

## **6-. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FERREDOXINA EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **6.1-. OBTENCIÓN DE LA FERREDOXINA.**

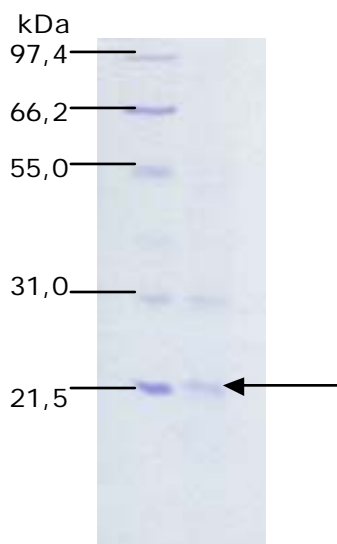
La ferredoxina de *Haloferax mediterranei* se purificó siguiendo el protocolo propuesto por Kerscher (Kerscher *et al.*, 1976). Este proceso ha sido ampliamente descrito en haloarqueas (Kerscher *et al.*, 1976; Kerscher y Oesterhelt, 1977). Puesto que nuestro objetivo es obtener la Fd para posteriores estudios de caracterización, no detallaremos las etapas de purificación llevadas a cabo.

Con el objetivo de estimar la masa molecular de la ferredoxina, parte de la muestra purificada se introdujo en un HPLC-masas (apartado 3.3.5, pág 34). Los resultados obtenidos mostraban que la ferredoxina tiene una masa de 12 kDa. La masa molecular de esta proteína también se estimó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.

***Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).*** La electroforesis en condiciones desnaturizantes de la muestra de Fd purificada, muestra dos bandas de 31 y 21 kDa aproximadamente. Sólo la banda de 21 kDa corresponde a la ferredoxina (figura 6.1, pág 131). Cuando se lleva a cabo SDS-PAGE con proteínas que presentan gran cantidad de aminoácidos ácidos, se sobreestima el peso molecular de la misma. Este efecto se ha observado en estudios realizados con las Fds halófilas de *Halobacterium halobium* (Kerscher *et al.*, 1976) y *Halobacterium marismortui* (Werber y Mevarech, 1978b). Así mismo,

para la Fd de *Haloarcula japonica* se ha propuesto que su masa molecular, estimada mediante SDS-PAGE, es 24 kDa, mientras que la masa estimada mediante espectrometría de masas es 15 kDa (Sugimori *et al.*, 2000).

En base al índice de pureza que presentaba la muestra ( $A_{420}/A_{280} = 0,2$ ) (Geiger *et al.*, 1978) y teniendo en cuenta la sobreestimación del peso molecular, podríamos interpretar que la Fd de *Haloferox mediterranei* es una proteína monomérica con una masa molecular en torno a 12 kDa (HPLC-masas).

