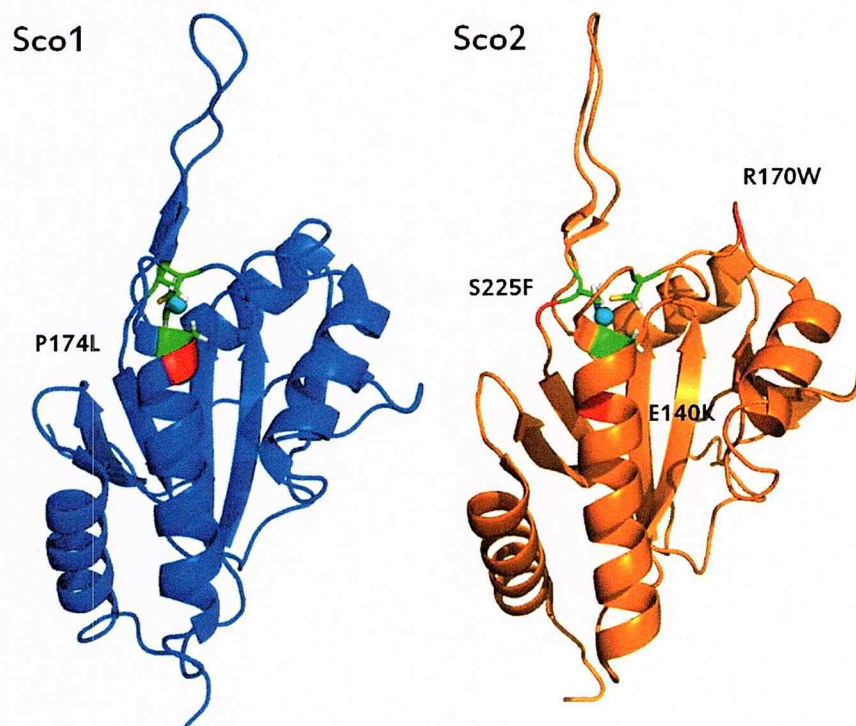


Figura 52. Mapeo sobre la estructura de las proteínas Sco1 y Sco2 de las mutaciones deletéreas reportadas para ambas proteínas.

6.1. Asignación del espectro HSQC de la proteína Tt3L

La ventaja de la RMN por sobre otras técnicas espectroscópicas, es la capacidad de tener resolución atómica sobre los procesos investigados. Además, las distintas señales dentro de los espectros son sensibles al entorno en el que se encuentran, por lo que cambios en los desplazamientos químicos observados, son manifestación de cambios en el ambiente particular de los núcleos.

Sin embargo, para poder identificar los átomos que se ven afectados dentro de la secuencia de la proteína, es necesario asignar las señales de los espectros. En particular el espectro de correlación ^1H - ^{15}N HSQC es muy empleado para seguir el estado global de la proteína, dado que las señales observadas corresponden a los pares H-N del esqueleto proteico de la proteína, por lo que cada señal se corresponde a un residuo de la proteína. La forma global del espectro refleja el estado de la proteína en una condición dada. Una vez asignado este espectro, se puede usar como base para explorar la dinámica de la proteína o la interacción

con ligandos u otras proteínas de manera residuo específica, es decir reconocer cuáles son los residuos que se encuentran involucrados en las interacciones estudiadas. En el caso del estudio del proceso de ensamblado del sitio Cu_A , como se discutió en la introducción, es importante poder seguir: (1) el proceso de reducción de la forma apo oxidada de las proteínas (de ahora en más, forma S-S) a la forma apo con tioles reducidos (de ahora en más, forma 2SH) y (2) el proceso de unión a Cu(I). Por lo tanto, la técnica debe ser capaz de distinguir entre estas distintas formas. El espectro HSQC de la proteína salvaje TtCu_A en su forma apo reducida (2SH) no presenta las señales correspondientes al bucle de ligandos debido a una heterogeneidad conformacional¹³⁵. En cambio, se cuenta con la asignación completa de la forma metalada reducida de la misma.

Se realizó la titulación se hizo mediante agregados de Cu(I) en solución (mezcla de CuSO_4 y ácido ascórbico) a la proteína ^{15}N -Tt3L apo reducido (2SH) y se siguieron los cambios que se producen a partir de la unión de los iones cobre en el espectro ^1H - ^{15}N HSQC.

Los espectros resultantes de la adición de 2 equivalentes de Cu(I), muestran diferencias notables, con respecto al espectro de la proteína Tt3L_{2SH} apo reducida. Se observa un aumento del número de señales, muchas de estas en regiones del espectro bien discriminadas respecto a las señales de la proteína sin metal al igual que sucede con la proteína TtCu_A (Figura 53).

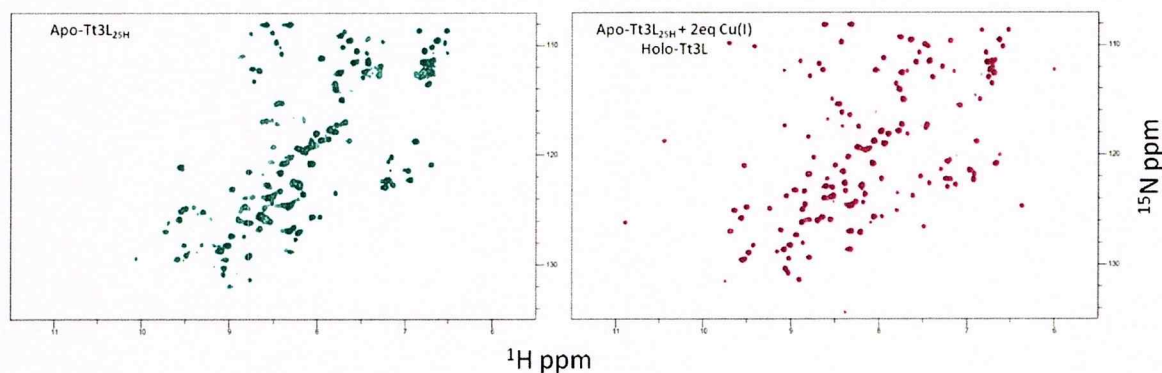


Figura 53. Comparación de los espectros ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Apo-Tt3L2SH (Izquierda) y tras el agregado de 2eq de Cu(I) (Derecha).

La solución empleada en la titulación contaba con 1mM DTT para asegurar la reducción de las Cys de la proteína y 1mM ác. Ascórbico para mantener el cobre en su forma reducida. Posteriormente se eliminó el reductor mediante diálisis y se observó la aparición del color púrpura característico del centro Cu_A oxidado, con un espectro de absorción similar a los ya obtenidos para la proteína, confirmando que el espectro final corresponda a la forma nativa de unión a metal.

Dado que la presencia de los iones cobre le brinda rigidez a la proteína y se observan una mayor cantidad de señales en el espectro HSQC tal como sucede con la proteína TtCu_A, se decidió emplear la forma di-Cu(I)-¹⁵N-¹³C-Tt3L para realizar los experimentos de asignación del espectro HSQC. Se hizo realizaron una serie de espectros de triple resonancia ¹H-¹⁵N-¹³C: HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CACB(CO)NH y HNCACB, tal como se describe en 2.5.2 que permiten detectar selectivamente las conectividades ligadas a los protones amídicos observables en el HSQC según se muestra en la Figura 54.

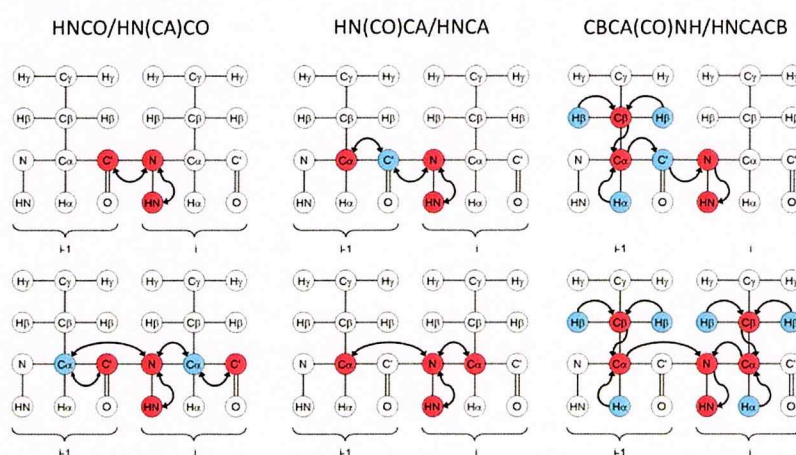


Figura 54. Experimentos básicos de asignación del esqueleto proteico de proteínas. En rosa se muestran las resonancias observables en los espectros tridimensionales y en celeste los núcleos por los que se filtran las conectividades.

Los espectros se corrieron un equipo Bruker 600MHz con sonda TXI a 25°C. Empleando una concentración de 1mM de proteína Tt3L en buffer 100mM fosfato de potasio, 100mM KCl, pH 6 y para evitar la oxidación de la muestra se agregó 5mM ácido ascórbico.

Los espectros fueron procesados empleando el programa TopSpin 2.1 de Bruker y la asignación se hizo empleando el programa específico de asignación de proteínas CARRA y de esta manera se pudieron asignar el 95% de los residuos no prolina de la proteína Tt3L a pH6.

Se decidió igualmente asignar el espectro HSQC de la proteína en buffer pH7, que es el buffer empleado para los experimentos de cálculo de estructuras de las proteínas Sco^{140,201,202}. A pesar de contar con la asignación del espectro HSQC de la proteína Tt3L a pH6,0, los límites de concentración estable de las proteínas Sco son muy bajos (300-400 μ M), lo que implicaría que en el caso de realizar una mezcla ¹⁵N-Apo-Tt3L:Cu(I)-Sco (1:2) la cantidad de proteína observable en el espectro sería <150 μ M. Esta concentración se encuentra dentro del límite de detección del espectro y la presencia de posibles especies intermediarias, podría disminuir aún más la sensibilidad.

Por lo tanto se asignaron los espectros de las proteínas Tt3L en su forma holo reducida, y de la proteína TtCu_{A2SII} y en su forma holo reducida en buffer pH 7 (cuya asignación se encuentra depositada en el BMRB), siguiendo los desplazamientos químicos del espectro HSQC de cada una de las proteínas en función del pH (6 $\rightarrow$ 7). Mediante el uso del programa CCPN.

Para el caso de la proteína TtCu_A se pudieron seguir el 100% de las señales asignadas a pH 6 y trasladarlas al espectro de pH 7 en ambas condiciones sin embargo para la proteína Tt3L se pudieron trasladar el 94% de las señales asignadas. Los residuos que no se pudieron seguir se deben a señales que se encuentran muy juntas dentro del espectro HSQC, lo que dificultaba el seguimiento de las mismas con la dependencia del pH. Para evitar asignaciones incorrectas se decidió omitir estas señales de la asignación final (Figura 55).

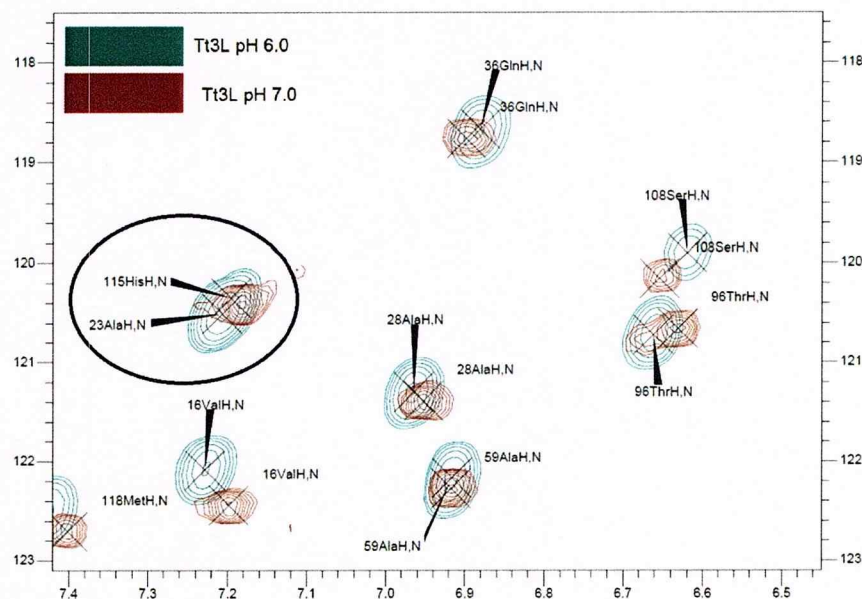


Figura 55. Acercamiento sobre el espectro HSQC de la proteína Holo Tt3L a pH 7 y 6. Se remarca en círculo, dos señales a las que no se le pudo seguir los cambios de desplazamiento químico en función del pH, debido al solapamiento de las señales.

