

# **Cristalización y difracción de rayos X para la resolución de estructuras de proteínas y complejos proteicos**

Estudio del papel de los residuos E413, R422 y R430 en el  
proceso de oligomerización de la enzima AIF mediante  
cristalografía de rayos X

**José Emilio Casaos Aznar**

Directora: Marta Martínez Júlvez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

<b>ÍNDICE</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Cristalografía de rayos X aplicada a la resolución estructural de proteínas</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. Cristalización de macromoléculas biológicas</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2. Resolución estructural</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Proteínas redox estudiadas</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1. hAIF. Factor de Inducción de Apoptosis humano</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2. Otras proteínas redox utilizadas en este trabajo</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Obtención de cristales</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Resolución estructural</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Herramientas informáticas para la representación y análisis de las estructuras cristalográficas</b>	<b>25</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Cristalización de proteínas</b>	<b>27</b>
<b>4.1.1. Factor de Inducción de Apoptosis</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2. Citocromo c<sub>6-2</sub></b>	<b>31</b>
<b>4.1.3. FAD Sintetasa</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Estudio estructural de la proteína mutada E413A/R422A/R430AhAIF<sub>Δ1-102</sub></b>	<b>34</b>
<b>4.2.1. Generación y refinado del modelo estructural</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2. Análisis estructural</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3. Estructura cuaternaria</b>	<b>43</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

El factor de inducción de apoptosis (*Apoptosis-Inducing Factor*, AIF) es una flavoproteína mitocondrial que media en el proceso de apoptosis independiente de caspasas. Este trabajo está basado en la AIF humana, una enzima que no sólo es importante en el proceso de la apoptosis, sino que es necesaria para el correcto funcionamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. La deficiencia en esta enzima se ha asociado a diversas patologías mitocondriales.

La reciente estructura cristalográfica del complejo hAIF reducida con el coenzima (hAIF<sub>rd</sub>-NAD<sup>+</sup>) muestra un dímero estabilizado por puentes salinos (E413, R422 y R430), y determina la presencia de un segundo sitio de unión del coenzima NAD<sup>+</sup>. Las mutaciones simultáneas en E413/R422/R430 previenen la dimerización de la proteína asociada al proceso redox así como la cromatinolisis nuclear, sugiriendo que la dimerización modula las propiedades redox y apoptóticas de hAIF. Además caracterizaciones cinéticas recientes de diversos mutantes en residuos del centro redox de la hAIF involucran al residuo W483, junto con P173, F310 y H454 en la formación del complejo competente, la eficiencia de transferencia de hidruro y la reactividad de hAIF frente al oxígeno.

Con el objetivo de profundizar en el papel del residuo W483 del centro redox y el proceso de oligomerización de la enzima hAIF, en este proyecto Máster se abordó la cristalización del mutante W483G hAIF<sub>Δ1-102</sub> y la resolución estructural de la especie mutada E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub> (los residuos mutados se encuentran en la superficie de interacción entre los monómeros). A partir de los datos de difracción de un cristal del mutante E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub> se resolvió la estructura de esta especie. La estructura obtenida se comparó con la de la proteína hAIF<sub>Δ1-102</sub> nativa, tanto oxidada como reducida, y se observó que aunque la proteína mutada se pliega de manera similar a la proteína nativa, los residuos 532-534 (que se encuentran en una zona que reduce la accesibilidad al anillo de flavina y al residuo W483) siguen una trayectoria distinta. Además, la especie mutada deberá sufrir cambios conformacionales similares a los de la nativa para adoptar la conformación de la hAIF en el dímero. De todas maneras, y debido a las mutaciones, este dímero no mostrará interacciones estabilizantes en la interfase entre los monómeros.

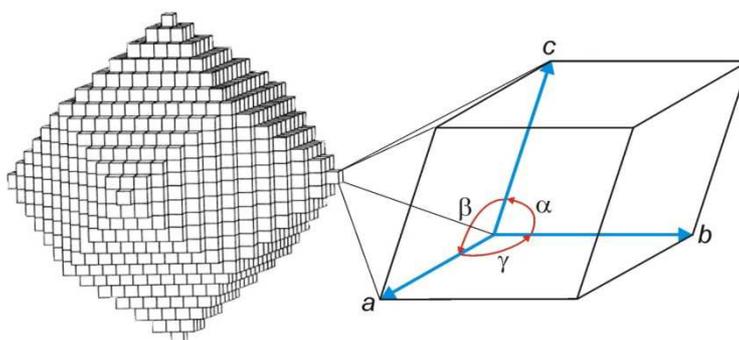
# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cristalografía de rayos X aplicada a la resolución estructural de proteínas

### 1.1.1. Cristalización de macromoléculas biológicas

#### *Concepto de cristal.*

Un cristal es una estructura sólida creada por agrupaciones ordenadas de átomos, iones o moléculas que se caracterizan por la repetición en las tres direcciones del espacio (x, y, z) de una unidad estructural mínima, llamada celdilla unidad (**Figura 1**). La celdilla unidad está formada a su vez por una unidad mínima, denominada unidad asimétrica. La aplicación de elementos de simetría a la unidad asimétrica genera la celdilla unidad, que se define mediante tres ejes (a, b y c) y tres ángulos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La traslación de la celdilla unidad en las tres dimensiones forma el cristal [1].



**Figura 1.** Representación esquemática de un cristal como repetición de la celdilla unidad.

#### *Cristales de macromoléculas. Características.*

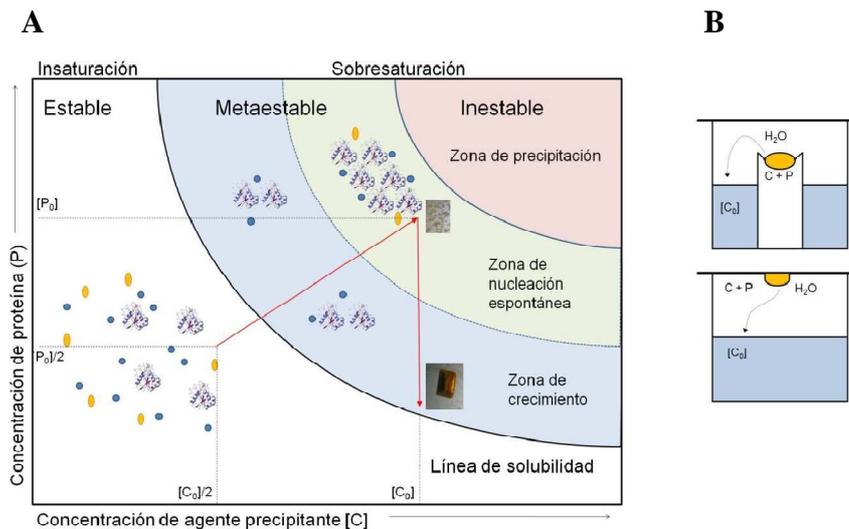
Los cristales de macromoléculas tienen características muy distintas a los cristales inorgánicos o de moléculas pequeñas, debido a su propia naturaleza. Los cristales inorgánicos poseen unas importantes fuerzas de interacción, lo que les proporciona una mayor dureza y resistencia, así como orden interno, pueden ser expuestos al aire y son fácilmente manipulables. Poseen además fuertes propiedades ópticas y difractan los rayos X de manera intensa. Por el contrario, los cristales de proteínas se componen de proteínas en estado nativo, que se encuentran solvatadas por la disolución, por lo que entre un 25% y un 90% del cristal está compuesto por solvente. Esta característica de los cristales de proteínas hace que las interacciones entre las macromoléculas sean débiles y que la posición de las proteínas varíe ligeramente entre las diferentes celdillas

unidad, causando patrones de difracción débiles y que los cristales sean blandos y frágiles, sensibles a la deshidratación y a la temperatura. Presentan por tanto propiedades ópticas débiles y escasa difracción, y acaban dañados tras la exposición prolongada a la radiación. A pesar de todo, la solvatación de los cristales de proteína también es responsable de la gran utilidad de la cristalografía de rayos X en macromoléculas, ya que permite que las macromoléculas, al estar rodeadas de capas de agua, mantengan una estructura similar a la esperada en solución. Como consecuencia, los mecanismos de unión de ligandos, las propiedades enzimáticas y espectroscópicas y otras características bioquímicas son las mismas en los cristales que las de la biomolécula en solución [2].

#### *Principios básicos de la cristalización de proteínas.*

Para poder cristalizar una proteína es necesario superar el límite de solubilidad de la misma, momento en el que se alcanza un estado de sobresaturación, termodinámicamente inestable, y las moléculas de la proteína, en exceso, se separan de la fase acuosa y pasan a la fase sólida, hasta llegar a un equilibrio entre las dos fases. La cristalización de una proteína consta de dos etapas: una inicial de nucleación, o formación de núcleos cristalinos termodinámicamente estables y una segunda etapa de crecimiento, en la que las moléculas de proteína van incorporándose a la superficie del cristal (**Figura 2A**). Para que se produzcan estas dos etapas se debe superar una barrera energética. Si se alcanza muy rápidamente el estado de sobresaturación, se producirá la precipitación de la proteína como agregados amorfos, no cristalinos. Sin embargo, si el proceso ocurre lentamente, se alcanza un estado metaestable, en el que se produce el ordenamiento de las moléculas en redes cristalinas [2].

Existen diferentes maneras de alcanzar el estado de sobresaturación, como adicionar un agente precipitante, retirar moléculas de agua de la disolución, modificar el pH o la temperatura. Los diferentes métodos de cristalización consisten en llevar a cabo algunas de estas estrategias [2,3].