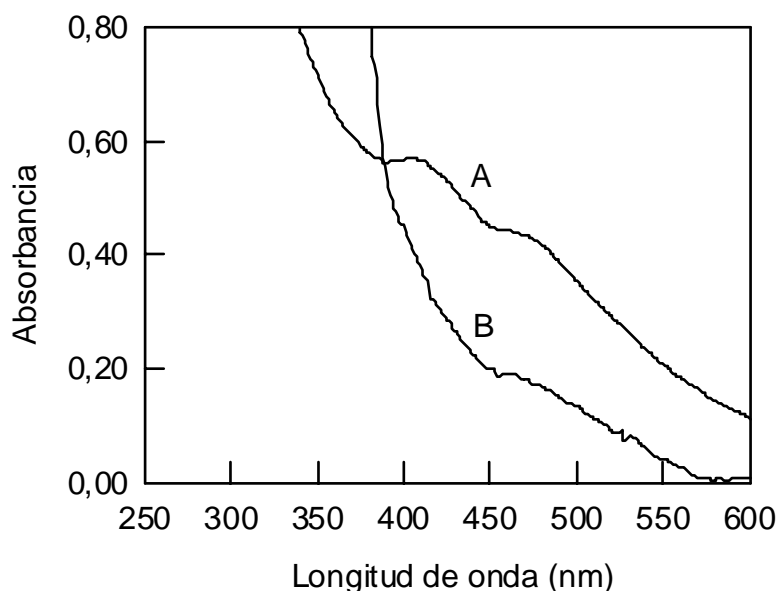


**Figura 6.1.** SDS-PAGE correspondiente a la muestra purificada de Fd. Calle 1: patrones; Calle 2: DEAE-celulosa (30  $\mu\text{g}$  proteína). La muestra tiene un índice de pureza de 0,2 y la concentración molar es 60  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon = 9600 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 420 nm; (Geiger *et al.*, 1978)).

La masa molecular estimada para la Fd de *Haloferox mediterranei* se encuentra dentro del rango de masas moleculares de las Fds estudiadas (12.500 y 24.000 Da).

## 6.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei*.

Hemos purificado la Fd de *Haloferax mediterranei* siguiendo el protocolo desarrollado por Kerscher para ferredoxinas de halobacterias, partiendo de células crecidas en medio mínimo (100 mM  $\text{NO}_3^-$ ). La muestra de Fd purificada presentaba un color marrón cuyo espectro de absorción se presenta en la figura 6.2.

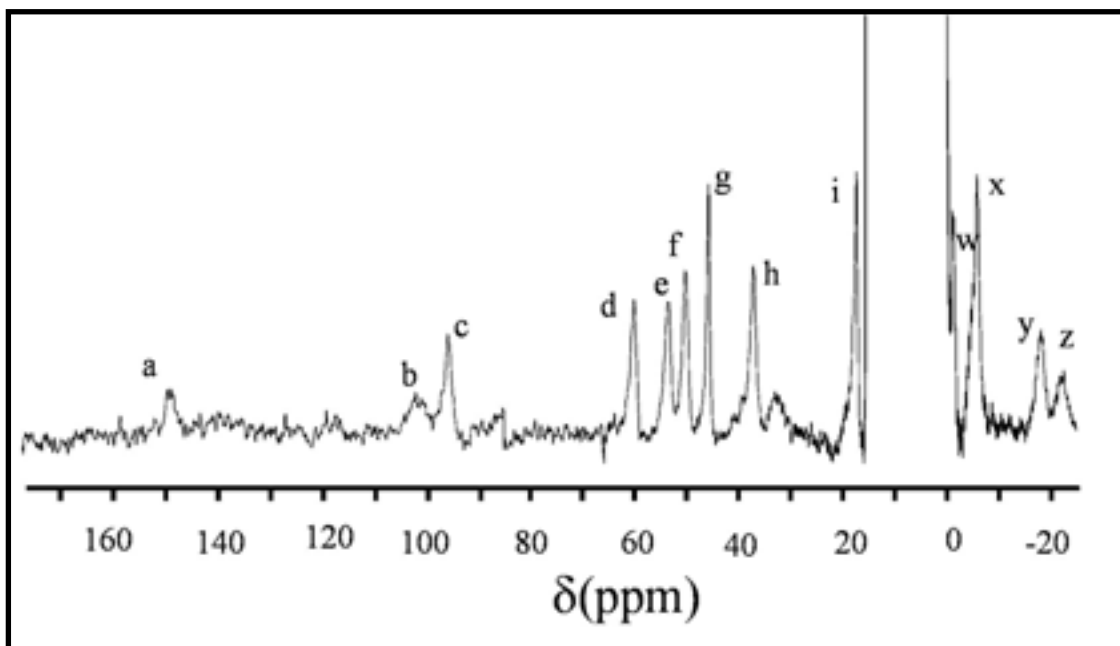


**Figura 6.2.** (A) espectro de la Fd purificada (60  $\mu\text{M}$ , asumiendo que el coeficiente de extinción molar a 420 nm es  $9600 \text{ M}^{-1}$ ) en 50 mM fosfato pH 7,5, 4,3 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la forma oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducirla muestra y obtener el espectro (B).