6.2. Transferencia de Cu(I) a partir de la proteína Sco1 humana

La transferencia de Cu(I) a la subunidad COX II a partir de las proteínas Sco1 o Sco2 puede seguirse por RMN, basándose en la asignación de los espectros de las formas solubles, en muestras de las proteínas Cu_A marcadas isotópicamente en ¹⁵N. La proteína Sco1 fue purificada en la forma apo como se detalla en 2.3.6. Para el metalado de la proteína, se incubó a la muestra purificada durante 30 min con 10mM DTT para asegurar la reducción de las Cys de unión a metal. Luego se eliminó el DTT mediante el uso de una columna PD10 de desalado (GE Healthcare) y se agregaron dos equivalentes de Cu(I) (solución de Cu(II) con Ácido ascórbico). La proteína se concentró a un volumen adecuado, y se pasó nuevamente por la columna PD10 para eliminar el exceso de cobre de la solución. Los experimentos de RMN fueron realizados en presencia de 1mM DTT para mantener los residuos de Cys en estado reducido, y de ascorbato 1mM para mantener el Cu(I) en forma reducida.

Al finalizar la titulación, se observó un espectro HSQC coincidente con la forma di-Cu(I) de Tt3L, es decir, confirmando la completa metalación de la

proteína, sin la aparición de señales que pudieran atribuirse a especies minoritarias, y sugiriendo una transferencia rápida y eficiente (Figura 56)²⁰⁷.

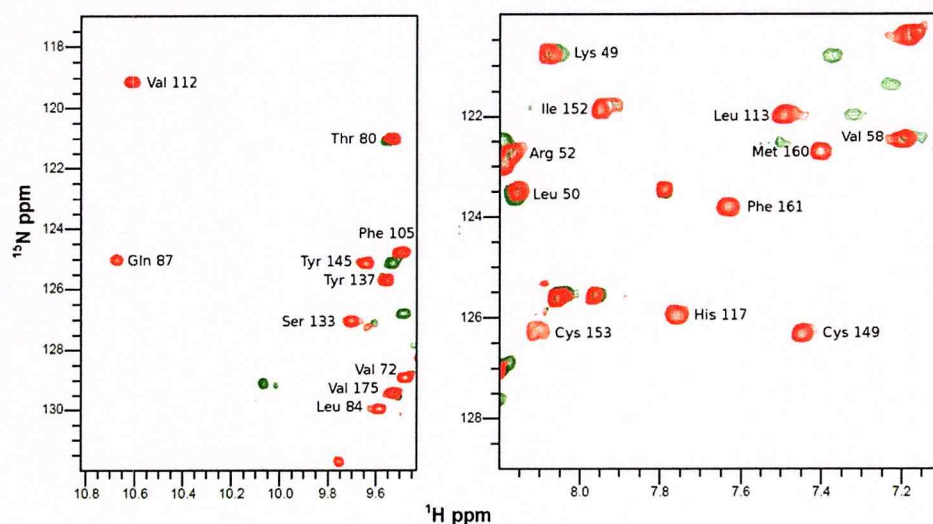


Figura 56. Comparación de regiones del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Tt3L en la forma Apo-reducida (verde) y luego del agregado de dos equivalentes de Sco1-Cu(I) (Rojo).

Se realizó la misma titulación empleando a la proteína salvaje TtCu_A en su forma apo reducida (2SH), a la cual se le agregó Cu(I)-Sco1. Al final de la titulación, se observa un espectro que coincide con el correspondiente a la forma di-Cu(II) de TtCu_A , pero también se observa un número de señales que no se corresponden ni con la especie apo u holo de TtCu_A (Figura 57). La muestra permaneció incolora, lo cual nos permitió descartar que estas señales provinieran de la proteína holo en su forma oxidada. Sin embargo, una semana después de este experimento, se observó que la muestra brindaba un espectro HSQC correspondiente a la forma di-Cu(I) TtCu_A (Figura 57).

Estos experimentos indican que la proteína Sco1 humana es capaz de transferir dos equivalentes de Cu(I) a la quimera Tt3L de manera eficiente. Sin embargo, la transferencia entre la Sco1 humana y el dominio bacteriano nativo no es eficiente, lo que confirma la hipótesis de que los bucles permiten un reconocimiento específico que favorece la transferencia de Cu(I). Por otra parte, este experimento valida el diseño de la quimera utilizada en esta Tesis²⁰⁷.

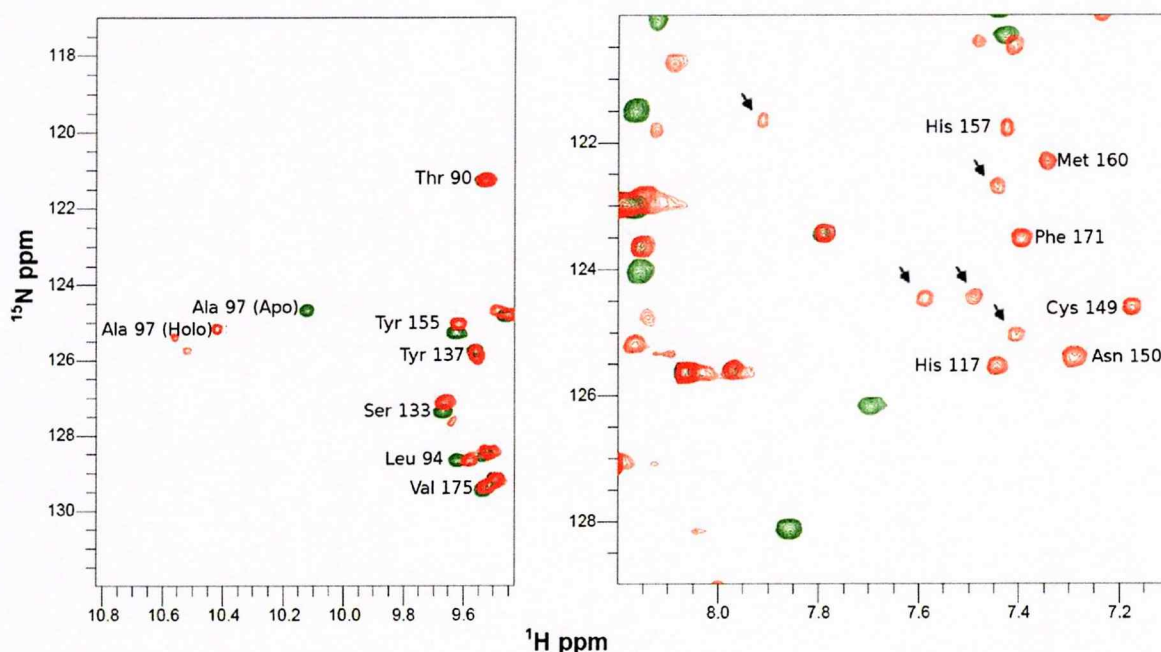


Figura 57. Comparación de regiones del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína $Tt\text{Cu}_A$ en la forma Apo-reducida (verde) y luego del agregado de dos equivalentes de Sco1-Cu(I) (Rojo). Con flechas se indican las señales que no se corresponden a señales presentes en la forma apo u holo de la proteína.

6.3. Transferencia de Cu(I) a partir de Sco1 de *Thermus thermophilus*

La transferencia de Cu(I) desde Sco1 humana a $Tt\text{Cu}_A$ esta favorecida termodinámicamente, ya que $Tt\text{Cu}_A$ presenta una mayor afinidad por los iones Cu(I) que Sco1, sin embargo la reacción no tiene lugar. Esta observación corrobora la hipótesis de que los bucles juegan un papel importante en el reconocimiento previo a la transferencia de metal. Para descartar que la presencia de los bucles humanos favorezca una conformación que permita una mejor interacción con todas las proteínas Sco y no un efecto específico de especie Se realizaron los mismos experimentos empleando a la proteína $Tt\text{Sco1}$ como dadora de Cu(I).

La metalación de $Tt\text{Sco1}$, se realizó de igual manera que para su homóloga humana y la titulación se realizó registrando espectros ^1H - ^{15}N HSQC empleando a las proteínas $Tt3L$ y $Tt\text{Cu}_A$ enriquecidas en ^{15}N en su forma apo reducida (2SH) comoceptoras de Cu(I).

Tras el agregado de dos equivalentes de Cu(I)-*TtSco1* a Apo-*Tt3L*_{2SH}, se observan perturbaciones en el espectro HSQC. Se conservan las señales correspondientes a la apo proteína y la aparición de señales que no corresponden a la forma apo u holo de la proteína, consistente con la formación de una especie intermediaria (Figura 58). Lo mismo sucede tras el agregado de 2 equivalentes de *TtSco1*-Cu (I) a la proteína Apo-*TtCu*_{A2SH} (Figura 59).

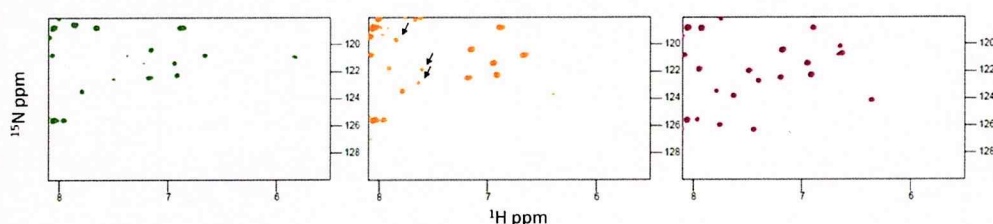


Figura 58. Comparación de la región del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Apo-*Tt3L*_{2SH} (Verde), tras el agregado de 2eq de *TtSco1*-Cu(I) (Naranja) y el espectro de la proteína Holo-*Tt3L* (Púrpura). Las señales ausentes en los espectros apo y di-Cu de *Tt3L* se indican con flechas.

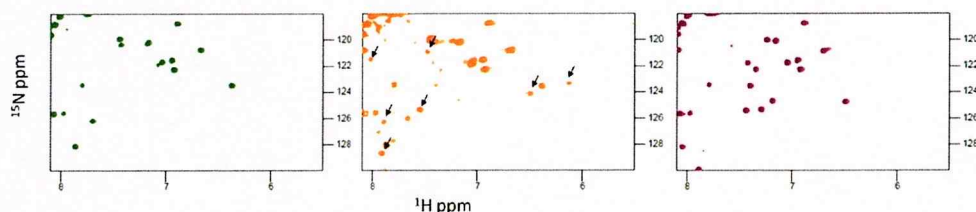


Figura 59. Comparación de la región del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Apo-*TtCu*_{A2SH} (Verde), tras el agregado de 2eq de *TtSco1*-Cu(I) (Naranja) y el espectro de la proteína Holo-*TtCu*_A (Púrpura). Las señales ausentes en los espectros apo y di-Cu de *Tt3L* se indican con flechas.

Esta especie intermediaria en el espectro HSQC desaparece luego de una semana post titulación, donde se observa un espectro final que se corresponde con la forma holo reducida de cada una de las proteínas Cu_A.

Este control permite confirmar que *TtSco1* no actúa como metalochaperona al contrario que su homólogo humano, que la metalación debido a *Sco1* humana no se debe sólo a una cuestión de afinidad por el metal, sino que el reconocimiento específico proteína-bucles es el que permite que se supere la barrera cinética necesaria para que se complete la metalación²⁰⁷.

6.4. Transferencia de Cu(I) desde la proteína Sco2 humana

La proteína Sco2 humana a diferencia de Sco1 posee un tercer residuo Cys expuesto. Trabajar en condiciones aeróbicas se hace dificultoso, debido que este residuo tiene tendencia formar puentes disulfuro. El preparado de la proteína Sco2-Cu(I) humana fue realizado en cámara anaeróbica con soluciones de buffer previamente desoxigenadas mediante flujo de N₂ gaseoso durante 12-18 hs. Al igual que con la proteína Sco1 se incubaba a la proteína con exceso de DTT que luego es removido mediante una columna PD10, pero a diferencia de Sco1, la metalación se realiza con dos equivalentes de Cu(I) en la presencia de 1mM DTT para evitar la precipitación de la proteína Sco2, que luego es removido junto con el exceso de cobre con un segundo paso por una columna PD10, una vez concentrada en un volumen adecuado.

La metalación de la proteína ¹⁵N-Tt3L_{2SH} por parte de Cu(I)-Sco2 fue incompleta en el tiempo de la titulación. El espectro presenta señales que podrían corresponder a especies intermedias, dado que no se observan en la forma apo o en la forma holo de Tt3L y a pesar de que se observan las señales características de la forma holo, el grado de metalación nativa final se determinó en ~30% (Figura 60).