**Figura 2. A.** Diagrama de cristalización de una proteína. Se representan la fase acuosa (estable) y la fase sobresaturada (coexiste fase sólida y proteína soluble), así como las zonas de nucleación y crecimiento de los cristales. Con la línea roja se muestra la evolución de un experimento de difusión de vapor en el que se mezclan volúmenes idénticos de proteína y agente precipitante a concentraciones  $[P_0]$  y  $[C_0]$ . La mezcla inicial presenta unas concentraciones  $[P_0]/2$  y  $[C_0]/2$ . Debido a la diferente concentración de agente precipitante en la gota y en el reservorio, el agua de la gota comenzará a evaporarse, aumentando gradualmente la concentración de proteína y de agente precipitante, hasta igualarse la concentración de agente precipitante en la gota y el reservorio. Si en la posición final se supera la línea de solubilidad y se alcanza la zona de nucleación espontánea, comenzarán a aparecer núcleos de proteína, la concentración de proteína se reducirá, y al llegar a la zona de crecimiento cristalino el cristal aumentará de tamaño. **B.** Representación esquemática de los experimentos de difusión de vapor en gota sentada (superior) y en gota colgante (inferior).

Actualmente, se utilizan varias técnicas de cristalización de proteínas: la difusión de vapor, la diálisis, la contradifusión a través de interfase o el llamado microbatch.

La técnica de difusión de vapor es la más utilizada, en sus variantes de gota colgante y gota sentada (**Figura 2.B**). Se coloca una gota que contiene solución de proteína y de agente precipitante en un recipiente sellado y se equilibra frente a un reservorio que contiene únicamente la solución de agente precipitante. Como la concentración de agente precipitante en la gota es menor, se producirá difusión de vapor desde la gota al reservorio hasta que se equilibran las concentraciones. Si durante el equilibrado se alcanza el estado metaestable de sobresaturación y aparecen núcleos cristalinos, el sistema evolucionará hacia la formación de cristales. Si se alcanza un estado de sobresaturación muy alto, sobrepasando el límite de solubilidad, no se produce la formación de cristales, y sólo al proporcionar núcleos preformados se observará el crecimiento de cristales. Esta técnica se denomina siembra de cristales [2].

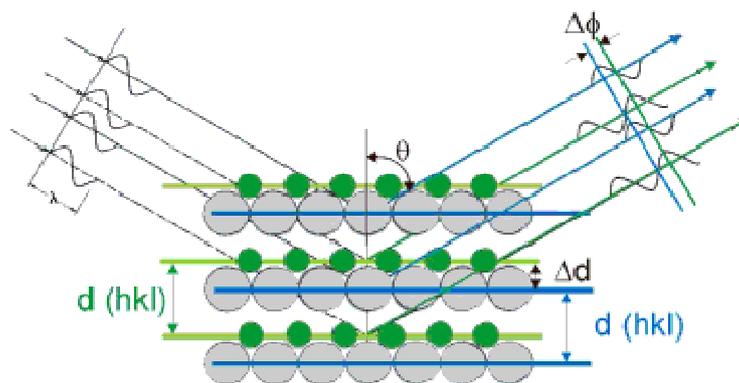
Si se quiere obtener un cristal de un complejo proteína:ligando se pueden utilizar dos estrategias. Una de ellas consiste en la inmersión o "soaking" de los cristales de proteína preformados en una disolución del ligando a alta concentración. Como los cristales de proteína presentan grandes poros de solvente, el ligando puede difundir hasta el sitio de unión con la proteína. La cocrystalización es la otra estrategia utilizada. En ella se añade el ligando en la gota al comienzo de la cristalización, o bien se incuba previamente con la proteína. Por norma general, ambas estrategias son igualmente válidas, aunque la inmersión conlleva el riesgo de poder dañar el cristal al manipularlo [2].

### 1.1.2. Resolución estructural

#### *Fenómeno de difracción.*

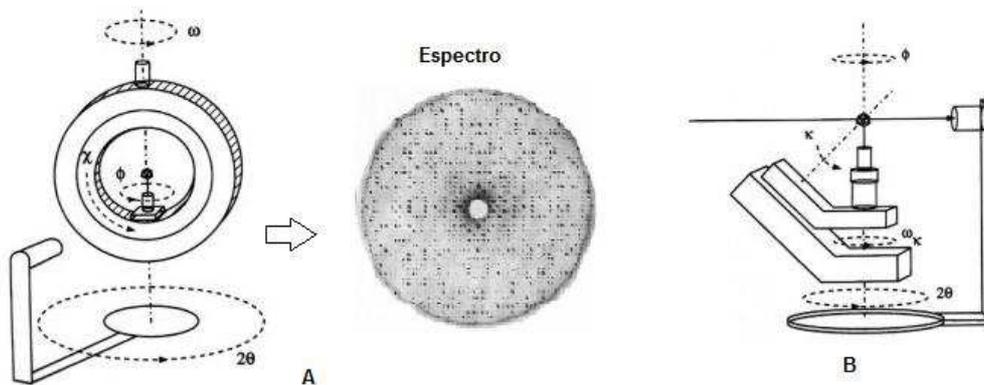
La difracción de rayos X es el fenómeno físico que se produce cuando un haz de rayos X interacciona con los electrones de un cristal, produciendo una vibración de éstos acoplada a la variación del campo eléctrico. Los electrones pasan a emitir radiación en todas las direcciones del espacio, lo que se denomina dispersión. Debido a la naturaleza periódica del cristal, en determinadas direcciones se producen interferencias constructivas de los haces dispersados, lo que da lugar al fenómeno de difracción, cuyos máximos siguen la ley de Bragg (**Figura 3** y **Ecuación 1**).

$$2 d \sin \theta = n \lambda \quad \text{Ecuación 1. Ley de Bragg}$$



**Figura 3.** En una interpretación sencilla de la Ley de Bragg, las familias de planos cristalográficos paralelos de un cristal se comportarían como "espejos" que "reflejan" los rayos X para algunos ángulos de incidencia determinados. Los ángulos ( $\theta$ ) para los que aparecen rayos X difractados dependen de la distancia que separa los planos cristalográficos ( $d$ ) y de la longitud de onda de los rayos X utilizados ( $\lambda$ ).

En los experimentos de difracción, se hace incidir un haz monocromático de rayos X (de una longitud de onda del orden de  $1 \text{ \AA}$ ) sobre un cristal. El haz de rayos X es dispersado por el cristal, y la luz dispersada es recogida por un detector. El patrón que origina esa luz dispersada se denomina patrón de difracción. El patrón de difracción obtenido depende estrechamente de la estructura del objeto, el cristal. Sin embargo, en un cristal tridimensional no podemos observar todas las reflexiones a la vez. En el modelo de Bragg, un cristal contiene familias de planos paralelos separados por la misma distancia en distintas direcciones (**Figura 3**), por lo tanto, para poder obtener el patrón completo de difracción el procedimiento experimental implica la toma de imágenes sucesivas en un detector situado perpendicularmente al haz de rayos X. Para medir en distintas posiciones angulares del cristal, es necesario girar el cristal durante el experimento de difracción de tal modo que todos los planos virtuales se coloquen en la posición adecuada para cumplir la ley de Bragg. Esto se consigue mediante oscilaciones simples del cristal (geometría Phi) o por una combinación de giros más complejos (geometría Kappa) (**Figura 4**).

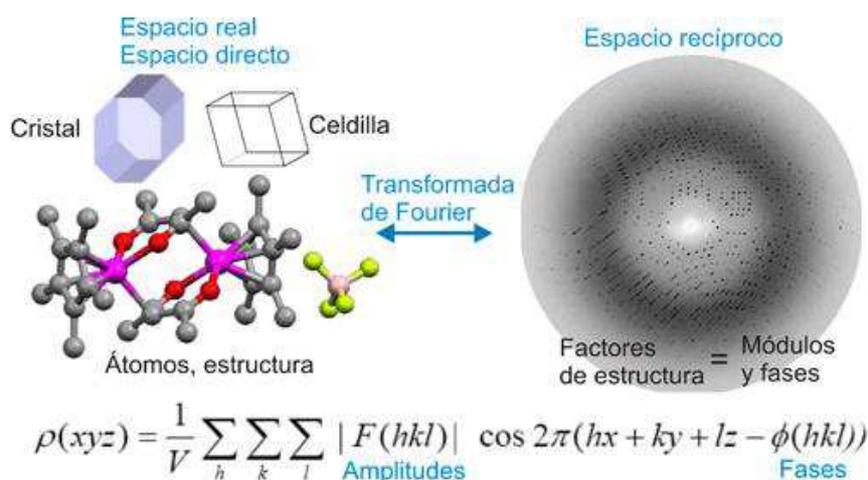


**Figura 4. A.** Esquema de un difractómetro con geometría Phi, y representación de un espectro de difracción. **B.** Esquema de un difractómetro con geometría Kappa.

Los cristales de proteínas, debido a las características especiales que presentan, sufren un gran deterioro al ser expuestos a la radiación. La longitud de onda penetrante y la intensidad del haz, unidas a los largos tiempos de exposición, provocan fenómenos de absorción que hacen que la muestra se caliente, generando radicales libres en las moléculas de proteína y solvente, que con el tiempo, dan lugar a daños irreparables en el cristal que provocan la pérdida del orden interno. Para minimizar este tipo de daños es conveniente enfriar el cristal durante el proceso de difracción, mediante un flujo laminar de nitrógeno frío [4]. Para poder realizar cristalografía sobre proteínas es necesario

sumergir previamente el cristal en una disolución crioprotectora (glicerol, sacarosa, etilenglicol, etc.) para que las moléculas de agua no estructurales sean reemplazadas por las crioprotectoras impidiendo la formación de hielo que produciría la ruptura del cristal.

Como ya se ha mencionado, el espectro de difracción de rayos X consiste en un patrón de intensidades. La información estructural está concentrada en dicho patrón de difracción (**Figura 5**) y en forma de los denominados *factores de estructura*, asociados a cada intensidad, cuya fase no se puede medir durante el experimento de difracción. Haciendo uso de la teoría de interferencias de ondas es fácil demostrar que la geometría del espectro da cuenta de la celdilla unidad y la simetría de las intensidades informa de la simetría cristalina. Gracias a ello se puede establecer una relación directa entre el experimento y la estructura del cristal mediante la transformada de Fourier (**Figura 5**) [3].