El pico de máxima absorción centrado en 420 nm es característico de los grupos Fe-S oxidados. El perfil del espectro mostrado es muy similar al obtenido para la Fd aislada de cianobacterias, plantas y haloarqueas (Sugimori *et al.*, 2000). También se aprecia un pico de elevada absorción centrado en 465 nm, que ha sido igualmente descrito en las Fds de *Haloarcula japonica* (Sugimori *et al.*, 2000) y *Halobacterium halobium* (Kerscher *et al.*, 1976). El máximo de absorción a 465 nm no aparece en el espectro de la Fd purificada a partir de la arquea hipertermófila *Pyrococcus woesei* (Blamey *et al.*, 2000). La ausencia del pico centrado en 465 nm en el espectro de la Fd de *Pyrococcus woesei* podría deberse al hecho de que esta Fd es de tipo 4Fe-4S en lugar de 2Fe-2S como ocurre con las Fds anteriormente mencionadas. Si se adiciona DT a la Fd de *Haloferax mediterranei*, la absorción a 420 nm disminuye un 44 %, y un 57 % a 465 nm.

### **6.3. ESPECTRO DE RMN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei*.**

En colaboración con el Dr. Antonio Donaire (Universidad de Valencia), se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear de la Fd purificada con un espectrómetro Bruker 400 MHz. Dicho espectro se recoge en la figura 6.3



**Figura 6.3.** Espectro super WEFT 1H RMN (400 MHz) a 298 K de la forma reducida de la ferredoxina  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) de *Haloferax mediterranei* en 20 mM fosfato pH 7,2 y 2 M KCl, en  $\text{D}_2\text{O}$ .

Se han identificado trece señales hiperfinas (denominadas **a-i** y **w-z**, como se aprecia en la figura 6.3). Estas señales corresponden típicamente a los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de las cisteínas coordinadas a los átomos de Fe o, para señales más desplazadas, a residuos que forman puentes de hidrógeno con los átomos de azufre (tanto azufre inorgánico como cisteínico). El espectro de 1H RMN presentado aquí, así como la variación de las señales con la temperatura (tabla 6.1), es similar al de otras Fds tipo planta, lo cual indicaría que esta Fd contiene un grupo  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  (Bertini *et al.*, 1993).

Señal	Comportamiento	Temperatura	
		24 °C	30 °C
a	Curie	148,5	147,9
b	Curie	101,5	100,3
c	Curie	95,7	94,9
d	anti-Curie	59,9	61,6
e	anti-Curie	53,4	54,9
f	anti-Curie	49,9	51,1
g	Curie	45,5	45,2
h	anti-Curie	36,7	37,9
i	Pseudo-Curie	15,1	15,1
w	anti-Curie	-1,65	-1,48
x	anti-Curie	-6,1	-5,9
y	anti-Curie	-18,5	-18,3
z	anti-Curie	-22,6	-21,9

**Tabla 6.1.** Variación de las señales del espectro de RMN de la figura 6.3 con la temperatura.

Las señales **a**, **b**, **c** y **g** muestran un comportamiento Curie, que corresponderían a las cisteínas coordinadas al ion Fe (III). La señal **g**, más estrecha que las otras tres, probablemente corresponda al protón  $\alpha$ ; mientras que las señales **a**, **b** y **c** (por analogía con otras Fds de  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ ) deben corresponder a tres de los cuatro protones  $\beta$  de las dos cisteínas coordinadas al ion Fe (III). Las señales **d**, **e** y **f** muestran un comportamiento anti-Curie, por lo que corresponderían a las cisteínas coordinadas al ion Fe (II). La señal **i** no muestra una dependencia clara con la temperatura (comportamiento pseudo-Curie), por lo que se asignaría al ion Fe (II), siendo probablemente un protón  $\alpha$ . Las señales **w** y **x**, de una magnitud baja en el desplazamiento hiperfino, posiblemente se debían a residuos enlazados por puentes de hidrógeno a los átomos de azufre inorgánico.