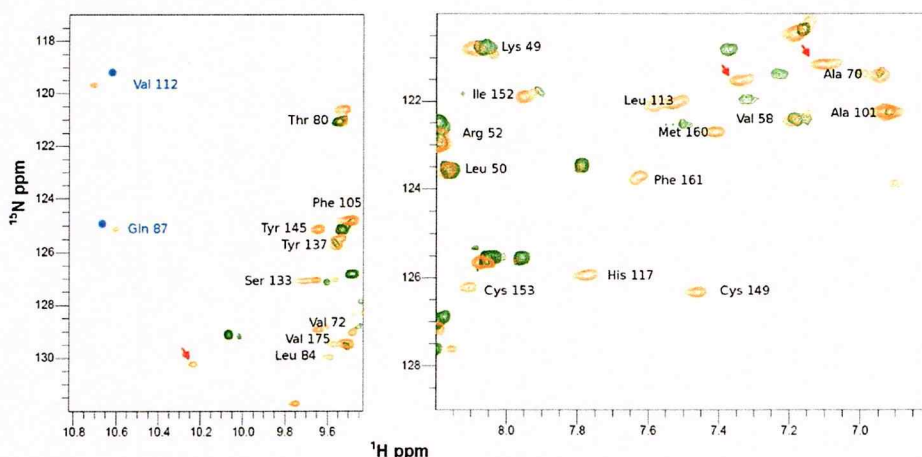


Figura 60. Comparación de regiones del espectro ¹H - ¹⁵N HSQC de la proteína Tt3L_{2SH} (verde) y luego del agregado de dos equivalentes de Sco2-Cu(I) (Naranja). En azul se destaca la posición esperada para los residuos Val112 y Gln87 en la holo proteína y con flechas rojas se indican las señales que no se corresponden con la forma apo u holo de Tt3L.

Debido a que la metalación no se completó en el tiempo de la titulación, descartamos que la principal función de Sco2 sea la de actuar como metalochaperona de COX II, confirmando el papel de Sco1 como la metalochaperona específica en el sistema mitocondrial humano²⁰⁷.

6.5. Actividad tiol disulfuro-oxidoreductasa de las proteínas Sco

Ya determinada la proteína que actúa como metalochaperona, es necesario determinar si es la misma Sco1 la que es la encargada de reducir las Cys del sitio Cu_A en COX II o si es Sco2 la que cumple esa función.

El ambiente del espacio intermembrana mitocondrial, es un ambiente altamente oxidante, debido a esto las Cys de las distintas proteínas se encontrarían oxidadas formando puentes disulfuro, salvo una proteína mantenga su estado de oxidación. En el caso de la proteína COX II, la reducción del puente disulfuro es esencial para la formación de un centro Cu_A funcional. Estudios genéticos con las proteínas Sco, demostraron que los residuos de Cys de estas proteínas son fundamentales para cumplir su función, sin embargo, estas mutaciones afectan severamente la capacidad a unión a cobre de las mismas, por lo que no se puede discriminar si el incorrecto ensamblado del centro Cu_A es debido a que se ve afectada la capacidad reductora o metalochaperona de las mismas.

El potencial redox de las dos proteínas ya había sido reportado por el grupo de Lucia Banci, siendo -277mV para Sco1 y <-300mV para la proteína Sco2^{82,208}. Debido a que se desconocía el potencial de reducción de la proteína Tt3L, la doctora Cefaro del CERM determinó el potencial de reducción de la quimera a través de espectros de fluorescencia en la presencia de distintas relaciones de glutatión oxidado:glutatión reducido (GSSG:GSH) determinando un potencial de reducción de $-288 \pm 3\text{mV}$ muy similar al los -290mV reportados para la proteína salvaje (Figura 61)²⁰⁷.

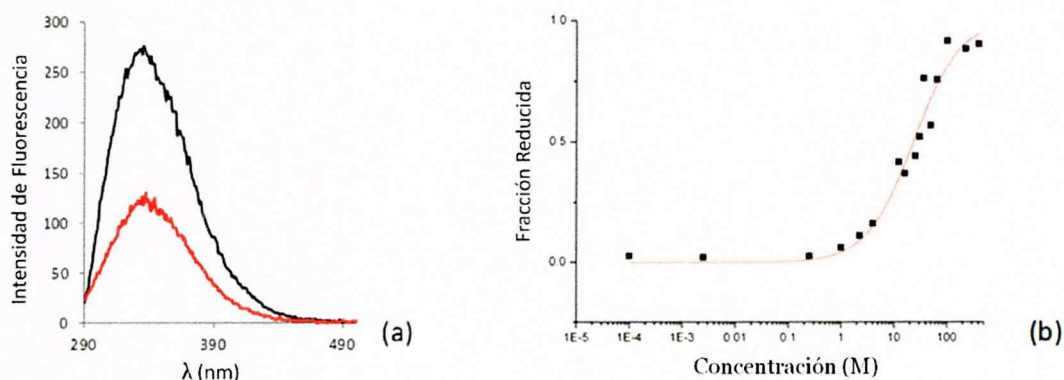


Figura 61. (a) espectros de fluorescencia de la proteína Tt3L en su forma oxidada (negra) y reducida (rojo).
(b) Curva de titulación de la fracción reducida en función de la concentración de reductor.

Estos valores de potenciales de reducción indican que sólo la proteína Sco2 sería capaz de reducir a COX II. Para poner a prueba esta hipótesis, se empleó un experimento en el cual se hace reaccionar a las proteínas puras y a las mezclas de las mismas con el complejo 4-acetamido-4'-maleimidylestilbeno-2,2'-disulfonato (AMS) que tiene la capacidad de agregar 500 Da por tiol libre presente en la proteína, por lo cual la alquilación de los tioles puede ser revelada a través de geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

Para realizar los experimentos de transferencia de electrones entre estas proteínas es necesario trabajar en ausencia de reductor, por lo que se emplearon muestras preparadas en cámara anaeróbica, con buffers previamente degaseados por venteo con N_2 gaseoso para desplazar el oxígeno.

Las muestras de Tt3L oxidada (S-S) fueron preparadas según el protocolo expuesto en 2.3.2y el estado redox de las cisteínas fue controlado mediante reacción con AMS para asegurar el estado de oxidación de la proteína.

La metalación de ambas proteínas Sco se en cámara anaeróbica. Para las pruebas de actividad tiol disulfuro oxidorreductasa, se empleó una fracción de proteína luego del primer paso por columna PD10, Apo-Sco_{2SH}. Una vez obtenidas

todas las proteínas en los estados de oxidación necesarios y en buffer anaeróbicos, se realizaron mezclas equimolares y con distintas relaciones estequiométricas, se incubaron una hora a temperatura ambiente y luego se tomaron dos alícuotas de cada mezcla de reacción y de las proteínas sin mezclar y a una alícuota se la hizo reaccionar con el reactivo AMS para cortar la reacción. Se incubaron una hora a 37°C para permitir que se complete la alquilación de los tioles y luego las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

Empleando las muestras de las proteínas Sco_{2SH} se observó que, como era de esperar, la proteína Sco₂ tiene un mayor poder reductor respecto a la proteína Sco₁, sin embargo la reducción no es completa (Figura 62a). Las referencias de las proteínas Sco_{2SH} muestran la presencia de corrimientos tras la reacción de AMS que se corresponde a las proteínas alquiladas. La movilidad electroforética de Sco₂ es menor a la de Sco₁, a pesar de tener un residuo de Cys extra. Esto puede deberse a que tiene residuos no accesibles al complejo AMS, o que la movilidad es anómala en la presencia de SDS. Las mezclas de reacción muestran reacciones parciales, baja reducción de la proteína Tt3L_{S-S} con poco cambio en las poblaciones de proteínas Sco 2SH:S-S.

En el caso de la reducción de las proteínas Sco, se desconoce qué proteína sería la encargada de reducir a Sco₂, pero se sabe que la proteína Sco₁ puede ser reducida por Cox17 sólo si esta se encuentra unida a iones Cu(I), indicando que la unión a cobre aumenta el poder reductor de la proteína^{82,207} ENREF 209.

Teniendo en cuenta este antecedente, y que para ambas proteínas es fundamental la capacidad de unión a cobre para su función, se procedió a probar si alguna de las proteínas Sco en su forma unida a Cu(I) era capaz de reducir a Tt3L.

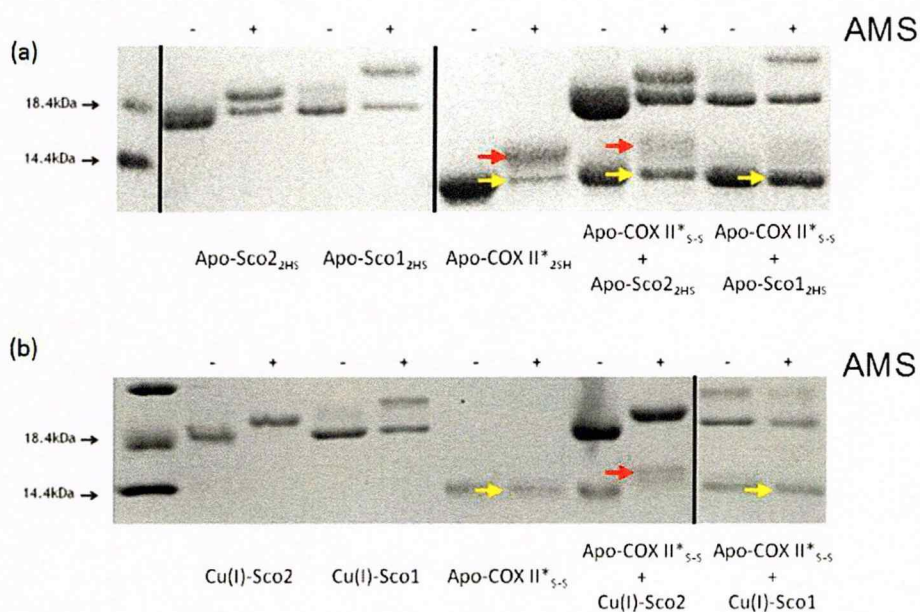


Figura 62. Transferencia de electrones seguida mediante SDS-PAGE de muestras reaccionadas con AMS. (a) Mezcla de las proteínas Apo-Sco_{2SH} (b) Mezclas de las proteínas Cu(I)-Sco. Las flechas rojas indican la posición de la proteína Tt3L reducida, y en amarillo la posición de la proteína Tt3L oxidada o sin reaccionar con AMS.

Realizando el test de AMS pero esta vez con las proteínas Sco unidas a Cu(I) se vio que un exceso de Cu(I)-Sco2 es capaz de reducir completamente a Tt3L, sin embargo no se observan cambios en la movilidad electroforética de la proteína Sco2 (Figura 62b). Debido a esta ausencia de reacción no se puede descartar que los electrones provengan de los residuos de cisteínas o de los iones Cu(I) que podrían estar pasando a Cu(II) catalizando la reducción²⁰⁷.

Para descartar que los electrones provengan de los iones Cu, se realizaron espectros de EPR de banda X a 45K de la proteína Cu(I)-Sco2 sola y en presencia de Tt3L oxidada. El espectro de la proteína Cu(I)-Sco2 no dio señales en EPR y el de la mezcla con Tt3L-oxidada tampoco tuvo señal en EPR. Como control se realizó el espectro de Cu(I)-Sco2 luego de exposición al aire, obteniendo el espectro típico de una proteína Cu(II)-Sco (Figura 63)⁷⁴.

La reacción también se siguió por RMN. Se observó la desaparición de señales comparando el espectro HSQC de la mezcla Tt3L+Cu(I)-Sco2 con respecto al espectro de Tt3L oxidada, que puede deberse a la reducción de la

proteína Tt3L y ganancia de movilidad de los bucles de unión a metal, sin embargo no se observa la aparición de señales que indiquen la unión a metal, por lo que la proteína no puede unir iones cobre al interactuar con Sco2 (Figura 64)

207

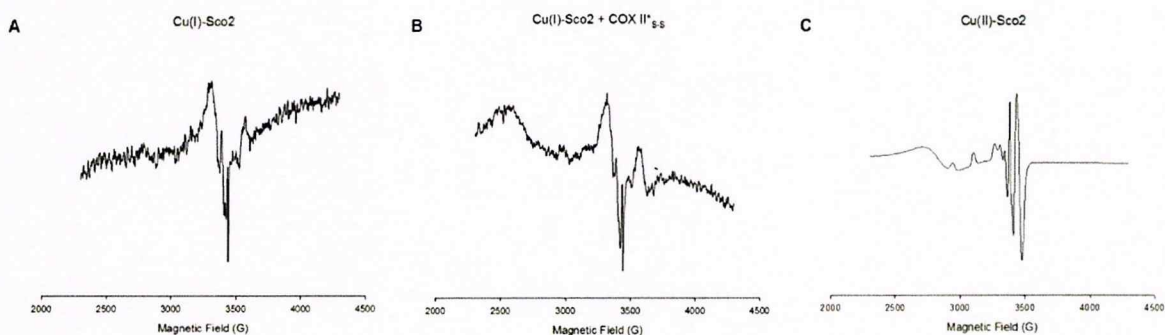


Figura 63. Espectros de EPR de banda X registrados a 45K de (A) Cu(I)-Sco2 (B) Tt3L_{S-S}:Cu(I)-Sco2 (1:1) y (C) Cu(II)-Sco2. Las señales que aparecen en los espectros A y B corresponden a trazas de hierro presentes en la cavidad.