**Figura 5.** Función de densidad electrónica. V es el volumen de la celdilla unidad y  $\phi(hkl)$  es la fase asociada al módulo factor de estructura,  $|F(hkl)|$

La ecuación que aparece en la **Figura 5** relaciona la densidad electrónica,  $\rho(x,y,z)$  (espacio real), en cada punto  $(x,y,z)$  del cristal, es decir, la estructura, con el experimento de difracción (espacio recíproco), donde  $|F(hkl)|$  es la raíz cuadrada de la intensidad de cada punto  $(hkl)$  del espectro de difracción. Para poder resolver la ecuación es necesario no solo disponer de los módulos,  $|F(hkl)|$ , sino también de las fases,  $\phi(hkl)$ , asociadas a los factores de estructura, pero cuya información se pierde durante el experimento. Esto constituye el denominado "problema de la fase" y el trabajo del cristalógrafo consiste en averiguar el valor de  $\phi(hkl)$ .

El problema de la fase para cristales formados por moléculas de tamaño pequeño y medio ha sido resuelto mediante los llamados *métodos directos* y *métodos Patterson*. Los primeros son métodos estadísticos y los segundos métodos vectoriales basados en relaciones interatómicas, en el que se omiten las fases [2].

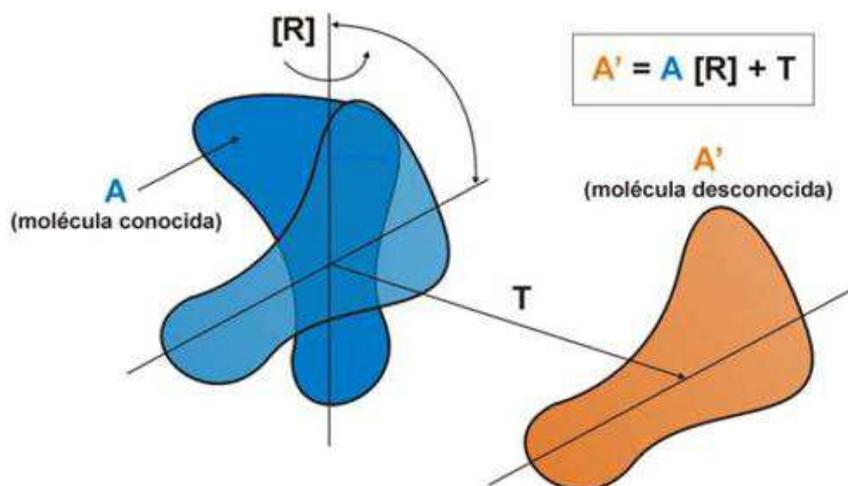
En los cristales de macromoléculas existen tres métodos (**Tabla 1**). Con cualquiera de los tres se puede calcular unas fases iniciales, que junto con las amplitudes experimentales permiten calcular una función de densidad electrónica aproximada para construir el modelo estructural [2].

**Tabla 1.** Métodos de faseado.

<b>Método</b>	<b>Conocimiento previo</b>
Reemplazo Molecular	Modelo homólogo
Reemplazo Isomorfo Múltiple	Subestructura de átomos pesados
Dispersión Anómala Múltiple	Subestructura de átomos dispersores anómalos

*Método de Reemplazo Molecular.*

Este método requiere de la existencia de la estructura de una proteína homóloga, que se utiliza como punto de partida para calcular las fases iniciales. El modelo debe tener una identidad secuencial con la proteína de estudio de, al menos, un 25%, y una desviación cuadrática media (r.m.s.d.) entre las posiciones de los C $\alpha$  del modelo de la nueva estructura final menor de 2 Å. La metodología consiste en rotar (R) y trasladar (T) el modelo de la estructura conocida dentro de la celdilla unidad del cristal de la proteína de estudio (**Figura 6**). Matemáticamente se busca que la diferencia entre el patrón de difracción del cristal de la proteína desconocida y el patrón de difracción teórico del homólogo sea mínima. Cuando se encuentra la mejor orientación para el modelo, se calculan las fases utilizando las coordenadas del modelo y las amplitudes medidas experimentalmente de la proteína de estudio, para obtener una función de densidad electrónica aproximada de la misma [1,3].



**Figura 6.** Esquema del proceso de reemplazo molecular.

### *Trazado de la cadena polipeptídica y refinado.*

Una vez que se dispone de un mapa de densidad electrónica, el siguiente paso es trazar la cadena polipeptídica de forma que los átomos de la cadena justifiquen la densidad electrónica calculada. Este proceso se puede automatizar si se dispone de datos de alta resolución (mejor de 2.5 Å). Si el mapa no es de suficiente calidad, el trazado se realiza de forma manual. El proceso de refinado se evalúa mediante el factor R, que mide las diferencias entre las amplitudes observadas  $|F_o|$  y las calculadas  $|F_c|$  (**Ecuación 2**).

$$R = \frac{\sum |F_o| |F_c|}{\sum |F_o|} \quad \text{Ecuación 2. Factor R}$$

Para poder mejorar el modelo (minimizar R hasta un 20-25%) se calculan los mapas de densidad electrónica diferencial,  $2F_o - F_c$  y  $F_o - F_c$ , utilizando la diferencia de amplitudes observadas y calculadas y las fases calculadas [3].

### *Validación.*

La última etapa de refinado es la validación de la estructura obtenida, que consiste en la valoración de la estereoquímica, es decir, comprobar que las distancias y los ángulos de enlace (tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales), las conformaciones de los rotámeros y ángulos de torsión de la cadena principal ( $\phi$ ,  $\psi$ ) sean correctos. La representación de los residuos de los aminoácidos en el diagrama de Ramachandran (que define las parejas de ángulos  $\phi$  y  $\psi$  permitidos) permite identificar residuos que se

encuentran en zonas no permitidas. Para que un modelo se considere válido, no debe haber más de un 2% de residuos fuera de las zonas permitidas [5].

## **1.2. Proteínas redox estudiadas**

En este trabajo se ha aplicado la técnica de la cristalografía de rayos X para avanzar en el estudio estructura función de algunas proteínas redox.

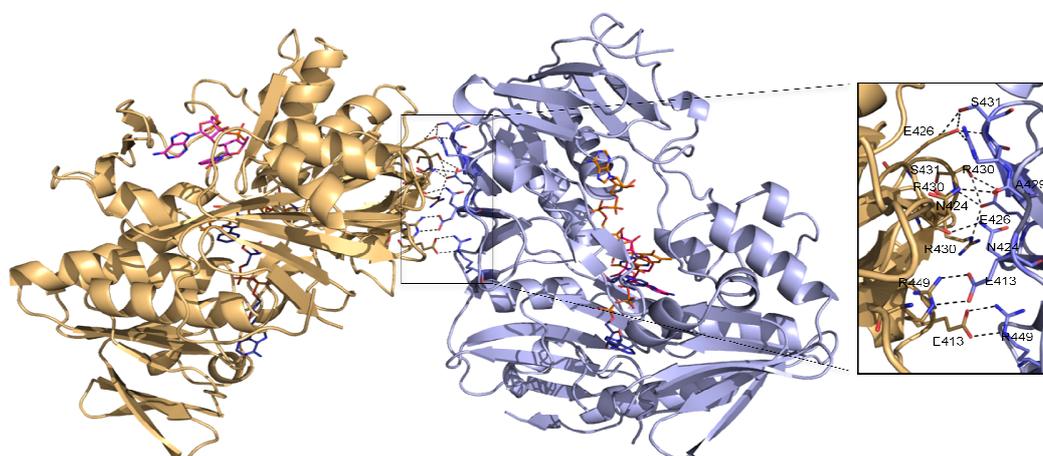
### **1.2.1. hAIF. Factor de Inducción de Apoptosis humano.**

El Factor de Inducción de Apoptosis (AIF, *Apoptosis-Inducing Factor*) es una flavoproteína que media en el proceso de apoptosis independiente de caspasas. El gen de esta proteína se sitúa en la región A6 y Xq25-26 del cromosoma X en ratones y en humanos, respectivamente [6]. La proteína AIF humana (hAIF) se expresa como un precursor de 613 residuos y 67 kDa, que contiene una secuencia N-terminal de localización mitocondrial, una región transmembrana, dos secuencias de localización nuclear, los dominios de unión a FAD y NAD<sup>+</sup>(H) y un dominio C-terminal [7]. Tras importarse a la mitocondria, la ruptura del extremo N-terminal (54 residuos) produce la forma madura de la proteína, hAIF<sub>Δ1-54</sub>. Esta forma se inserta en la membrana interna mitocondrial, incorpora el cofactor FAD y se pliega en tres dominios estructurales. Los dominios de unión a FAD y NADH muestran la topología clásica de Rossmann que se observa en muchas otras flavoproteínas y le confiere a la AIF una actividad reductasa dependiente de NAD(P)H, mientras que el dominio C-terminal se considera la región proapoptótica. Tras una señal proapoptótica, hAIF<sub>Δ1-54</sub> se corta por el residuo 102, dando lugar a su forma soluble y pro-apoptogénica hAIF<sub>Δ1-102</sub> [8]. Esta proteína es translocada primero al citoplasma y luego al núcleo, donde induce la apoptosis por condensación de la cromatina y fragmentación del DNA a gran escala [9].

Además de la función apoptótica, la AIF mitocondrial parece tener un papel vital pero todavía por descubrir en el metabolismo redox de las células sanas. La deficiencia de AIF se ha asociado a defectos en los complejos mitocondriales I y III, por lo que se piensa que la actividad redox de la proteína puede regular la fosforilación oxidativa bien contribuyendo a la formación de estos complejos, o bien proveyéndoles de poder reductor [10]. Más recientemente, se han asociado enfermedades mitocondriales humanas relacionadas con mutaciones en la proteína hAIF, como la delección de R201,

el reemplazamiento de G308 por Glu y la mutación E493V (el síndrome de Cowchock, o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 4, ligada al cromosoma X) [11].

Por tanto, la proteína AIF tiene un comportamiento dual, por un lado pro-vida (actuando en la mitocondria) y por otro lado pro-apoptosis (actuando en el núcleo). El estudio de las propiedades redox de la AIF mostró que en su reducción *in vitro* por NADH se forma un complejo de transferencia de cargas (CTC), que induce la dimerización de la proteína y reordenamientos conformacionales de los dominios reductasa y apoptogénico. El estado de oligomerización de la AIF dentro de la célula puede por tanto estar directamente implicado en su función [12]. La resolución estructural mediante cristalografía de rayos X de la proteína AIF reducida ha mostrado que el complejo une dos moléculas de NAD<sup>+</sup> (**Figura 7**) [12].