Sin embargo, el hecho más interesante de este espectro es la presencia de las señales no intercambiables **y** y **z**, desplazadas a campo alto. Estas señales corresponderían a los protones  $\beta$ . Sin embargo, en las otras dos Fds estudiadas hasta ahora por RMN (Bertini *et al.*, 1993) todos los protones  $\beta$  aparecen desplazados a campo bajo. Esto indicaría una fuerte constante de acoplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de hierro o una orientación totalmente diferente de una de las cisteínas (o una combinación de ambos factores) en esta Fd de *Haloferax mediterranei*, respecto a las otras Fds estudiadas.

#### 6.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD MV-DT-Fd-Nas y MV-DT-Fd-NiR.

Parte de la Fd obtenida se empleó en los ensayos de actividad Fd-Nas y Fd-NiR que se recogen en los apartados 5.2.2. (pág. 107) y 5.2.3 (pág. 124), para obtener la  $K_m$  para la Fd en cada caso. Estos estudios, además de mostrar la presencia de actividad en ensayos Fd-Nas ó Fd-NiR, dejan claro que el papel de la Fd en la reducción asimilativa del nitrógeno es "donar electrones durante el proceso catalítico".

De la misma forma se han realizado medidas de actividad en ensayos MV-DT-Fd-Nas y MV-DT-Fd-NiR, detectando que los valores de actividad son mayores a los esperados.

<b>Condiciones</b>	<b>% Actividad Nas</b>	<b>% Actividad NiR</b>
MV-DT	100	100
Fd-DT	94	100
MV-DT-Fd	275	280

**Tabla 6.2.** Medidas de actividad Nas y NiR asimilativas en presencia de Fd y MV.

La Fd de *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de recibir electrones muy eficientemente desde el MV reducido (Vega y Menacho, 1990). Partiendo de estos datos, es posible pensar que el incremento de actividad que observamos en presencia de MV y Fd sea debido a un fenómeno de este tipo. Así, el DT reduciría el MV y éste cedería los electrones a la Fd. La Fd reducida, cede a su vez los electrones a las enzimas y éstas al  $\text{NO}_3^-$  o al  $\text{NO}_2^-$ .

#### **6.5. FUNCIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei* EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO.**

La Fd es una proteína de pequeño peso molecular que tiene en su estructura grupos Fe-S. Participa en reacciones de transporte de electrones y tiene un papel muy importante en reacciones metabólicas de diversa naturaleza: foto-reducción del NADP (en plantas), reacciones de hidroxilación (bacterias aeróbicas y mitocondrias), fijación del nitrógeno (en bacterias y cianobacterias) y en la reducción del nitrito (bacterias y plantas) (Werber y Mevarech, 1978b).

Según el número de grupos Fe-S que se detectan en la estructura, se distinguen diferentes tipos de Fd: 2Fe-2S, 4Fe-4S y 8Fe-8S. En los años 70 se realizaron las primeras purificaciones y caracterizaciones de Fds empleando arqueas halófilas como fuentes de dicha proteína (Kerscher *et al.*, 1976; Werber y Mevarech, 1978). No obstante, los autores de estos estudios no propusieron ninguna función para la Fd obtenida a partir de células de *Halobacterium*.

En base a los resultados presentados en los anteriores apartados (6.1-6.4), proponemos que la ferredoxina de *Haloferax mediterraneies* el donador fisiológico de electrones en los procesos de reducción de nitrato y nitrito.



**CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE PURIFICACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax  
mediterranei*.**

↗ La ferredoxina aislada de *Haloferax mediterranei*, de tipo  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ , es el donador fisiológico de electrones en la reducción asimilativa del nitrógeno.