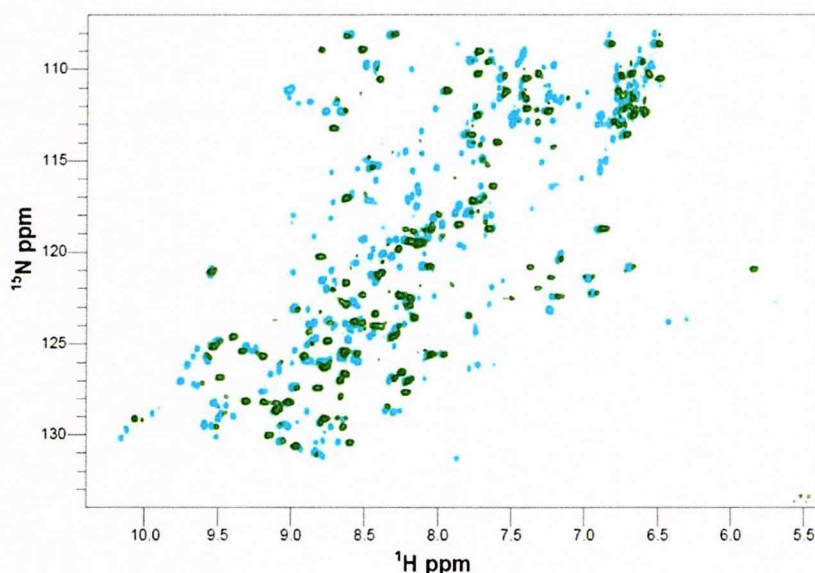


Figura 64. Comparación del espectro HSQC de la proteína Tt3L en la forma oxidada (celeste) y tras el agregado de Cu(I)-Sco2 (verde).

6.6. Actividad oxidorreductasa y metalochaperona seguida por RMN

Una vez definido que Cu(I)-Sco2 actúa como tiol-disulfuro oxidorreductasa de COX II para que luego Cu(I)-Sco1 pueda transferir los iones metálicos, se decidió tratar de seguir el proceso completo empleando RMN. Partiendo de la

proteína Tt3L_{S-S} se procedió a agregar un equivalente de Cu(I)-Sco2 para observar la reducción de la proteína. El espectro ^1H - ^{15}N HSQC de Tt3L resultante presentó una reducción en el número de señales posiblemente debido a que un conjunto de las señales entraron en un régimen de intercambio intermedio (Figura 64).

Luego se procedió al agregado de dos equivalentes de Cu(I)-Sco1 para intentar metalar la proteína observando que la proteína Sco1 no pudo metalar a la proteína Tt3L, con Sco2 agregada previamente a la mezcla de reacción (Figura 65). Esto podía deberse a una interacción de Tt3L con Sco2. Estudios de DLS (Dynamic light scattering por sus siglas en inglés) mostraron la presencia de un complejo de alto peso molecular $\sim 41\text{kDa}$ que podría asignarse a un dímero de la proteína Sco2 a un heterodímero Tt3L-Sco2 ya que entran dentro del error de la medición. En el caso de que se haya formado un complejo estable con la proteína Sco2, esta estaría bloqueando el acceso a Sco1, para donar los iones Cu a la proteína Tt3L.

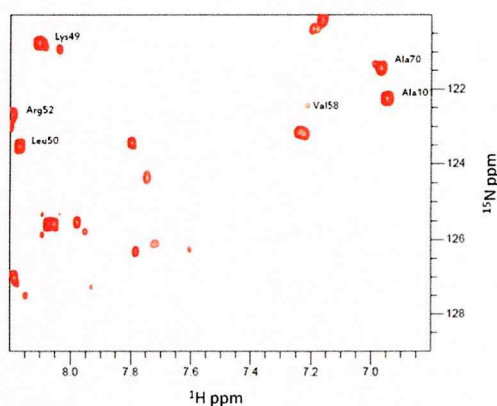


Figura 65. Región del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Tt3L luego del agregado de (1°) 1 eq Cu(I)-Sco2 (2°) 2 eq de Cu(I)-Sco1.

Se decidió entonces realizar el mismo experimento pero invirtiendo el orden de agregado de las proteínas Sco. Primero se agregaron los dos equivalentes de Sco1- Cu(I) sin observarse ningún cambio en el espectro HSQC con respecto a la proteína Tt3L oxidada y por último se agregó un equivalente de Sco2-Cu(I), en

este caso se observaron inmediatamente la aparición de señales correspondientes a la forma holo de la proteína Tt3L que se corresponden con un 50% final de formación de proteína metalada correctamente. Por lo tanto el orden de interacción de ambas proteínas sería importante para entender un poco más el mecanismo de ensamblado del centro Cu_A dentro del espacio intermembrana mitocondrial.

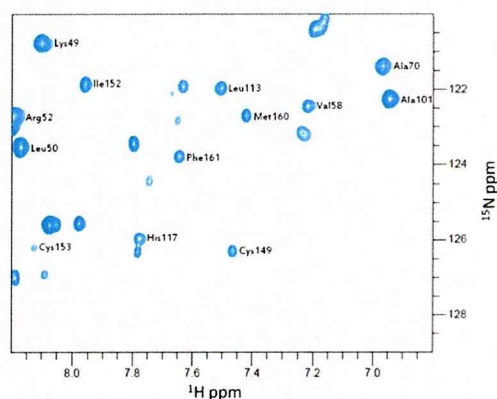


Figura 66. Región del espectro ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína Tt3L luego del agregado de (1°) 2 eq Cu(I)-Sco1 (2°) 1 eq de Cu(I)-Sco2

6.7. Discusión

El empleo de la quimera permite resolver el cuello de botella presente en los espectros bioquímicos que podían determinar el rol específico de las proteínas Sco en el ensamblado del centro Cu_A. Además se cuenta con todas las proteínas involucradas en el proceso en su forma soluble por lo que podemos usar RMN para poder observar tanto el proceso de reducción o metalación a través de espectros del tipo HSQC que permiten seguir el estado de la proteína en estudio. El trabajo con los dominios solubles para evaluar las funciones de las proteínas es válido ya que se reportó *in vivo* que estos poseen toda la función necesaria para el correcto ensamblado de COX II.

6.7.1. De la actividad metalochaperona

En la Figura 67 se resumen todas las reacciones de transferencia de Cu(I) desde las proteínas Sco realizadas en la tesis. La única transferencia que se completó en el tiempo de la titulación fue la de la mezcla de Tt3L reducida con la

proteína Sco1-Cu(I) y que esta no tenga actividad metalochaperona al mezclarla con la proteína salvaje $TtCu_A$, indica que los bucles que rodean al sitio de unión al metal son importantes para el reconocimiento por parte de la metalochaperona y le dan especificidad de especie a la reacción y a su vez, validando a Tt3L como modelo mínimo de COX II humana²⁰⁷.

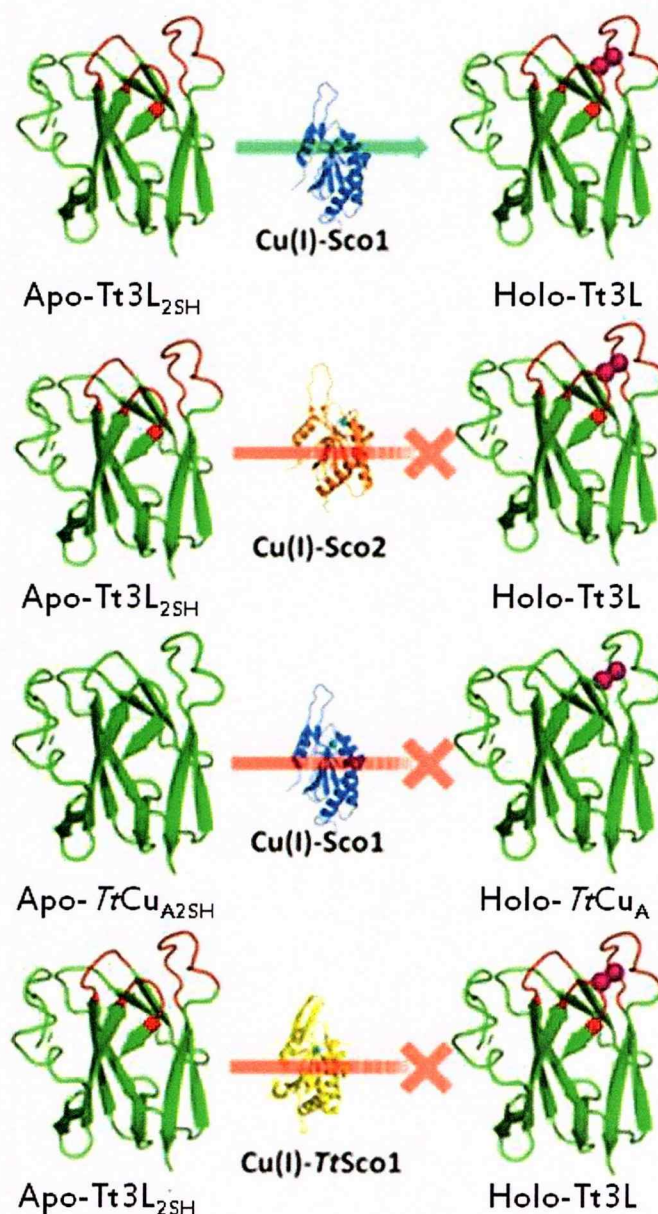


Figura 67. Resumen de las reacciones de transferencia de Cobre realizadas. Sólo la transferencia de Sco1 humana a la proteína quimérica se dio de manera exitosa.

El uso de la proteína *TtSco1*-Cu(I) pudo determinar que además de haber un favorecimiento termodinámico debido a la diferencia de afinidades por el metal²⁰⁹ es el reconocimiento específico el que permite una cinética de la transferencia viable²⁰⁷.

El uso de la proteína *Sco2*, dio una metalación parcial y la presencia de señales en el espectro HSQC que no se corresponden a la proteína *Tt3L* en la forma apo u holo, además de señales con corrimientos respecto a los espectros de referencia. Esto se puede deber a que la proteína *Sco2* tiene una interacción más fuerte con la proteína *Tt3L* causando estas modificaciones en el espectro, sin embargo no se observó un ensanchamiento de las señales, como se esperaría de una interacción fuerte que causaría que los tiempos de correlación de la proteína sean mayores, por lo que de formarse un complejo este transiente, pero con un régimen de intercambio lento que permite la aparición de nuevas señales²⁰⁷.

Debido a lo observado concluimos que *Sco1* es la única que tiene actividad metalochaperona. La búsqueda de las regiones de interacción fue infructuosa, dado que no se observan cambios en el espectro que indiquen algún tipo de interacción. Se podría intentar hacer espectros del tipo TROSY-HSQC que aumentan la resolución de las señales, y permitirían seguir cambios muy pequeños en los desplazamientos químicos que permitan determinar regiones de interacción.

6.7.2. De la transferencia de electrones

La reducción de los puentes disulfuro de la proteína COX II es un evento fundamental para la metalación de la proteína, dado el ambiente oxidante del espacio intermembrana mitocondrial.

Ambas proteínas *Sco* tienen un plegamiento de tipo tiorredoxina y unen al cobre a través de los residuos de Cys y una His, por lo que podrían estar involucrados en reacciones de transferencia de electrones.

Dado los potenciales de reducción de las tres proteínas involucradas sólo *Sco2* es capaz de reducir a *Tt3L*, sin embargo es necesaria la presencia de iones

unm

cobre unidos para que la reacción sea completa. Esto le daría al cobre dos roles, uno ya conocido como en el caso de Cox 17 y Sco1 que es el incremento del poder reductor de la proteína. Por otro lado el cobre tendría un rol protector del estado redox de las Cys de Sco2. Esto tiene un rol funcional, dado que mutantes Sco2 con capacidad de unión a cobre disminuidas (menor afinidad) presentan deficiencias en la formación de una COX II funcional incluso con todos los ligandos de unión a cobre conservados.