**Figura 7.** Dímero formado por el complejo AIF <sub>$\Delta$ 1-102 red</sub>:2NAD<sup>+</sup>. Se ha ampliado la zona de la interfase en la que se han etiquetado los residuos que participan y las interacciones que se forman entre ellos.

En los últimos años ha aumentado el interés en diseñar terapias para modular la apoptosis independiente de caspasas, lo que ha provocado que esta proteína se convierta en una diana principal para poder tratar diferentes enfermedades (desde cáncer hasta trastornos autoinmunes) [13]. Por lo tanto es importante caracterizar la dimerización del complejo AIF <sub>$\Delta$ 1-102 red</sub>:2NAD<sup>+</sup>. Los cambios conformacionales inducidos tras la formación del dímero AIF<sub>rd</sub>:2NAD<sup>+</sup> podrían regular la unión de AIF con otras proteínas y/o moduladores de su actividad biológica.

El dímero formado por la proteína AIF <sub>$\Delta$ 1-102 red</sub>:2NAD<sup>+</sup> se estabiliza por las siguientes interacciones: el grupo carboxílico del residuo E426 de un protómero interacciona con los átomos OG y N del residuo S431 del otro protómero. Los residuos N424 y A429 de

cada protómero forman un enlace de hidrógeno entre los átomos ND2 y O, respectivamente. Se producen dos puentes salinos, uno entre los átomos OE1 y OE2 (oxígenos del grupo carboxílico) del residuo E413 y el NE y NH2 del residuo R449, y el otro puente entre el NE del residuo R430 y el OE2 del E426 (**Figura 7**). También contribuye a la estabilización del dímero el apilamiento de los grupos guanidinio de las dos Arg422 de cada protómero [12].

Observando estas interacciones, se decidió introducir tres mutaciones de sustitución de aminoácido en la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$ : E413A, R422A y R430A. Estudios previos indican que la proteína mutante E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  es una especie monomérica incluso en presencia de NADH. Su actividad reductasa es similar a la de la enzima nativa aunque el CTC que forma es menos estable. Los estudios *in vivo* mostraron que aunque la proteína E413A/R422A/R430A hAIF se localizaba en la mitocondria y se transloca al núcleo tras una señal apoptótica, pero no es capaz de producir apoptosis. El hecho de que dicha especie mutante no dimerice en presencia de NADH confirma el papel de los residuos de arginina 422 y 430, así como el de glutamato 413, en la estabilización del dímero [12].

Por otra parte se han realizado estudios de mutagénesis dirigida de otros aminoácidos de la hAIF, P173, F310, H454 y W483, que indican que modulan la formación del complejo competente, la eficiencia de transferencia de hidruro y la reactividad de hAIF $_{rd}$  frente al oxígeno [12].

En este Trabajo Fin de Máster se ha resuelto la estructura tridimensional de la especie E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  y se ha trabajado en la generación de cristales de la especie W483G hAIF $_{\Delta 1-102}$ . Debido a lo indicado anteriormente, la resolución de sus estructuras resultará clave para entender el papel de los citados residuos en la dimerización de la hAIF (E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$ ) o la formación del complejo y transferencia del hidruro (W483G).

Por otra parte se ha descrito que la interacción AIF:DNA queda inhibida *in vitro* por el ácido aurintricarboxílico (ATA) [14], y que el proceso de translocación de la AIF al citosol está inhibido por el compuesto Trolox, un antioxidante derivado de la vitamina E [15, 16]. En este Trabajo Fin de Máster se ha abordado también la cocrystalización de la hAIF $_{\Delta 1-102}$  con cada uno de estos compuestos con el fin de describir estructuralmente esta unión. El conocimiento de las interacciones que la hAIF establece con otras

moléculas es fundamental para poder controlar su actividad, ya que como se ha dicho antes, esta enzima es una potente diana terapéutica [13].

### **1.2.2 Otras proteínas redox utilizadas en este trabajo**

#### *Citocromo c<sub>6-3</sub>*

El citocromo c<sub>6</sub> es una proteína soluble que transporta electrones entre el complejo citocromo b<sub>6</sub>f y el fotosistema I (PSI) en la fotosíntesis oxigénica. Está presente en todas las cianobacterias y en algunas algas verdes [17]. En cianobacterias se piensa que está implicado en fotosíntesis [18], respiración [19] y fotosíntesis anoxygenica [20], aunque no se conoce de qué manera se relacionan estos procesos con algunas isoformas [21]. En este Trabajo Fin de Máster se dispone de la isoforma del citocromo c<sub>6</sub> de la cianobacteria *Nostoc sp. PCC 7119* denominada citocromo c<sub>6-3</sub>. La resolución estructural de esta proteína mediante cristalografía de rayos X podría ser de gran ayuda para ofrecer pistas sobre su función.

#### *FAD Sintetasa (FADS)*

La enzima FAD Sintetasa (FADS) de procariontes es una enzima bifuncional que cataliza la conversión de riboflavina a FMN y FAD, cofactores de las flavoproteínas [22]. Al principio de este trabajo se disponía de los mutantes R195A/R199A, T208D y S164D de la enzima FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* diseñados para estudiar la estructura cuaternaria de la proteína, que forma un hexámero formado por dos trímeros [23], y cuya cristalización y resolución estructural son de interés para conocer mejor el funcionamiento de esta proteína.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es formarse en la técnica de cristalografía de rayos X aplicada a estudios estructurales de proteínas redox, en concreto el Factor de Inducción de Apoptosis, el citocromo  $c_{6-3}$  y la FAD Sintetasa.

Para alcanzar estos objetivos generales, se han diseñado las siguientes tareas a desarrollar en este Trabajo Fin de Máster:

- Resolver la estructura de la especie mutante E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  que muestra un comportamiento cuando se reduce y estabiliza su CTC diferente al de la hAIF nativa.
- Cristalizar y resolver la estructura de la especie mutante W483G hAIF que muestra un comportamiento diferente al de la nativa en la formación del complejo competente, la eficiencia de transferencia de hidruro y la reactividad de hAIF $_{rd}$  frente al oxígeno.
- Cristalizar y resolver la estructura de una isoforma del citocromo  $c_{6-3}$ , de la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC 7119 cuya función se desconoce.
- Cristalizar y resolver la estructura de algunas especies mutantes de la enzima FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* que se diseñaron para estudiar la estructura cuaternaria de la proteína.

Durante la realización de este Trabajo Fin de Máster se han adquirido las siguientes competencias:

- Conocimiento teórico y manejo de los programas informáticos necesarios para la resolución estructural y representación de proteínas (Refmac5, Coot, Pymol, etc.).
- Estudiar los cambios estructurales que producen las mutaciones en la estructura de las proteínas, y cómo esos cambios pueden afectar a su función.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de cristales

Para la obtención de cristales se ha utilizado el método de difusión de vapor en las dos modalidades de gota sentada y de gota colgante.

Los experimentos en gota colgante se realizaron en placas Linbro de 24 pocillos. Las gotas contenían 1 ó 2  $\mu\text{L}$  de disolución de proteína y 1  $\mu\text{L}$  de líquido madre, y se equilibraron frente a 500  $\mu\text{L}$  de líquido madre.

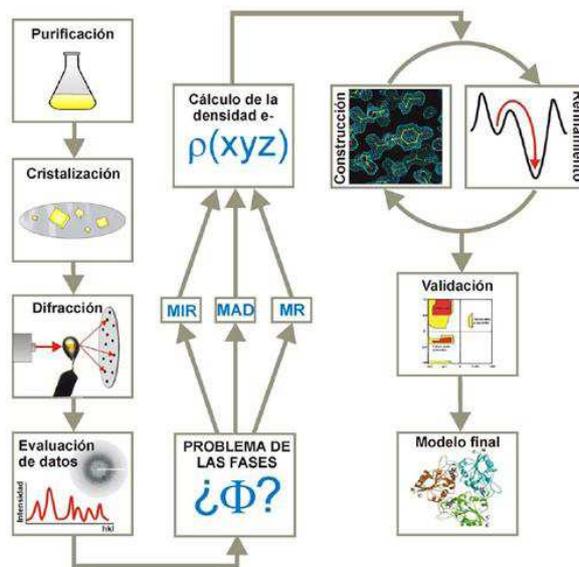
En gota sentada se utilizaron placas "MRC 2-well" de 96 pocillos (*SWISSCI*). Las gotas contenían 0,3  $\mu\text{L}$  de disolución de proteína y 0,3  $\mu\text{L}$  de líquido madre y fueron equilibradas frente a 60  $\mu\text{L}$  de líquido madre.

Para encontrar las condiciones iniciales de cristalización se utilizaron 60  $\mu\text{L}$  de las condiciones contenidas en los siguientes kits comerciales: JBScreen Basic HTS, JBScreenClassic HTS I, PEGSalt (*Jena Bioscience*), JCSG+, StructureScreen I+II, ProPlex y Midas (*Molecular Dimensions*). Para poner las gotas se utilizó un robot Nanodrop II (*Innovadyne Technologies, Inc. (USA)*), propiedad del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI). Las placas se almacenaron en el Rock Imager (*Formulatrix*), propiedad del BIFI, un sistema automatizado de incubación de placas y toma periódica de imágenes de las gotas.

Los cristales obtenidos se difractaron en el sincrotrón ALBA (Universidad Autónoma de Barcelona) en la línea 13 (XALOC) y en el sincrotrón Diamond (Harwell Science and Innovation Campus, UK).

#### 3.2. Resolución estructural

Tras la obtención de cristales de proteína, éstos se someten a un experimento de difracción de rayos X. La recogida de datos de difracción de rayos X es la última etapa física antes del procesamiento de los mismos *in silico* que concluirá con la resolución de la estructura (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema de las etapas que constituyen la resolución estructural de una proteína mediante cristalografía de rayos X.

La recogida se inicia con la toma de una imagen o varias imágenes separadas un cierto ángulo (típicamente  $90^\circ$ ), utilizando  $1^\circ$  de rotación ( $\Delta\phi = 1^\circ$ ). La inspección de estas imágenes permite estimar la resolución a la que difracta el cristal, la anisotropía, presencia de maclas o de varios cristales, anillos de hielo, separación y forma de las reflexiones, la determinación inicial de la celdilla y grupo espacial, etc. Este proceso inicial permite identificar la estrategia de recogida de datos más adecuada, incluyendo los tiempos de exposición, el rango de  $\phi$ , la rotación por imagen, la distancia hasta el detector, etc. La optimización de la estrategia de recogida es indispensable para obtener un conjunto completo de datos de difracción, y, en algunos casos (como los experimentos de dispersión anómala) fundamental para la resolución de la estructura. Este primer procesamiento de los datos de difracción se llevó a cabo mediante el programa X-Ray Detector Software (XDS).

El procesamiento de los datos de difracción consta de las siguientes etapas:

**Indexación:** En esta etapa se utilizan varias imágenes para determinar los parámetros del cristal, la celdilla unidad, el grupo de Laue, la orientación del cristal y la mosaicidad. En ocasiones esta etapa no permite la identificación inequívoca del grupo espacial, por lo que se selecciona un grupo de menor simetría. La determinación de la red o el grupo de Laue es indispensable para conseguir un conjunto completo de datos

durante la etapa de recogida de datos de difracción, por lo que esta etapa suele realizarse al principio del experimento de difracción.

**Integración:** En esta etapa se determinan las intensidades de las reflexiones así como su error estándar relativo. Como resultado se obtiene un conjunto de datos con todas las reflexiones ( $h, k, l$ ), su intensidad y su error.

**Escalado:** Durante la recogida de datos de difracción se puede producir un decaimiento del cristal, fluctuaciones en la intensidad de la fuente, de la temperatura, etc. En la etapa de escalado se normalizan las intensidades teniendo en cuenta los factores anteriores, y se reducen los datos a la unidad asimétrica. De esta manera el conjunto de datos resultante (denominado *merged*) ya no contendrá reflexiones simétricas y habrá promediado las reflexiones medidas varias veces así como las relacionadas por simetría. En esta etapa se obtienen una serie de parámetros estadísticos que permiten evaluar la calidad de los datos de difracción en función de la resolución:

- Multiplicidad o redundancia: Representa el número de veces que se ha medido cada reflexión. Cuanto mayor sea su valor mejor será la estimación de los errores asociados a cada medida. Los valores altos de redundancia son indispensables cuando se intenta fasear con dispersión anómala, ya que la intensidad de la señal anómala es muy pequeña.
- Completitud: Indica el porcentaje del espacio recíproco que se ha recogido. Es indispensable que la completitud global de los datos supere el 90%, siendo deseable que en la última capa de resolución sea superior al 80%. Cuando la pérdida de reflexiones se debe a errores no sistemáticos aparecen mapas ruidosos, mientras que si las reflexiones no medidas se deben a errores sistemáticos (como por ejemplo, la pérdida de las reflexiones muy intensas por sobresaturación del detector, la pérdida de reflexiones por no cubrir la totalidad del espacio recíproco o la ausencia de datos a baja resolución) se pueden producir problemas graves que impiden la resolución de la estructura.
- Factor  $R_{sym}$ : Este parámetro evalúa la diferencia entre la intensidad de una reflexión medida  $N$  veces y su promedio (o entre las intensidades de reflexiones simétricas) según la **Ecuación 3**,

$$R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}}$$

**Ecuación 3:** Factor  $R_{sym}$

donde  $I(h)$  es la intensidad de cada reflexión “**h**”, medidas  $N$  veces, y siendo  $\bar{I}(h)$  la intensidad promedio de cada reflexión. Este valor se calcula para cada concha de resolución, observándose un incremento a altas resoluciones. En general se aceptan valores globales de  $R_{sym}$  inferiores al 10 %.

-  $I/\sigma(I)$ : Representa la relación de la intensidad con respecto al ruido. Son aceptables valores por encima de 2.

**Cálculo del módulo de factor de estructura:** Una vez se ha determinado la intensidad de las reflexiones se calculan los módulos de los factores de estructura, cuyo cuadrado es proporcional a la intensidad.

Con los módulos medidos y las fases calculadas de los factores de estructura se obtiene una densidad electrónica interpretable.

**Generación y refinado del modelo estructural**

Se inicia entonces la construcción del modelo de estructura de la proteína. La primera etapa consiste en el trazado de la cadena polipeptídica dentro de la densidad.

A partir del modelo inicial se realizan ciclos de refinado matemático y de refinado manual. El refinado matemático implica el ajuste de las coordenadas (x,y,z) de cada átomo así como el factor térmico isotrópico  $B$ , que se relaciona con su estado de vibración térmica. Durante el refinado de estructuras proteicas se imponen además restricciones estereoquímicas, las cuales permiten mantener distancias y ángulos de enlace correctos, así como la planaridad de enlaces peptídicos y cadenas laterales. Estas restricciones son esenciales en el caso de estructuras a baja resolución, donde el número de parámetros que han de refinarse no es mucho menor que las observaciones experimentales. En el caso de existir varias copias de la misma molécula en la unidad

asimétrica, la introducción de restricciones debidas a simetrías no cristalográficas también conduce a una mejora en el proceso de refinado, sobre todo en estructuras a baja resolución. El proceso de refinado se evalúa mediante el factor  $R$ , el cual mide la diferencia entre las amplitudes observadas  $|Fo|$  y calculadas  $|Fc|$  (**Ecuación 2**).

Para asegurar que los cambios que se realizan durante cada etapa son representativos del modelo real, se utiliza la validación cruzada, mediante el uso del  $R_{free}$ . Para calcularlo se excluyen entre un 5 % y un 10 % de las reflexiones durante el refinado, calculando para este set de reflexiones (*test set*) el factor  $R_{free}$ . El factor  $R$  calculado con el 90-95 % restante se denomina  $R_{work}$  e incluye las reflexiones utilizadas en el refinado. Si este factor  $R_{free}$  disminuye en una etapa de refinado, será síntoma de que la etapa ha conducido a una mejora de las fases.

El refinado matemático se suele iniciar mediante un refinado de cuerpo rígido, en el que la proteína es tratada como un todo y se modifica su posición y giro, así como un refinado de tipo *simulated annealing*, en el que se simula un calentamiento y posterior enfriamiento de la proteína. Posteriormente se realizan refinados tipo “máxima verosimilitud” (del inglés, *maximum likelihood*). Además se añaden moléculas de agua al modelo, así como ligandos e iones. Los ciclos de refinado matemático se alternan con ciclos de refinado manual, en los cuales se ajustan cadenas laterales, se modelan regiones peor definidas o se ajustan las conformaciones de los ligandos. Para ello se calculan los denominados mapas de densidad electrónica diferencia,  $2Fo-Fc$  y  $Fo-Fc$  utilizando la diferencia entre las amplitudes observadas y calculadas y las fases calculadas. Por último, puede utilizarse el denominado refinado TLS de los factores B (del inglés *Translation-Libration-Screw*). En este tipo de refinado las cadenas de proteína se dividen en fragmentos (grupos TLS) que se comportarán como cuerpos rígidos en cuanto a su vibración, y se refinan anisotrópicamente. Este refinado conduce a una mejora con respecto al refinado B isotrópico, y a diferencia del refinado anisotrópico, puede usarse a bajas resoluciones, ya que no supone la introducción adicional de demasiados parámetros que refinar.

El proceso de refinado concluye cuando el modelo estructural se ajusta a la densidad electrónica, no aparece densidad electrónica no explicada en los mapas diferencia, los valores de  $R$  y  $R_{free}$  son adecuados (valores de  $R_{free}$  inferiores al 30%, y  $R$  de 20-25%) y la geometría del modelo es la correcta.

## CCP4

El paquete de programas CCP4 (The collaborative computational project number 4) de cristalografía de proteínas se creó en 1979 como colaboración entre los investigadores que trabajaban en software aplicado a la cristalografía para formar una colección completa de software para satisfacer los requerimientos computacionales de los grupos de Reino Unido. A diferencia de otros paquetes de software cristalográfico para moléculas pequeñas, CCP4 es un conjunto de programas separados que se comunican a través de archivos de datos estándar, en lugar de tener todas las operaciones integradas en un gran programa. La gran ventaja que deriva de dicho paquete es que es muy fácil añadir programas nuevos o modificar los ya existentes. Los principales tipos de datos que se utilizan en este programa son los datos de reflexión, mapas de densidad electrónica y las coordenadas de los átomos. En la definición de estos formatos se realizan una serie de ventajas y desventajas (en el espacio y el tiempo de acceso) portabilidad, flexibilidad y sencillez de uso [24, 25].