A pesar de que sabemos que Sco2 es la encargada de la reducción de la proteína no podemos definir si los electrones provienen de los residuos de Cys o de los iones Cobre. Los espectros de EPR fueron registrados a 45K, si el Cu(I) pasa a Cu(II) en el proceso, y debido a que Sco2 tiene una menor afinidad y son liberados al medio, las señales correspondientes a los iones Cu(II) en solución se hubieran observado mejor a temperatura ambiente, por lo que habría que repetir el experimento para poder discriminar mejor el origen de los electrones.

6.7.3. Del orden de interacción

Cuando intentamos seguir el proceso completo de formación del centro Cu_A, empleando RMN hemos visto que hay una relevancia en el orden de agregado de las proteínas Sco. En el caso de agregar a la mezcla de proteína Sco2-Cu(I) se observa disminución de las señales que podrían indicar una posible reducción de la proteína Tt3L, sin embargo luego Sco1 no tiene capacidad de metalar a la proteína. Esto puede deberse a que Sco2 forma un complejo que bloquea la interacción por parte de Sco1 bloqueando el proceso de metalación.

Sin embargo si el agregado de Sco2-Cu(I), el reductor, se hace en presencia de Sco1 en la mezcla de reacción, se observa la aparición de las señales correspondientes a la holo proteína, indicando que la interacción de Sco1 no afecta la interacción específica por parte de Sco2.

Capítulo 7. Conclusiones

Durante el período de doctorado hemos logrado construir un modelo mínimo de la subunidad COX II humana, Tt3L mediante un injerto de los bucles de la proteína eucariota en el esqueleto de barril β de la subunidad COX II de *Thermus thermophilus*. Esta proteína tiene un comportamiento similar a la proteína salvaje, se expresa en forma soluble y estable, tiene la capacidad de incorporar cobre formando un centro Cu_A nativo que fue estudiado mediante distintas espectroscopías (UV-Vis, EPR, EXAFS, RMN).

Empleando este modelo se pudieron obtener las siguientes conclusiones:

- 1- El centro Cu_A a pesar de ser un centro con alta rigidez tiene una estructura electrónica muy sensible a pequeños cambios en el entorno. La mutante Tt3L sólo presenta mutaciones de segunda esfera de coordinación, es decir conserva tanto la longitud como los residuos del bucle de unión al metal. Sin embargo presenta una estructura electrónica similar a la mutante M160H ya estudiada por nuestro laboratorio con una población en el estado π_u incrementada respecto a la proteína salvaje. Esta mutante nos permitió confirmar que este estado a pesar de tener una energía de reorganización desfavorable para reacciones de TE, el aumento en el acoplamiento dado por la activación del estado π_u permite que las velocidades de TE se mantengan constantes. Esto es importante dado que la presencia de dos estados electrónicos funcionales en este centro favorecería la direccionalidad de las reacciones de TE en las que participa^{108,111}.
- 2- La presencia de los residuos de superficie de la proteína humana alrededor del centro Cu_A permitieron el reconocimiento específico por parte de la proteína Sco1, que actúa como la metalochaperona mitocondrial específica del COX II²⁰⁷.
- 3- Se logró determinar que de Sco2 tiene actividad tiol-disulfuro oxidoreductasa sobre COX II, determinando que ambas tienen roles específicos y complementarios en el ensamblado como ya había sido

reportado *in vivo* en los trabajos que inspiraron el objetivo principal de esta tesis²⁰⁷.

- 4- La proteína Tt3L sirve como modelo para investigar las causas de otras mutantes que desenlazan enfermedades fatales por deficiencia de COX, como la proteína COA6, que fueron reportadas como proteínas accesorias de las proteínas Sco.

Capítulo 8. Resumen

El cobre es un metal de transición esencial para la sobrevivencia de muchos organismos. Es un cofactor importante para proteínas que catalizan procesos fundamentales dentro de las células. Sin embargo fallas en el control de los niveles del mismo pueden desencadenar procesos tóxicos como la reacción de Fenton o la unión de estos iones a sitios proteicos adventicios que llevan a la pérdida de función enzimática de las proteínas afectadas.

Debido a esta dualidad esencialidad/toxicidad, las células han generado distintos mecanismos para regular los niveles de cobre de manera de minimizar los efectos tóxicos. Estos mecanismos incluyen la compartimentalización de los iones cobre, la producción metalotioneínas o el bombeo del exceso al espacio extracelular. Un rol fundamental en este proceso de homeostasis lo cumplen proteínas metalochaperonas que unen Cu(I) dentro de las células y lo transfieren de manera específica para la activación de las proteínas que lo emplean como cofactor.

En la mitocondria sólo dos proteínas requieren iones cobre para su función. La Cu-Zn superóxido-dismutasa mitocondrial (SOD) que tiene actividad detoxificante y la citocromo *c* oxidasa (COX) involucrada en el proceso de fosforilación oxidativa. La activación de SOD se da mediante su metalochaperona específica CCS mientras que COX requiere iones cobre para la formación del centro Cu_B en COX I que estaría mediado por la proteína accesoria Cox 11 y para la formación del centro dinuclear Cu_A en COX II cuyo mecanismo de ensamblado no se encontraba definido.

Experimentos en cultivo celular permitieron definir a las proteínas Sco1 y Sco2 como posibles metalochaperonas de COX II, sin embargo no se pudo determinar el rol de cada una debido a la imposibilidad de seguir la metalación de las mismas en el proceso.

El centro Cu_A posee dos iones cobre unidos a puente por dos átomos de S de las cadenas laterales de residuos de Cys formando una estructura de diamante rígida. Además cada ion cobre tiene unido un imidazol de un residuo de His y

como ligandos axiales débiles un carbonilo del esqueleto peptídico y el tioéter de un residuo de Met.

Este centro Cu_A es esencial para el funcionamiento del complejo COX, dado que es el punto de entrada de los electrones provenientes del citocromo *c* reducido, que luego son transferidos al grupo hemo *a/b* en COX I. Estas reacciones de transferencia electrónica se dan con alta eficiencia a pesar de la baja fuerza impulsora, las largas distancias entre los distintos centros redox y la baja conductividad el medio proteico. Esto ha sido atribuido a la rigidez del centro metálico y a su particular estructura electrónica que presenta dos estados electrónicos fundamentales alternativos rápidamente interconvertibles entre sí σ_u^* y π_u .

Al inicio de la tesis se contaba con los dominios solubles de las proteínas Sco1 y Sco2, sin embargo intentos de obtener el dominio soluble de COX II humana fueron infructuosos, impidiendo la realización de experimentos bioquímicos *in vitro* que permitan probar las actividades de cada una de estas proteínas con COX II durante en el ensamblado del centro Cu_A .

Por lo tanto nos planteamos obtener un modelo mínimo de COX II humana que se exprese de manera soluble y estable, permitiendo el reconocimiento específico por parte de las proteínas Sco y poder cumplir con el objetivo principal de esta tesis definir el rol específico de las proteínas Sco1 y Sco2 en el ensamblado del centro Cu_A mitocondrial.

Para lograr este objetivo nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener un modelo mínimo soluble y estable de la proteína COX II humana
2. Análisis de la estructura del centro Cu_A formado en el modelo mínimo

3. Realizar los experimentos bioquímicos y biofísicos de interacción proteína-proteína Sco-COX II de manera de analizar los posibles roles de las proteínas Sco.

Diseñamos un modelo mínimo de COX II al que llamamos Tt3L, se intercambiaron los bucles que rodean el sitio de unión al metal en la proteína COX II humana por los presentes en la proteína bacteriana *TtCu_A* manteniendo el esqueleto proteico estable de la proteína termófila. Esta proteína se expresa en forma soluble y forma un centro *Cu_A* nativo, con una estructura electrónica distorsionada con respecto a la proteína salvaje a pesar de conservar tanto los ligandos como la longitud de los bucles rodeando al centro metálico.

Estudios espectroscópicos empleado la forma holo oxidada de Tt3L (UV-Vis, EPR, RMN, EXAFS) mostraron que la estructura electrónica del centro tiene un incremento en la población del estado electrónico π_u a temperatura ambiente, pero que a pesar de tener energías de reorganización elevada, no se ve afectada su capacidad de transferencia electrónica, indicando que este estado electrónico podría tener un rol funcional en la direccionalidad de las reacciones de TE que mediadas por este centro^{108,111}.

Una vez obtenida una proteína modelo de COX II humana se realizaron las pruebas de interacción con las proteínas Sco. El ensamblado del centro *Cu_A* *in vivo* requiere de dos procesos fundamentales, una proteína que tenga actividad tiol-disulfuro oxidorreductasa encargada de mantener las Cys del sitio de unión a cobre en COX II reducidas, en el ambiente oxidante del espacio intermembrana mitocondrial, y una proteína metalochaperona que transfiera los iones cobre a COX II una vez que esta se encuentra reducida. Las proteínas Sco podrían cumplir ambas funciones dado que unen Cu(I) en un motivo CX₃C.

Los experimentos de ensamblado del centro *Cu_A* mitocondrial por parte de las proteínas Sco empleando a esta quimera permitieron definir a Sco1 como metalochaperona específica del centro, a su vez validando el uso de la quimera para seguir este proceso, dado que Sco1 no fue capaz de transferir iones cobre a la proteína salvaje *TtCu_A*²⁰⁷.

Por otro lado se determinó que la proteína Sco2 es la encargada de mantener la homeostasis redox de las Cys en COX II. Sin embargo esta actividad es dependiente de la unión a Cu(I) de la misma, por lo que no se ha podido definir fehacientemente si los equivalentes de reducción provienen del motivo Cx₃C de Sco2 o del Cu(I)²⁰⁷.

La complementariedad de función de ambas proteínas Sco y el requerimiento de la unión a Cu(I) por parte de Sco2 está de acuerdo con todos los resultados reportados anteriormente que inspiraron este trabajo. Sco1 y Sco2 tienen actividades esenciales y complementarias en el ensamblado del centro Cu_A y mutantes que afectan la capacidad de unión al metal o la capacidad redox de las miasmas pueden afectar la formación de un complejo COX funcional.

Capítulo 9. Referencias

1. Robinson, N. J. & Winge, D. R. (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* 79, 537-562.
2. Leary, S. C. & Sasarman, F. (2009) Oxidative phosphorylation: synthesis of mitochondrially encoded proteins and assembly of individual structural subunits into functional holoenzyme complexes. *Methods Mol.Biol.* 554, 143-162.
3. Arredondo, M. & Nunez, M. T. (2005) Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 26, 313-327.
4. Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Elde, D., Moehle, C., Kaplan, J. & Klausner, R. D. (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell (Cambridge,Mass)* 76, 393-402.
5. O'Dell, B. L. (1981) Roles for iron and copper in connective tissue biosynthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 294, 91-104.
6. Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., Wichers, H. J. & Dijkstra, B. W. (2011) Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50, 5477-5486.
7. Kaler, S. G. & Holmes, C. S. (2013) Catecholamine metabolites affected by the copper-dependent enzyme dopamine-beta-hydroxylase provide sensitive biomarkers for early diagnosis of menkes disease and viral-mediated ATP7A gene therapy. *Adv Pharmacol* 68, 223-233.
8. Djoko, K. Y., Ong, C. L., Walker, M. J. & McEwan, A. G. (2015) The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. *J Biol Chem* 290, 18954-18961.

9. Samanovic, Marie I., Ding, C., Thiele, Dennis J. & Darwin, K. H. (2012) Copper in Microbial Pathogenesis: Meddling with the Metal. *Cell Host & Microbe* 11, 106-115.
10. Djoko, K. Y., Ong, C.-I. Y., Walker, M. J. & McEwan, A. G. (2015) The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 290, 18954-18961.
11. García-Santamarina, S. & Thiele, D. J. (2015) Copper at the Fungal Pathogen-Host Axis. *Journal of Biological Chemistry* 290, 18945-18953.
12. Aguirre, G. & Pilon, M. (2015) Copper Delivery to Chloroplast Proteins and its Regulation. *Front Plant Sci* 6, 1250.
13. Harris, E. D. (2003) Basic and clinical aspects of copper. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40, 547-586.
14. Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J. & Jensen, J. H. (2004) Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8010-8019.
15. Ridge, P. G., Zhang, Y. & Gladyshev, V. N. (2008) Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* 3, e1378.
16. Manzl, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R. & Krumschnabel, G. (2004) Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology* 196, 57-64.
17. Lloyd, D. R. & Phillips, D. H. (1999) Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res* 424, 23-36.