## Refmac

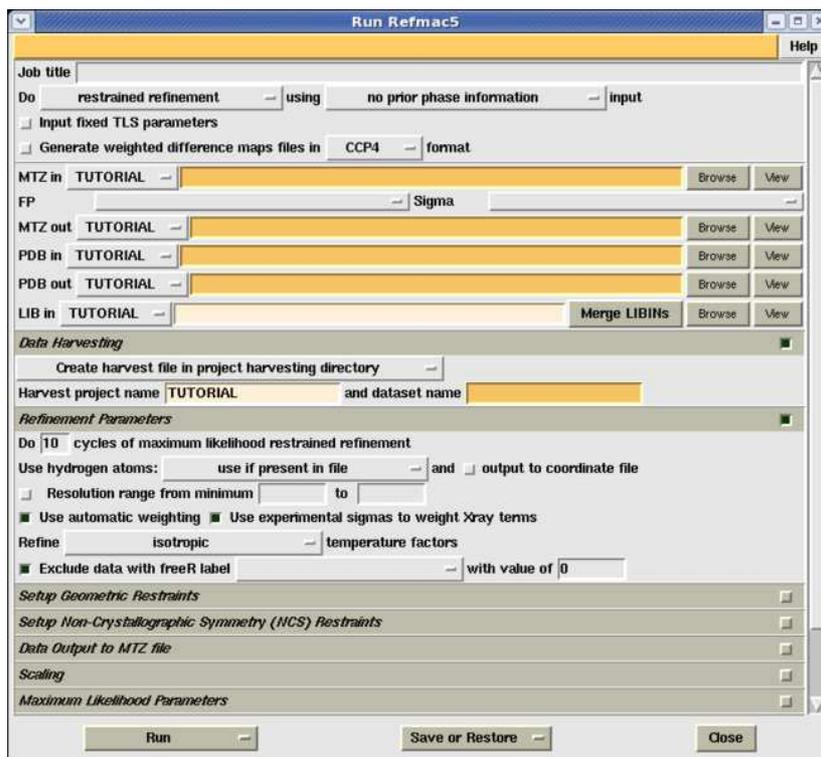
El programa REFMAC [26] permite realizar refinamiento de cuerpo rígido, TLS (modelación de los desplazamientos anisotrópicos), refinamiento restringido y no restringido. Normalmente los datos de rayos X se dan en forma de amplitudes de factores de estructura observadas, aunque la versión más reciente de Refmac puede refinar a partir de intensidades, que además, se pueden usar si las fases experimentales son de calidad. Refmac minimiza los parámetros de coordenadas para satisfacer un residuo de probabilidad máximo. Refmac también produce un archivo de salida mtz que contiene los coeficientes de ponderación para los mapas FWT PHWT y DELFWT PHDELWT, donde han sido restaurados los “datos que faltan”.

Refmac5 refinará un modelo atómico ajustando los parámetros del modelo (coordenadas, factores B, TLS...) con el fin de obtener el modelo que mejor explica los datos experimentales, maximiza la probabilidad. El progreso se mide por el  $R_{\text{factor}}$  y  $R_{\text{free}}$ , así como su ponderación.

Para ejecutar este programa se necesita un archivo que contenga un conjunto de factores de estructura observados y un modelo atómico inicial obtenido por reemplazo molecular o construcción molecular [26].

Entre las opciones (**Figura 9**) de refinamiento existen:

- Revisión de las restricciones (*review restraints*): No se produce refinamiento, pero se comprueba la geometría del modelo.
- Refinamiento restringido (*restrained refinement*): Es el valor predeterminado. El modelo se refina para obtener el mejor ajuste a la densidad experimental, mientras que mantiene una buena geometría.
- Refinamiento no restringido (*unrestrained refinement*): No restringe la geometría del modelo, sólo es válido para alta resolución.
- Refinamiento de cuerpo rígido (*rigid body refinement*): No mueve los átomos individualmente, sino que mueve toda la molécula como unidad única. Muy útil cuando se tiene baja resolución, por ejemplo, después del reemplazo molecular.
- Idealización de la estructura (*structure idealization*): No utiliza datos experimentales, sólo corrige los errores en la geometría.
- TLS y refinamiento restringido (*TLS and restrained refinement*): Es como el refinamiento restringido, pero también se modela el movimiento térmico del cuerpo rígido de la molécula, dando una primera aproximación a un refinamiento anisotrópico, incluso a baja resolución.



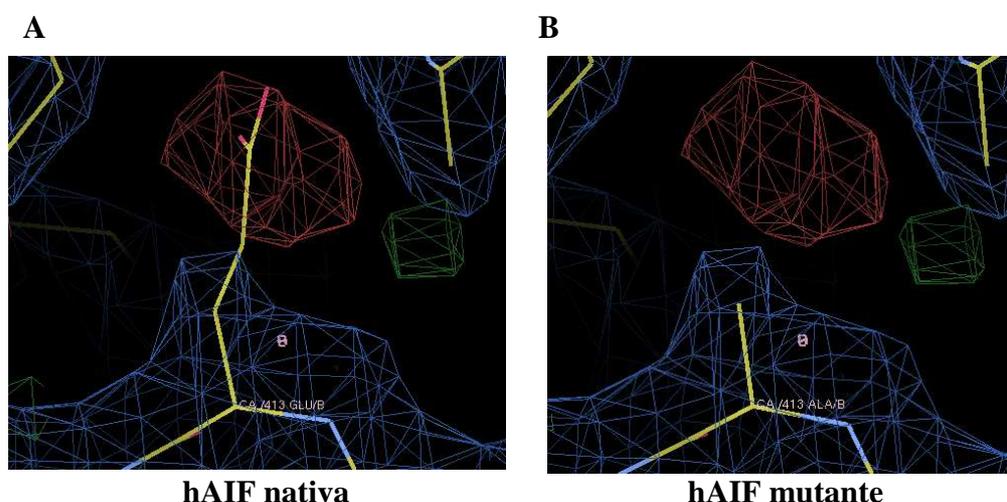
**Figura 9.** Interfaz de Refmac5, programa del CCP4.

## COOT

Coot es una aplicación interactiva de gráficos moleculares diseñado principalmente para el ajuste manual de modelos macromoleculares de datos de rayos X (**Figura 10**) [27].

Las herramientas principales que utiliza este programa son:

- El uso de restricciones de péptidos planos.
- El uso del gráfico de Ramachandran.
- La utilización del llamado rotámeros “Bac Rub”, para encontrar conformaciones alternativas de las cadenas laterales.



**Figura 10.** **A.** Detalle del residuo 413. Al utilizar el reemplazo molecular se ha considerado este residuo como Glu, y aparece una densidad electrónica no observada en el experimento de difracción (en rojo). **B.** Mediante una herramienta del programa Coot, se ha mutado el residuo 413 a Ala.

## Validación

La etapa de validación del modelo constituye la última etapa de la resolución estructural, y en ella se comprueba tanto la estereoquímica del modelo como la correlación de la densidad electrónica.

El modelo generado se ha validado mediante el diagrama de Ramachandran, disponible en el programa Coot.

La estructura resuelta también se ha validado con el programa MolProbity [28], que comprueba además la conformación de los residuos Gln, Asn e His, indicando la

necesidad de realizar torsiones de 180° en la cadena lateral cuando así lo sugieren los puentes de hidrógeno. La razón es que la densidad electrónica de C, N y O es similar, por lo que en estos residuos no es posible identificar la conformación adecuada si no se analiza la formación de puentes de hidrógeno con otros átomos de la proteína o solvente.

### **3.3. Herramientas informáticas para la representación y análisis de las estructuras cristalográficas.**

La representación de estructuras tridimensionales se ha realizado mediante el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC). PyMOL es un programa de visualización molecular, potente y completo para la presentación y animación en 3D de estructuras moleculares.

En muchas de las imágenes los átomos se han coloreado mediante variaciones del sistema CPK, con los átomos de C en diversos colores, los átomos de N en azul, los átomos de O en rojo, los átomos de fósforo en naranja y los átomos de azufre en amarillo.

#### **Análisis de la estructura cuaternaria**

La estructura cuaternaria se analizó mediante el servidor PISA ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/pistart.html)), el cual realiza un análisis termodinámico de las interacciones que se establecen dentro del cristal, predice la existencia de ensamblados macromoleculares y discrimina interacciones “irrelevantes” (debidas al empaquetamiento cristalino) de aquellas que tienen una relevancia biológica. Este servidor calcula además las superficies de interacción entre subunidades así como las interacciones que se establecen entre ellas [29].

Así, entre los resultados calculados que proporciona PISA se incluyen:

- Propiedades estructurales y químicas de las superficies macromoleculares.
- Propiedades estructurales y químicas de las interfases macromoleculares.
- Probables estructuras cuaternarias, sus propiedades estructurales y químicas y un patrón probable de disociación.
- Número de simetría

- Ligandos de tipo homomérico
- Estado multimérico
- Presencia/ausencia de puentes disulfuro y salinos

En nuestro caso, cuando el complejo  $\text{AIF}_{\Delta 1-102 \text{ red}}:2\text{NAD}^+$  (4BUR) se analiza con el servidor PISA se obtienen los resultados recogidos en la **Tabla 2**. Este análisis estructural del empaquetamiento cristalino en el caso del complejo  $\text{hAIF}_{\Delta 1-102 \text{ red}}:2\text{NAD}^+$  (4BUR) con el servidor PISA revela la existencia de un dímero  $\text{A}_2[\text{NAD}]_4[\text{FAD}]_2$ , con una superficie encerrada en la interfase de  $487 \text{ \AA}^2$ , un 6% del total de la superficie accesible para el solvente. La interfase del dímero está estabilizada mediante la formación de 6 puentes de hidrógeno y 4 puentes salinos (**Figura 7**).

**Tabla 2.** Interacciones que se establecen en la interfase del dímero que se forma cuando se reduce  $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}$  con NADH calculadas por el servidor PISA.

Puentes de hidrógeno			
#	Monómero 1	Distancia (Å)	Monómero 2
1	A:ARG 584[NH2]	3,03	A:ASN 583[O]
2	A:ARG 584[NH1]	3,30	A:ASN 583[O]
3	A:LYS 590[NZ]	2,89	A:GLU 596[OE1]
4	A:ASN 583[O]	3,30	A:ARG 584[NH1]
5	A:ASN 583[O]	3,03	A:ARG 584[NH2]
6	A:GLU 596[OE1]	2,89	A:LYS 590[NZ]
Puentes salinos			
#	Monómero 1	Distancia (Å)	Monómero 2
1	A:LYS 590[NZ]	2,89	A:GLU 596[OE1]
2	A:LYS 590[NZ]	3,92	A:GLU 596[OE2]
3	A:GLU 596[OE1]	2,89	A:LYS 590[NZ]
4	A:GLU 596[OE2]	3,92	A:LYS 590[NZ]

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Cristalización de proteínas**

Los ensayos de cristalización de proteínas redox de este trabajo se realizaron empleando protocolos y condiciones diferentes según los ensayos previos de cada una.