18. Qian, Y., Zheng, Y., Abraham, L., Ramos, K. S. & Tiffany-Castiglioni, E. (2005) Differential profiles of copper-induced ROS generation in human neuroblastoma and astrocytoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 323-332.
19. Irving, H. & Williams, R. J. P. (1948) Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* 162, 746-747.
20. Macomber, L. & Imlay, J. A. (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 8344-8349.
21. Bondarczuk, K. & Piotrowska-Seget, Z. (2013) Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology* 29, 397-405.
22. Ladomersky, E. & Petris, M. J. (2015) Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* 7, 957-964.
23. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. & O'Halloran, T. V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808.
24. Rae, T. D., Torres, A. S., Pufahl, R. A. & O'Halloran, T. V. (2001) Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol.Chem* 276, 5166-5176.
25. O'Halloran, T. V. & Culotta, V. C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol.Chem* 275, 25057-25060.
26. Polishchuk, R. & Lutsenko, S. (2013) Golgi in copper homeostasis: a view from the membrane trafficking field. *Histochem Cell Biol* 140, 285-295.
27. Prohaska, J. R. (2008) Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr* 88, 826S-829S.
28. Prohaska, J. R. & Gybina, A. A. (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr.* 134, 1003-1006.

29. Suzuki, K. T., Someya, A., Komada, Y. & Ogra, Y. (2002) Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem* 88, 173-182.
30. Evering, W. E., Haywood, S., Bremner, I., Wood, A. M. & Trafford, J. (1991) The protective role of metallothionein in copper-overload: II. Transport and excretion of immunoreactive MT-1 in blood, bile and urine of copper-loaded rats. *Chem Biol Interact* 78, 297-305.
31. Bertinato, J., Iskandar, M. & L'Abbe, M. R. (2003) Copper deficiency induces the upregulation of the copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase in weanling male rats. *J Nutr* 133, 28-31.
32. Kang, S., Xiao, G., Ren, D., Zhang, Z., Le, N., Trentalange, M., Gupta, S., Lin, H. & Bondarenko, P. V. (2014) Proteomics analysis of altered cellular metabolism induced by insufficient copper level. *J Biotechnol* 189, 15-26.
33. Gubler, C. J., Lahey, M. E., Cartwright, G. E. & Wintrobe, M. M. (1953) Studies on copper metabolism. IX. The transportation of copper in blood. *J Clin Invest* 32, 405-414.
34. Lahey, M. E., Gubler, C. J., Brown, D. M., Smith, E. L., Jager, B. V., Cartwright, G. E. & Wintrobe, M. M. (1953) Studies on copper metabolism. VIII. The correlation between the serum copper level and various serum protein fractions. *J Lab Clin Med* 41, 829-835.
35. Lee, J., Pena, M. M., Nose, Y. & Thiele, D. J. (2002) Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* 277, 4380-4387.
36. Lee, J., Petris, M. J. & Thiele, D. J. (2002) Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem* 277, 40253-40259.

37. Kim, B.-E., Nevitt, T. & Thiele, D. J. (2008) Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 4, 176-185.
38. Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Kozyreva, T., Massagni, C., Palumaa, P., Rubino, J. T. & Zovo, K. (2012) Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13555-13560.
39. Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Inagaki, S., Migliardi, M. & Rosato, A. (2010) The binding mode of ATP revealed by the solution structure of the N-domain of human ATP7A. *J Biol. Chem* 285, 2537-2544.
40. Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Massagni, C., Migliardi, M. & Rosato, A. (2009) An NMR study of the interaction of the N-terminal cytoplasmic tail of the Wilson disease protein with copper(I)-HAH1. *J Biol. Chem* 284, 9354-9360.
41. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Chasapis, C. T., Hadjiliadis, N. & Rosato, A. (2005) An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein. *FEBS J* 272, 865-871.
42. Lutsenko, S., Efremov, R. G., Tsivkovskii, R. & Walker, J. M. (2002) Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): biochemical properties and regulation. *J Bioenerg Biomembr* 34, 351-362.
43. Lutsenko, S., Tsivkovskii, R. & Walker, J. M. (2003) Functional properties of the human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) and regulation by metallochaperone Atox1. *Ann N Y Acad Sci* 986, 204-211.
44. Wernimont, A. K., Huffman, D. L., Lamb, A. L., O'Halloran, T. V. & Rosenzweig, A. C. (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat. Struct. Biol.* 7, 766-771.

45. Spritz, R. A., Ho, L., Furumura, M. & Hearing, V. J. (1997) Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest Dermatol.* 109, 207-212.
46. Johnson, W. T., Johnson, L. A. & Lukaski, H. C. (2005) Serum superoxide dismutase 3 (extracellular superoxide dismutase) activity is a sensitive indicator of Cu status in rats. *J Nutr Biochem* 16, 682-692.
47. Zaballa, M. E., Ziegler, L., Kosman, D. J. & Vila, A. J. (2010) NMR study of the exchange coupling in the trinuclear cluster of the multicopper oxidase Fet3p. *J Am. Chem Soc.* 132, 11191-11196.
48. Culotta, V. C., Lin, S. J., Schmidt, P., Klomp, L. W., Casareno, R. L. & Gitlin, J. (1999) Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 448:247-54, 247-254.
49. Camakaris, J., Petris, M. J., Bailey, L., Shen, P., Lockhart, P., Glover, T. W., Barcroft, C., Patton, J. & Mercer, J. F. (1995) Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P-type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. *Hum Mol Genet* 4, 2117-2123.
50. Cobine, P. A., Pierrel, F. & Winge, D. R. (2006) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 759-772.
51. Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. (1996) Heme/copper terminal oxidases. *Chem. Rev.* 96, 2889-2907.
52. Hofmann, A., Banci, L., Barbieri, L., Bertini, I., Cantini, F. & Luchinat, E. (2011) In-cell NMR in E. coli to Monitor Maturation Steps of hSOD1. *PLoS One* 6, e23561.
53. Cobine, P. A., Pierrel, F., Bestwick, M. L. & Winge, D. R. (2006) Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281, 36552-36559.

54. Keightley, J. A., Zimmermann, B. H., Mather, M. W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D. M. & Fee, J. A. (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome ba3 from *Thermus thermophilus* HB8. *J.Biol.Chem.* 270, 20345-20358.
55. Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F. M. & Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome ba 3 : A second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 5779-5783.
56. Capaldi, R. A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59, 569-596.
57. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
58. Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J. & Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817, 883-897.
59. Barrientos, A., Barros, M. H., Valnot, I., Rotig, A., Rustin, P. & Tzagoloff, A. (2002) Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286, 53-63.
60. Hunsicker-Wang, L. M., Pacoma, R. L., Chen, Y., Fee, J. A. & Stout, C. D. (2005) A novel cryoprotection scheme for enhancing the diffraction of crystals of recombinant cytochrome ba3 oxidase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol.Crystallogr* 61, 340-343.
61. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269, 1071-1074.

62. Ramirez, B. E., Malmström, B. G., Winkler, J. R. & Gray, H. B. (1995) The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11949-11951.
63. Maneg, O., Malatesta, F., Ludwig, B. & Drosou, V. (2004) Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochim Biophys Acta* 1655, 274-281.
64. Medvedev, D. M., Daizadeh, I. & Stuchebrukhov, A. A. (2000) Electron Transfer Tunneling Pathways in Bovine heart Cytochrome c Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6571-6582.
65. Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I. & Kadenbach, B. (2001) Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem.* 2, 392-403.
66. Williams, P. A., Blackburn, N. J., Sanders, D., Bellamy, H., Stura, E. A., Fee, J. A. & McRee, D. E. (1999) The CuA domain of *Thermus thermophilus* ba3-type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution. *Nat Struct Biol* 6, 509-516.
67. Belevich, I., Verkhovsky, M. I. & Wikstrom, M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature* 440, 829-832.
68. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y. & Shimada, H. (2006) Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1110-1116.
69. Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S. & Schon, E. A. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23, 333-337.

70. Jaksch, M., Ogilvie, I., Yao, J., Kortenhaus, G., Bresser, H. G., Gerbitz, K. D. & Shoubridge, E. A. (2000) Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 9, 795-801.
71. Shoubridge, E. A. (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am.J Med.Genet.* 106, 46-52.
72. Paret, C., Lode, A., Krause-Buchholz, U. & Rodel, G. (2000) The P(174)L mutation in the human hSCO1 gene affects the assembly of cytochrome c oxidase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 279, 341-347.
73. Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N., Mehaye, B., Amiel, J., Cormier-Daire, V., Munnich, A., Bonnefont, J. P., Rustin, P. & Rotig, A. (2000) Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am.J Hum.Genet.* 67, 1104-1109.
74. Horng, Y. C., Leary, S. C., Cobine, P. A., Young, F. B., George, G. N., Shoubridge, E. A. & Winge, D. R. (2005) Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J Biol.Chem* 280, 34113-34122.
75. Leary, S. C., Kaufman, B. A., Pellecchia, G., Guercin, G. H., Mattman, A., Jaksch, M. & Shoubridge, E. A. (2004) Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum.Mol.Genet.* 13, 1839-1848.
76. Horvath, R., Lochmuller, H., Stucka, R., Yao, J., Shoubridge, E. A., Kim, S. H., Gerbitz, K. D. & Jaksch, M. (2000) Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 276, 530-533.
77. Glerum, D. M., Shtanko, A. & Tzagoloff, A. (1996) SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol.Chem* 271, 20531-20535.

78. Nittis, T., George, G. N. & Winge, D. R. (2001) Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein. *J Biol.Chem* 276, 42520-42526.
79. Sato, Y., Ohta, H., Yamagishi, T., Guo, Y., Nishizawa, T., Rahman, M. H., Kuroda, H., Kato, T., Saito, M., Yoshinaga, I., Inubushi, K. & Suwa, Y. (2012) Detection of anammox activity and 16S rRNA genes in ravine paddy field soil. *Microbes Environ* 27, 316-319.
80. Abriata, L. A., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gkazonis, P., Spyroulias, G. A., Vila, A. J. & Wang, S. (2008) Mechanism of Cu(A) assembly. *Nat Chem Biol* 4, 599-601.
81. Leary, S. C. (2010) Redox regulation of SCO protein function: controlling copper at a mitochondrial crossroad. *Antioxid.Redox.Signal.* 13, 1403-1416.
82. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Hadjiloi, T., Martinelli, M. & Palumaa, P. (2008) Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6803-6808.
83. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Janicka, A., Martinelli, M., Kozlowski, H. & Palumaa, P. (2008) A structural-dynamical characterization of human Cox17. *J Biol Chem* 283, 7912-7920.
84. Beinert, H. (1997) Copper A of cytochrome c oxidase, a novel, long-embattled, biological electron transfer site. *European Journal of Biochemistry* 245, 521-532.
85. Zumft, W. G. (2005) Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10, 154-166.
86. Paumann, M., Lubura, B., Regelsberger, G., Feichtinger, M., Kollensberger, G., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A. & Obinger, C. (2004) Soluble CuA domain of cyanobacterial cytochrome c oxidase. *J.Biol.Chem* 279, 10293-10303.

87. Charnock, J. M., Dreusch, A., Korner, H., Neese, F., Nelson, J., Kannt, A., Michel, H., Garner, C. D., Kroneck, P. M. & Zumft, W. G. (2000) Structural investigations of the CuA centre of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri* by site-directed mutagenesis and X-ray absorption spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 267, 1368-1381.
88. Kroneck, P. M., Antholine, W. E., Kastrau, D. H., Buse, G., Steffens, G. C. & Zumft, W. G. (1990) Multifrequency EPR evidence for a bimetallic center at the CuA site in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* 268, 274-276.
89. Kroneck, P. M. H., Antholine, W. E., Riester, J. & Zumft, W. G. (1988) The cupric site in nitrous oxide reductase contains a mixed-valence [Cu(II),Cu(I)] binuclear center: a multifrequency electron paramagnetic resonance investigation. *FEBS Lett.* 242, 70-74.
90. Xie, X., Gorelsky, S. I., Sarangi, R., Garner, D. K., Hwang, H. J., Hodgson, K. O., Hedman, B., Lu, Y. & Solomon, E. I. (2008) Perturbations to the geometric and electronic structure of the CuA site: factors that influence delocalization and their contributions to electron transfer 5. *J.Am.Chem.Soc.* 130, 5194-5205.
91. Hwang, H. J. & Lu, Y. (2004) pH-dependent transition between delocalized and trapped valence states of a CuA center and its possible role in proton-coupled electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12842-12847.
92. Yoshikawa, S., Muramoto, K. & Shinzawa-Itoh, K. (2012) Reaction mechanism of mammalian mitochondrial cytochrome c oxidase. *Adv Exp Med Biol* 748, 215-236.
93. Farver, O., Chen, Y., Fee, J. A. & Pecht, I. (2006) Electron transfer among the CuA-, heme b- and a3-centers of *Thermus thermophilus* cytochrome ba3. *FEBS Lett* 580, 3417-3421.

94. Farver, O., Grell, E., Ludwig, B., Michel, H. & Pecht, I. (2006) Rates and Equilibrium of CuA to heme a electron transfer in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Biophys.J* 90, 2131-2137.
95. Farver, O., Einarsdottir, O. & Pecht, I. (2000) Electron transfer rates and equilibrium within cytochrome c oxidase. *European Journal of Biochemistry* 267, 950-954.
96. Marcus, R. A. (1956) On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I. *The Journal of Chemical Physics* 24, 966.
97. Marcus, R. A. & Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim.Biophys.Acta* 811, 265-322.
98. Gray, H. B. & Winkler, J. R. (2005) Long-range electron transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 3534-3539.
99. Gray, H. B. & Winkler, J. R. (2003) Electron tunneling through proteins. *Q.Rev.Biophys.* 36, 341-372.
100. Gray, H. B. & Winkler, J. R. (1996) Electron transfer in proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 65, 537-561.
101. Winkler, J. R. & Gray, H. B. (2014) Long-Range Electron Tunneling. *Journal of the American Chemical Society* 136, 2930-2939.
102. Winkler, J. R. & Gray, H. B. (2014) Electron Flow through Metalloproteins. *Chemical Reviews* 114, 3369-3380.
103. Ramirez, B. E., Malmström, B. G., Winkler, J. R. & Gray, H. B. (1995) The currents of life: The terminal electron-transfer complex of respiration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 11949-11951.
104. Gamelin, D. R., Randall, D. W., Hay, M. T., Houser, R. P., Mulder, T. C., Canters, G. W., De Vries, S., Tolman, W. B. & Solomon, E. I. (1998) Spectroscopy of a Mixed-Valence Cu A -Type Centers: Ligand Field Control of

Ground-State Properties Related to Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5246-5263.

105. de Beer, S., Markus, M., Wang, H., Cramer, S. P., Lu, Y., Tolman, W. B., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (2001) 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, 5757-5767.

106. Abriata, L. A., Alvarez-Paggi, D., Ledesma, G. N., Blackburn, N. J., Vila, A. J. & Murgida, D. H. (2012) Alternative ground states enable pathway switching in biological electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17348-17353.

107. Solomon, E. I., Xie, X. & Dey, A. (2008) Mixed valent sites in biological electron transfer. *Chemical Society Reviews* 37, 623.

108. Zitare, U., Alvarez-Paggi, D., Morgada, M. N., Abriata, L. A., Vila, A. J. & Murgida, D. H. (2015) Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in Cu(A) Sites of Cytochrome c Oxidase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 9555-9559.

109. Dennison, C., Berg, A., De Vries, S. & Canters, G. W. (1996) ¹H NMR Studies of the Paramagnetic Cu A Center of Cytochrome Oxidase. *FEBS Lett.* 394, 340-344.

110. Lappalainen, P., Aasa, R., Malmström, B. G. & Saraste, M. (1993) Soluble CuA-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 26416-26421.

111. Morgada, M. N., Abriata, L. A., Zitare, U., Alvarez-Paggi, D., Murgida, D. H. & Vila, A. J. (2014) Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 6188-6192.

112. Ledesma, G. N., Murgida, D. H., Ly, H. K., Wackerbarth, H., Ulstrup, J., Costa-Filho, A. J. & Vila, A. J. (2007) The Met Axial Ligand Determines the Redox Potential in Cu(A) Sites. *J Am. Chem Soc.* 129, 11884-11885.
113. Slutter, C. E., Gromov, I., Epel, B., Pecht, I., Richards, J. H. & Goldfarb, D. (2001) Pulsed EPR/ENDOR Characterization of Perturbations of the Cu A Center Ground State by Axial Methionine Ligand Perturbations. *J Am. Chem. Soc.* 123, 5325-5332.
114. Slutter, C. E., Gromov, I., Richards, J. H., Pecht, I. & Goldfarb, D. (1999) Mutations of the Weak Axial Ligand in the Thermus Cu A Center Modulates Its Electronic Structure. *J Am. Chem. Soc.* 121, 5077-5078.
115. Slutter, C. E., Sanders, D., Wittung, P., Malmström, B. G., Aasa, R., Richards, J. H., Gray, H. B. & Fee, J. A. (1996) Water-Soluble, Recombinant Cu A-Domain of the Cytochrome ba 3 Subunit II from Thermus thermophilus *Biochemistry* 35, 3387-3395.
116. Muresanu, L., Pristovsek, P., Lohr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., Ruterjans, H., Ludwig, B. & Lucke, C. (2006) The electron transfer complex between cytochrome c552 and the CuA domain of the Thermus thermophilus ba3 oxidase. A combined NMR and computational approach. *J Biol. Chem* 281, 14503-14513.
117. Mukrasch, M. D., Lucke, C., Lohr, F., Maneg, O., Ludwig, B. & Ruterjans, H. (2004) Complete ^1H , ^{15}N and ^{13}C assignment of the soluble domain of the ba3 oxidase subunit II of Thermus thermophilus in the reduced state. *J. Biomol. NMR* 28, 297-298.
118. Wittung-Stafshede, P., Malmström, B. G., Sanders, D., Fee, J. A., Winkler, J. R. & Gray, H. B. (1998) 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, 3172-3177.

119. Blackburn, N. J., Ralle, M., Gomez, E., Hill, M. G., Pastuszyn, A., Sanders, D. & Fee, J. A. (1999) Selenomethionine-substituted *Thermus thermophilus* cytochrome ba3: characterization of the CuA site by Se and Cu K-EXAFS. *Biochemistry* **38**, 7075-7084.
120. van der Oost, J., Lappalainen, P., Musacchio, A., Warne, A., Lemieux, L., Rumbley, J., Gennis, R. B., Aasa, R., Pascher, T. & Malmström, B. G. (1992) Restoration of a lost metal-binding site: construction of two different copper sites into a subunit of the *E. coli* cytochrome o quinol oxidase complex. *EMBO J* **11**, 3209-3217.
121. Hay, M., Richards, J. H. & Lu, Y. (1996) Construction and characterization of an azurin analog for the purple copper site in cytochrome c oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 461-464.
122. Jones, L. H., Liu, A. & Davidson, V. L. (2003) An engineered CuA Amicyanin capable of intermolecular electron transfer reactions. *J.Biol.Chem* **278**, 47269-47274.
123. Dennison, C., Vijgenboom, E., De Vries, S., van der Oost, J. & Canters, G. W. (1995) Introduction of a Cu A site into the blue copper protein amicyanin from *Thiobacillus versutus* *FEBS Lett.* **365**, 92-94.
124. Shiga, D., Funahashi, Y., Masuda, H., Kikuchi, A., Noda, M., Uchiyama, S., Fukui, K., Kanaori, K., Tajima, K., Takano, Y., Nakamura, H., Kamei, M. & Tanaka, T. (2012) Creation of a Binuclear Purple Copper Site within ade NovoCoiled-Coil Protein. *Biochemistry* **51**, 7901-7907.
125. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788.
126. Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J. & Laue, E. D. (2005) The CCPN

data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-696.

127. Keller, R. (2004) CARA - Computer-Aided Resonance Assignment.

128. Inubushi, T. & Becker, E. D. (1983) Efficient detection of paramagnetically shifted NMR resonances by optimizing the WEFT pulse sequence. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 51, 128-133.

129. Bondon, A. & Mouro, C. (1998) PASE (Paramagnetic Signals Enhancement): A New Method for NMR Study of Paramagnetic Proteins. *Journal of Magnetic Resonance* 134, 154-157.

130. Banci, L., Bertini, I., Pierattelli, R. & Vila, A. J. (1994) ^1H - ^{13}C HETCOR Investigations on Heme-Containing Systems. *Inorg.Chem.* 33, 4338-4343.

131. Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., Piccioli, M., Scozzafava, A. & Turano, P. (1989) ^1H NOE studies on Dicopper(II) Dicobalt(II) Superoxide Dismutase. *Inorg.Chem.* 28, 4650-4656.

132. Stoll, S. & Schweiger, A. (2006) Easy Spin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J.Magn Reson.* 178, 42-55.

133. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. & Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba3 -cytochrome oxidase from *Thermus thermophilus* *EMBO J* 19, 1766-1776.

134. Mayer, C., Tiefenbrunn, T., Liu, W., Chen, Y., Katritch, V., Stout, C. D., Fee, J. A. & Cherezov, V. (2011) High Resolution Structure of the ba3 Cytochrome c Oxidase from *Thermus thermophilus* in a Lipidic Environment. *PLoS One* 6, e22348.

135. Zaballa, M. E., Abriata, L. A., Donaire, A. & Vila, A. J. (2012) Flexibility of the metal-binding region in apo-cupredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9254-9259.
136. van Dijk, A. D., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., Bertini, I., Boelens, R. & Bonvin, A. M. (2007) Modeling protein-protein complexes involved in the cytochrome C oxidase copper-delivery pathway. *J Proteome Res* 6, 1530-1539.
137. Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Mangani, S., Martinelli, M., Palumaa, P. & Wang, S. (2006) A hint for the function of human Sco1 from different structures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 8595-8600.
138. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280, 1723-1729.
139. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. (2004) The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37, 203-206.
140. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gerothanassis, I. P., Leontari, I., Martinelli, M. & Wang, S. (2007) A structural characterization of human SCO2. *Structure* 15, 1132-1140.
141. Bertini, I., Bren, K. L., Clemente, A., Fee, J. A., Gray, H. B., Luchinat, C., Malmström, B. G., Richards, J. H., Sanders, D. & Slutter, C. E. (1996) The CuA Center of a soluble domain from Thermus Cytochrome ba3. An NMR investigation of the paramagnetic protein. *J.Am.Chem.Soc.* 118, 11658-11659.
142. Karpefors, M., Slutter, C. E., Fee, J. A., Aasa, R., Kallebring, B., Larsson, S. & Vnngrd, T. (1996) Electron Paramagnetic Resonance Studies of

the Soluble Cu A Protein from the Cytochrome ba 3 of *Thermus thermophilus*
Biophys.J. 71, 2823-2329.

143. Blackburn, N. J., De Vries, S., Barr, M. E., Houser, R. P., Tolman, W. B., Sanders, D. & Fee, J. A. (1997) X-ray absorption studies on the mixed-valence and fully reduced forms of the soluble Cu A domains of cytochrome c oxidase. *J.Am.Chem.Soc.* 119, 6135-6143.

144. Hay, M. T., Ang, M. C., Gamelin, D. R., Solomon, E. I., Antholine, W., Ralle, M., Blackburn, N. J., Wang, X., Kwon, A. H. & Lu, Y. (1998) Spectroscopic Characterization of an Engineered Purple Cu A Center in Azurin. *Inorg.Chem.* 37, 191-198.

145. Gorelsky, S. I., Xie, X., Chen, Y., Fee, J. A. & Solomon, E. I. (2006) The two-state issue in the mixed-valence binuclear CuA center in cytochrome C oxidase and N2O reductase 22. *J.Am.Chem.Soc.* 128, 16452-16453.

146. Olsson, M. H. & Ryde, U. (2001) Geometry, reduction potential, and reorganization energy of the binuclear Cu(A) site, studied by density functional theory. *J.Am.Chem Soc.* 123, 7866-7876.

147. Blackburn, N. J., Barr, M. E., Woodruff, W. H., van der Oost, J. & De Vries, S. (1994) Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 Å copper-copper bond in the CuA center of cytochrome oxidase. *Biochemistry* 33, 10401-10407.

148. Williams, K. R., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B., Houser, R. P., Tolman, W. B., Mulder, T. C., De Vries, S., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (1997) Influence of copper-sulfur covalency and copper-copper bonding on valence delocalization and electron transfer in the CuA site of cytochrome c oxidase. *J.Am.Chem.Soc.* 119, 613-614.

149. Houser, R. P., Young, V. G., Jr. & Tolman, W. B. (1996) A Thiolate-Bridged, Fully Delocalized Mixed-Valence Dicopper(I,II) Complex That Models the CuA Biological Electron-Transfer Site. *J.Am.Chem.Soc.* 118, 2101-2102.