#### **4.1.1. Factor de Inducción de Apoptosis**

Para cristalizar el mutante W483G de la proteína hAIF, se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante, partiendo de una solución de proteína a 10 mg/mL en tampón Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 de la que se tomó 1  $\mu$ L que se mezcló con 1  $\mu$ L de líquido madre consistente en 8% de PEG8K, imidazol 0,1 M, pH 8,0. En estas condiciones se habían observado anteriormente la aparición de precipitados cristalinos del mutante. Tras varios días se observó la aparición de un precipitado oscuro que sugería la desnaturalización de la especie W483G hAIF.

Se realizó otro ensayo en las condiciones originales de cristalización de la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$  nativa. La solución de W483G hAIF a 6 mg/mL se mezcló con 16% PEG8K en Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 y en presencia de DTT a una concentración final de 5 mM [11]. También se realizó un control con la proteína nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$  en las mismas condiciones.

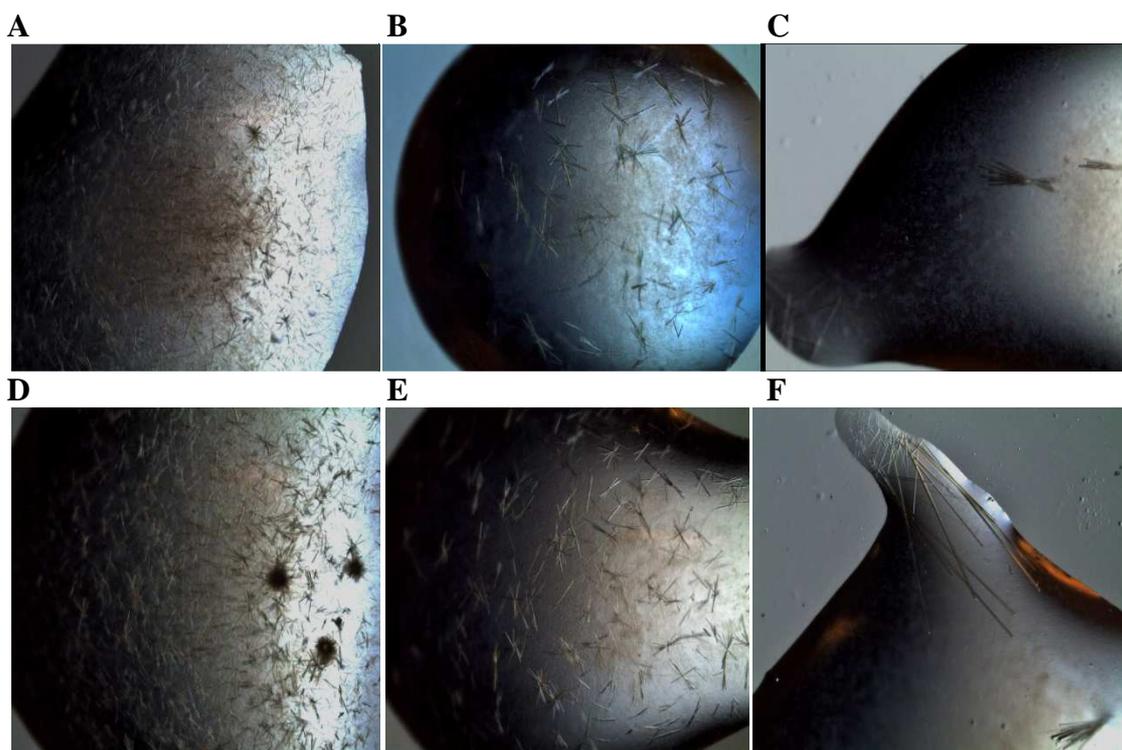
Tras unos días de incubación, se observó la aparición de precipitado en las gotas que contenían el mutante W483G, y no se observó la aparición de cristales o de precipitado en las gotas que contenían la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$ . Más ensayos en otras condiciones deben ser probados con el mutante W483G hAIF aunque el comportamiento del mismo en las gotas y cuando se preparan soluciones del mismo sugiere que esta especie es poco estable y precipita con facilidad incluso en ausencia de agente precipitante.

Para la cristalización de la hAIF $_{\Delta 1-102}$  en presencia de los ligandos ATA y Trolox se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. La proteína se incubó previamente con el inhibidor en una gota que contenía 65  $\mu\text{M}$  de hAIF $_{\Delta 1-102}$  en tampón Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 y 2 mM de inhibidor. Esta mezcla se dejó en hielo unos 5 minutos y después se mezcló en la gota colgante con el líquido madre en las proporciones y condiciones que se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Condiciones de cristalización de la hAIF $_{\Delta 1-102}$  con las moléculas ATA y Trolox. PEG 4K = Polietilenglicol 4000. El % se refiere a masa/volumen (m/v). En todos los casos el agente precipitante se preparó en tampón Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 y LiSO $_4$  de 0,2 M.

Ligando	Líquido Madre	Gota
		$V_{\text{líquido madre}}: V_{\text{proteína}} (\mu\text{L})$
ATA	18% PEG 4K	1:1 y 1:2
	16% PEG 4K	1:1 y 1:2
	14% PEG 4K	1:1 y 1:2
Trolox	20% PEG 4K	1:1 y 1:2
	18% PEG 4K	1:1 y 1:2
	16% PEG 4K	1:1 y 1:2

Tras varios días de incubación, se observó la aparición de agujas de color amarillo en todas las condiciones ensayadas (color de la proteína hAIF debido a su FAD) (**Figura 11**). El número de agujas era mayor en las gotas que contenían mayor concentración de agente precipitante, y el tamaño mayor en las gotas que tenían menor concentración de agente precipitante. En ningún caso estas agujas fueron aptas para la difracción de rayos X.



**Figura 11.** Fotos de las gotas de los cristales de AIF junto con ATA y TROLOX tras más de dos semanas de incubación. **A, B y C.** AIF y ATA al 18%, 16% y 14% de PEG4K, respectivamente. **D, E y F.** AIF y TROLOX Al 20%, 18% y 16% de PEG4K, respectivamente.

También se realizaron en paralelo controles negativos de la cristalización, con ligando y sin proteína, en las mismas condiciones. Estos controles tenían como objetivo comprobar que los cristales que se observaban no eran resultado de la cristalización de los ligandos. En ningún caso se vieron cristales en las gotas de los controles, por lo que se concluyó que las agujas tenían naturaleza proteica.

Para obtener menos cristales, más grandes y con una geometría adecuada, es decir, para mejorar la calidad de los cristales, en el líquido madre se disminuyó la concentración de PEG4K al 12% conservando las mismas condiciones de tampón y sal. También se realizaron controles negativos de la cristalización y controles positivos. Los controles positivos contenían la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$  en las mismas condiciones pero sin ligando. Este control positivo se hizo para comprobar que la presencia de los ligandos no estaba alterando la cristalización de la proteína.

Tras una semana de incubación se observó el crecimiento de unas pocas agujas amarillas, que aunque habían aumentado de tamaño con respecto a las que aparecen en la **Figura 11**, no eran aptas para la difracción de rayos X. En las gotas de control

positivo se observó el mismo patrón que en las demás, por lo que la presencia de los ligandos no interfiere en la cristalización de la proteína aunque en este caso resultara en la formación de cristales aguja.

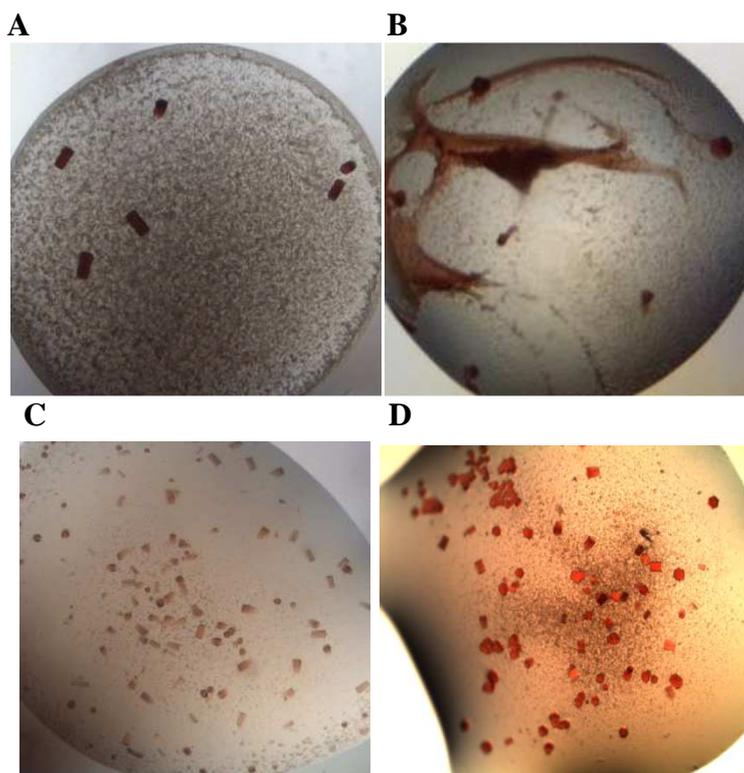
Una manera de mejorar estos cristales en forma de aguja es utilizando el método denominado macrosiembra. Algunas de las agujas preformadas en los experimentos anteriores se recogieron con un pelo de gato y se depositaron sobre gotas que contenían la misma concentración de enzima y ligando y se utilizó un líquido madre que contenía una concentración menor de agente precipitante (PEG4K), 10% (m/v) y en el mismo tampón y sal que los experimentos anteriores. Para la mezcla AIF/ATA se cogieron cristales obtenidos a 16% PEG4K y para la mezcla AIF/Trolox a 18% PEG4K. También se realizó un control negativo de la siembra, con las mismas condiciones pero sin realizar la siembra, y un control positivo de cristalización, en el que las gotas contenían proteína y líquido madre.

Tras varios días de incubación, se observó crecimiento de múltiples agujas amarillas de pequeño tamaño en las gotas en las que se realizó la siembra, y unas pocas agujas amarillas más grandes en las condiciones en las que no había siembra. De ello se deduce que en nuestro caso y con las condiciones ensayadas, la macrosiembra no funciona para obtener mejores cristales de los complejos.

De haber obtenido cristales adecuados en los controles solo con hAIF $_{\Delta 1-102}$ , éstos se hubieran sumergido en una solución concentrada de ligando (ATA/Trolox), para ensayar la técnica de remojo o "soaking".