150. Farver, O., Hwang, H. J., Lu, Y. & Pecht, I. (2007) Reorganization energy of the CuA center in purple azurin: impact of the mixed valence-to-trapped valence state transition. *J Phys.Chem B* 111, 6690-6694.
151. Farver, O., Lu, Y., Ang, M. C. & Pecht, I. (1999) Enhanced rate of intramolecular electron transfer in an engineered purple CuA azurin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 899-902.
152. Antholine, W. E., Kastrau, D. H. W., Steffens, G. C. M., Buse, G., Zumft, W. G. & Kroneck, P. M. H. (1992) A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome c oxidase. *European Journal of Biochemistry* 209, 875-881.
153. Pfenninger, S., Antholine, W. E., Barr, M. E., Hyde, J. S., Kroneck, P. M. & Zumft, W. G. (1995) Electron spin-lattice relaxation of the [Cu(1.5) ... Cu(1.5)] dinuclear copper center in nitrous oxide reductase. *Biophys J* 69, 2761-2769.
154. Neese, F., Zumft, W. G., Antholine, W. A. & Kroneck, P. M. H. (1996) 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, 8692-8699.
155. Groeneveld, C. M., Aasa, R., Reinhammar, B. & Canters, G. W. (1987) EPR of azurins from *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes denitrificans* demonstrates pH-dependence of the copper-site geometry in *Pseudomonas aeruginosa* protein. *J.Inorg.Biochem.* 31, 143-154.
156. Mizoguchi, T. J., Di Bilio, A. J., Gray, H. B. & Richards, J. H. (1992) Blue to Type 2 binding. Copper(II) and cobalt(II) derivatives of a Cys112Asp mutant of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. *J.Am.Chem.Soc.* 114, 10076-10078.
157. van Pouderoyen, G., Andrew, C. R., Loehr, T. M., Sanders-Loehr, J., Mazumdar, S., Hill, H. A. O. & Canters, G. W. (1996) 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, 1397-1407.

158. Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Moura, J. J. & Moura, I. (2012) Biochemical characterization of the purple form of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitrous oxide reductase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1204-1212.

159. Abriata, L. A., Ledesma, G. N., Pierattelli, R. & Vila, A. J. (2009) Electronic structure of the ground and excited states of the Cu(A) site by NMR spectroscopy. *J Am. Chem Soc.* 131, 1939-1946.

160. Bertini, I. & Luchinat, C. (1996) *NMR of Paramagnetic Substances*. (Elsevier).

161. von Wachenfeldt, C., De Vries, S. & van der, O. J. (1994) The CuA site of the *caa3*-type oxidase of *Bacillus subtilis* is a mixed-valence binuclear copper centre. *FEBS Lett.* 340, 109-113.

162. Hwang, H. J., Nagraj, N. & Lu, Y. (2006) Spectroscopic characterizations of bridging cysteine ligand variants of an engineered Cu₂(Scys)₂ CuA azurin. *Inorg. Chem* 45, 102-107.

163. Bertini, I., Banci, L. & Luchinat, C. 1989 in *Nuclear Magnetic Resonance, Part B* (eds N. J. Oppenheimer & T. L. James) 246-246 (Methods Enzymol., Vol. 177).

164. Luciano A. Abriata, M.-E. Z. a. A. J. V. 2011 in *Biomolecular NMR spectroscopy* (eds Andrew J. Dingley & Steven M. Pascal) x, 471 p. (IOS Press).

165. Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., Pierattelli, R., Shokhirev, N. V. & Walker, F. A. (1998) Analysis of the Temperature Dependence of the ¹H and ¹³C Isotropic Shifts of Horse Heart Ferricytochrome c: Explanation of Curie and Anti-Curie Temperature Dependence and Nonlinear Pseudocontact Shifts in a Common Two-Level Framework *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8472-8279.

166. Shokhirev, N. V. & Walker, F. A. (1995) Analysis of the Temperature Dependence of the ^1H Contact Shifts in Low-Spin Fe(III) Model Hemes and Heme Proteins: Explanation of "Curie" and "Anti-Curie" Behavior within the Same Molecule. *J.Phys.Chem.* 99, 17795-17804.
167. Banci, L., Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Scozzafava, A. & Vicens Oliver, M. (1991) ^1H NMR spectra of oxidized high-potential iron-sulfur protein (HiPIP) from *Rhodocyclus gelatinosus*. A model for oxidized HiPIPs. *Inorg.Chem.* 30, 4517-4524.
168. Banci, L., Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Scozzafava, A. & Vicens Oliver, M. (1991) ^1H NOE studies of oxidized high potential iron sulfur protein II from *Ectothiorhodospira halophila* *Inorg.Chim.Acta* 180, 171-175.
169. Banci, L., Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C. & Scozzafava, A. 1991 in *Chemistry and properties of biomolecular systems* (eds E. Rizzarelli & T. Theophanides) 73-90 (Kluwer Academic Publishers).
170. Tepper, A. W., Bubacco, L. & Canters, G. W. (2006) Paramagnetic properties of the halide-bound derivatives of oxidised tyrosinase investigated by ^1H NMR spectroscopy 2. *Chemistry.* 12, 7668-7675.
171. Tepper, A. W., Bubacco, L. & Canters, G. W. (2005) Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue p-nitrophenol studied by NMR 4. *J.Am.Chem.Soc.* 127, 567-575.
172. Alvarez-Paggi, D., Abriata, L. A., Murgida, D. H. & Vila, A. J. (2013) Native Cu(A) redox sites are largely resilient to pH variations within a physiological range. *Chem Commun (Camb)* 49, 5381-5383.
173. McConnell, H. M. (1956) Effect of Anisotropic Hyperfine Interactions on Paramagnetic Relaxation in Liquids. *J.Chem.Phys.* 25, 709-711.
174. McConnell, H. M. (1958) Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *J.Chem.Phys.* 28, 430-431.

mm

175. Dennison, C., Berg, A. & Canters, G. W. (1997) A ^1H NMR Study of the Paramagnetic Active Site of the Cu A Variant of Amicyanin. *Biochemistry* 36, 3262-3269.
176. Salgado, J., Warmerdam, G. C., Bubacco, L. & Canters, G. W. (1998) Understanding the electronic properties of the Cu A site from the soluble domain of cytochrome c oxidase through paramagnetic ^1H NMR. *Biochemistry* 37, 7378-7389.
177. Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., Ioannidis, Y. E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C. F., Tolmie, D. E., Kent Wenger, R., Yao, H. & Markley, J. L. (2007) BioMagResBank. *Nucleic Acids Research* 36, D402-D408.
178. Marshall, N. M., Garner, D. K., Wilson, T. D., Gao, Y. G., Robinson, H., Nilges, M. J. & Lu, Y. (2009) Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range. *Nature* 462, 113-116.
179. Tsai, M. L., Hadt, R. G., Marshall, N. M., Wilson, T. D., Lu, Y. & Solomon, E. I. (2013) 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, 14658-14663.
180. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Ogura, T., Shimokata, K., Katayama, Y. & Shimada, H. (2006) Reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase 3. *Biochim.Biophys.Acta* 1757, 395-400.
181. Immoos, C., Hill, M. G., Sanders, D., Fee, J. A., Slutter, C. E., Richards, J. H. & Gray, H. B. (1996) Electrochemistry of the Cu A domain of *Thermus thermophilus* cytochrome ba 3 *J.Biol.Inorg.Chem* 1, 529-531.
182. Blair, D. F., Gelles, J. & Chan, S. I. (1986) Redox-linked proton translocation in cytochrome oxidase: the importance of gating electron flow. The effects of slip in a model transducer. *Biophys.J.* 50, 713-733.

u m m

183. Ellis, W. R., Wang, H., Blair, D. F., Gray, H. B. & Chan, S. I. (1986) Spectroelectrochemical study of the cytochrome a site in carbon monoxide-inhibited cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 25, 161-167.
184. Banci, L., Bertini, I., McGreevy, K. S. & Rosato, A. (2010) Molecular recognition in copper trafficking. *Nat.Prod.Rep.* 27, 695-710.
185. Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Della-Malva, N., Felli, I. C., Neri, S., Pavelkova, A. & Rosato, A. (2009) Copper(I)-mediated protein-protein interactions result from suboptimal interaction surfaces. *Biochem J* 422, 37-42.
186. Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Felli, I. C., Gonnelli, L., Hadjiliadis, N., Pierattelli, R., Rosato, A. & Voulgaris, P. (2006) The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat.Chem.Biol.* 2, 367-368.
187. Leary, S. C., Sasarman, F., Nishimura, T. & Shoubridge, E. A. (2009) Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum.Mol.Genet.* 18, 2230-2240.
188. Leary, S. C., Winge, D. R. & Cobine, P. A. (2009) "Pulling the plug" on cellular copper: the role of mitochondria in copper export. *Biochim.Biophys Acta* 1793, 146-153.
189. Lu, Y. 2004 in *Biocoordination Chemistry Comprehensive Coordination II: From Biology to Biotechnology, Vol. 8* (eds L. Que, Jr. & W. B. Tolman) 91-122 (Elsevier).
190. Hu, J., Dong, L. & Outten, C. E. (2008) The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283, 29126-29134.
191. Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D. & Van den Bogert, C. (1998) Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem* 254, 389-394.

mnm

192. Oswald, C., Krause-Buchholz, U. & Rodel, G. (2009) Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. *J Mol.Biol.* 389, 470-479.
193. Khalimonchuk, O. & Rodel, G. (2005) Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion.* 5, 363-388.
194. Herrmann, J. M. & Funes, S. (2005) Biogenesis of cytochrome oxidase—Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* 354, 43-52.
195. Schulze, M. & Rodel, G. (1988) SCO1, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II. *Mol.Gen.Genet.* 211, 492-498.
196. Papadopoulou, L. C., Sue, C. M., Davidson, M. M., Tanji, K., Nishino, I., Sadlock, J. E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D. M., Coster, R. V., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De, V. D. C., Bonilla, E., Hirano, M., DiMauro, S. & Schon, E. A. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat.Genet.* 23, 333-337.
197. Pecina, P., Houstkova, H., Hansikova, H., Zeman, J. & Houstek, J. (2004) Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res.* 53 Suppl 1, S213-S223.
198. Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S. & Winge, D. R. (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol.Chem* 279, 35334-35340.
199. Attallah, C. V., Welchen, E., Martin, A. P., Spinelli, S. V., Bonnard, G., Palatnik, J. F. & Gonzalez, D. H. (2011) Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. *J Exp.Bot.*

200. Rentzsch, A., Krummeck-Weiss, G., Hofer, A., Bartuschka, A., Ostermann, K. & Rodel, G. (1999) Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase. *Curr.Genet.* 35, 103-108.
201. Balatri, E., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F. & Ciofi-Baffoni, S. (2003) Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly. *Structure.* 11, 1431-1443.
202. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Katsari, E., Katsaros, N., Kubicek, K. & Mangani, S. (2005) A copper(I) protein possibly involved in the assembly of CuA center of bacterial cytochrome c oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 3994-3999.
203. Leary, S. C., Mattman, A., Wai, T., Koehn, D. C., Clarke, L. A., Chan, S., Lomax, B., Eydoux, P., Vallance, H. D. & Shoubridge, E. A. (2006) A hemizygous SCO2 mutation in an early onset rapidly progressive, fatal cardiomyopathy. *Mol.Genet.Metab* 89, 129-133.
204. Tay, S. K., Shanske, S., Kaplan, P. & DiMauro, S. (2004) Association of mutations in SCO2, a cytochrome c oxidase assembly gene, with early fetal lethality. *Arch.Neurol.* 61, 950-952.
205. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Leontari, I., Martinelli, M., Palumaa, P., Sillard, R. & Wang, S. (2007) Human Sco1 functional studies and pathological implications of the P174L mutant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 15-20.
206. Foltopoulou, P. F., Zachariadis, G. A., Politou, A. S., Tsiftoglou, A. S. & Papadopoulou, L. C. (2004) Human recombinant mutated forms of the mitochondrial COX assembly Sco2 protein differ from wild-type in physical state and copper binding capacity. *Mol Genet Metab* 81, 225-236.
207. Morgada, M. N., Abriata, L. A., Cefaro, C., Gajda, K., Banci, L. & Vila, A. J. (2015) Loop recognition and copper-mediated disulfide reduction underpin

metal site assembly of CuAin human cytochrome oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11771-11776.

208. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Mori, M. & Wang, S. (2011) Sco proteins are involved in electron transfer processes. *J Biol.Inorg.Chem* 16, 391-403.

209. Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Zovo, K. & Palumaa, P. (2010) Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature* 465, 645-648.

Capítulo 10. Publicaciones

Datos parciales de este trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

- Morgada, M. N., Abriata, L. A., Zitare, U., Alvarez-Paggi, D., Murgida, D. H. & Vila, A. J. (2014) Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 6188-6192.
- Morgada, M. N., Abriata, L. A., Cefaro, C., Gajda, K., Banci, L. & Vila, A. J. (2015) Loop recognition and copper-mediated disulfide reduction underpin metal site assembly of CuA in human cytochrome oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11771-11776.
- Zitare, U., Alvarez-Paggi, D., Morgada, M. N., Abriata, L. A., Vila, A. J. & Murgida, D. H. (2015) Reversible Switching of Redox-Active Molecular Orbitals and Electron Transfer Pathways in Cu(A) Sites of Cytochrome c Oxidase. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 9555-9559.