#### 4.1.2. Citocromo c<sub>6-3</sub>

Para la cristalización del citocromo c<sub>6-3</sub> se utilizó la técnica de difusión de vapor en gota sentada, utilizando los kits comerciales previamente descritos en Materiales y Métodos. Tras siete días de incubación se observó la aparición de cristales en algunos pocillos, que siguieron creciendo hasta el día 21 (**Figura 12A, 12B y 12C**). Las condiciones en las que se observó la aparición de cristales se resumen en la **Tabla 4**.



**Figura 12.** Cristales de citocromo c<sub>6-3</sub> en diferentes condiciones. **A.** Condición A6 del kit Basic HTS. **B.** Condición D7 del kit Basic HTS. **C.** Condición B4 del kit Structure Screen I+II. **D.** Cristales de citocromo c<sub>6-3</sub> tras 7 días de incubación en gota colgante en 30% MPD, CH<sub>3</sub>COONa pH 4,6 y (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 0,2 M.

**Tabla 4.** Condiciones de cristalización del citocromo c<sub>6-3</sub> en las que se obtuvieron cristales.

Kit/condición	Condiciones
Basic A6	30% (v/v) MPD* 100 mM CH <sub>3</sub> COONa pH 4,6 200 mM NaCl
Basic D7	18% (m/v) PEG8000 100 mM MES pH 6,5 200 mM (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn
Structure Screen I+II B4	30% (v/v) MPD 100 mM Cacodilato de Sodio pH 6,5 200 mM (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Mg

\*MPD: 2-Metil-2,4-pentanediol.

Se recogieron 4 cristales de la gota con la condición A6 del kit Basic HTS (**Figura 12.A**) y 3 cristales de la gota con la condición D7 del mismo kit (**Figura 12.B**). Se preparó una disolución crioprotectora consistente en el líquido madre más 20% (v/v) de glicerol en la que se sumergieron los tres últimos cristales, y en un loop de nylon se congelaron en nitrógeno líquido. La disolución de MPD al 30% es ya crioprotectora, por lo que esos cristales se recogieron y congelaron en un loop sin necesidad de pasarlos previamente por una solución crioprotectora.

Los cristales congelados en nitrógeno líquido se transportaron al sincrotrón ALBA (Universidad Autónoma de Barcelona) donde se llevó a cabo el experimento de difracción de rayos X en la línea Xaloc. Varios de estos cristales no presentaron difracción, y los que lo hicieron no dieron patrones con suficiente intensidad a alta resolución, por lo que no se pudo resolver la estructura del citocromo a partir de esos datos.

Para mejorar los cristales, se llevó a cabo una serie de ensayos de difusión de vapor en gota colgante. La proteína estaba a una concentración de 0,8 mM y los diferentes líquidos madre están recogidos en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Condiciones de cristalización del citocromo  $c_{6-3}$  en gota colgante.

Agente precipitante	Tampón (0,1M)	Rango pH	Sal	Rango concentración
30% MPD	CH <sub>3</sub> COONa	4,6 - 7,0	NaCl	0,10 M - 0,20 M
30% MPD	CH <sub>3</sub> COONa	4,6 - 7,0	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Mg	0,10 M - 0,20 M
14 - 18 % PEG8K	MES*	4,5 - 6,5	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn	0,02 M

\*MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

Tras siete días de incubación, se apreció el crecimiento de cristales rojos en la gota que tenía como líquido madre 30% (v/v) MPD, acetato de sodio 0,1 M pH 4,6 y acetato de magnesio 0,2 M (**Figura 12D**).

Se cogieron un total de 7 cristales de los dos hábitos observados con un loop de nylon y fueron almacenados en nitrógeno líquido.

Los cristales se llevaron al sincrotrón Diamond (Harwell Science and Innovation Campus, UK) para llevar a cabo los experimentos de difracción de rayos X, pero ninguno de ellos difractó.

Con el fin de obtener un número menor de cristales y de mayor tamaño, se realizó otra incubación de la proteína a 0,4 mM con el mismo líquido madre, y otro experimento en el que se redujo al 28% y al 26% la concentración de agente precipitante (MPD). En los tres casos se observó la aparición de un gran número de cristales y de un tamaño menor, por lo que se descartó seguir creciendo cristales por esa vía.

#### **4.1.3. FAD Sintetasa**

Para la cristalar las especies R195A/R199A, T208D y S164D FADS se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporción 1:1 y 1:2 (líquido madre: proteína, v/v) con una concentración inicial de proteína de 180  $\mu$ M y líquido madre que contenía tampón fosfato 40 mM, pH 6,8 y  $\text{LiSO}_4$  1,98 M. En esta solución había cristalizado anteriormente la FADS nativa.

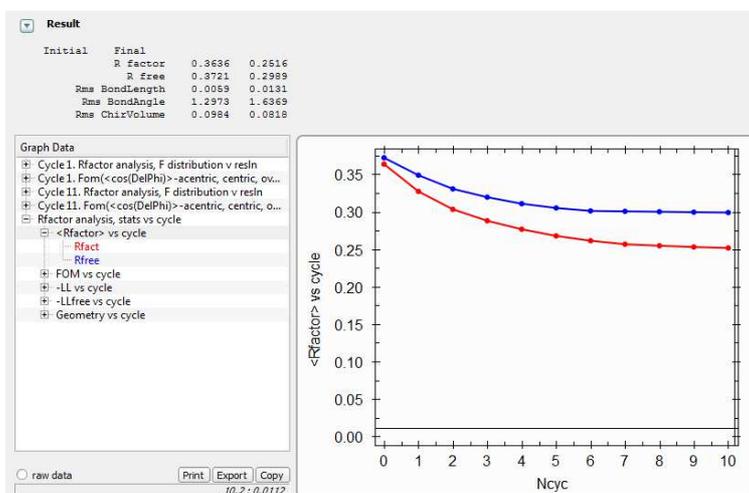
Tras no observar la aparición de cristales o precipitado en las gotas en un rango de tiempo de varias semanas, se realizó una segunda incubación con una concentración mayor de proteína (230  $\mu$ M) en las mismas condiciones. Una de las posibles causas por la que no aparecen cristales o precipitado de una proteína es que no esté a suficiente concentración y por tanto no se alcance la zona de sobresaturación.

Se probó también si la presencia de ditriotretol (DTT) a 2 mM mejoraba la cristalización. Dicho reactivo como agente reductor previene la formación de puentes disulfuro que pueden provocar agregación de proteínas. Tras varias semanas de incubación y en presencia de este reactivo se obtuvo un precipitado de las especies mutantes, pero no cristales de las mismas. En este punto es necesario ensayar otro tipo de condiciones o mejorar la de la nativa variando pH y/o  $T^a$ .

## 4.2. Estudio estructural de la proteína mutada

### 4.2.1. Generación y refinado del modelo estructural

Para la generación y el refinado del modelo estructural de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  se disponía de los factores de estructura en un fichero generado por el programa XDS. Se realizó el reemplazo molecular con el programa Molrep (programa incluido dentro del paquete de programas CCP4) utilizando el modelo estructural de la enzima hAIF $_{\Delta 1-102}$  (4BV6). El programa utilizó las fases del modelo estructural de la enzima hAIF $_{\Delta 1-102}$  y los módulos calculados a partir del experimento de difracción, y los procesó para obtener el mapa de densidad electrónica y un fichero .pdb que contiene las coordenadas de los átomos de la molécula (o moléculas) de la unidad asimétrica. El modelo estructural obtenido (fichero .pdb) fue refinado utilizando el programa Refmac5, que realiza ajustes matemáticos. El programa Refmac5 proporciona el modelo estructural mejorado (fichero .pdb) y los mapas de densidad electrónica diferencia en un fichero .mtz. Estos archivos se visualizaron mediante el programa Coot, con el que se realizó un refinado manual de la estructura de la proteína y se introdujeron las mutaciones. Estos pasos se realizaron varias veces, siguiendo la evolución de los parámetros  $R$  y  $R_{free}$ , así como los valores de la desviación cuadrática media (r.m.d.s.) de las distancias y ángulos de enlace, que fueron disminuyendo tras cada ciclo de refinado (**Figura 13**). Como se ha mencionado anteriormente, estos parámetros son indicativos de que el modelo generado explica la densidad electrónica observada, y a menor diferencia entre el modelo generado y la densidad electrónica, estos valores son menores.



**Figura 13.** Resultado de un proceso de refinado. Los valores de  $R$  y  $R_{free}$  están representados frente a cada ciclo de refinado.

#### 4.2.2. Análisis estructural

La estructura cristalográfica de la especie E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub> se resolvió a una resolución atómica de 2.6 Å.

Las estadísticas de recogida de datos de difracción de rayos X y del refinamiento del modelo se recogen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Datos de la recogida y del refinado del experimento de difracción de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub>

Cristal	E413A/R422A/R430A hAIF <sub>Δ1-102</sub>
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celdilla unidad (Å)	a=66,43 b=107,79 c= 170,62 α=β=γ=90,00
<b>Recogida de datos</b>	
Temperatura	100
Beamline	13-XALOC
Longitud de onda (Å)	0,97941
Resolución (Å)	40-2,6 (2,74-2,60)
Reflexiones totales	321.742
Reflexiones únicas	37.459
Mean I/σ(I)	20,2 (8,6)
Compleitud (%)	97,3 (83,1)
Redundancia	8,6 (6,4)
R <sub>sym</sub> <sup>a</sup>	0,082 (0,206)
<b>Refinado de datos</b>	
Rango de resolución (Å)	40 (2,6)
Número de átomos (no hidrógenos)	
Proteína	7.046
Ligando	105
Solvente	122
R <sub>work</sub> (%)	0,22
R <sub>free</sub> <sup>b</sup> (%)	0,25
r.m.s.d. longitud enlace (Å)	0,005
r.m.s.d. ángulo enlace (°)	1,185
Promedio factor-B (Å <sup>2</sup> )	22,44
<b>Análisis Ramachandran</b>	
Residuos en regiones permitidas (%)	99,01
Fuera (%)	0,99

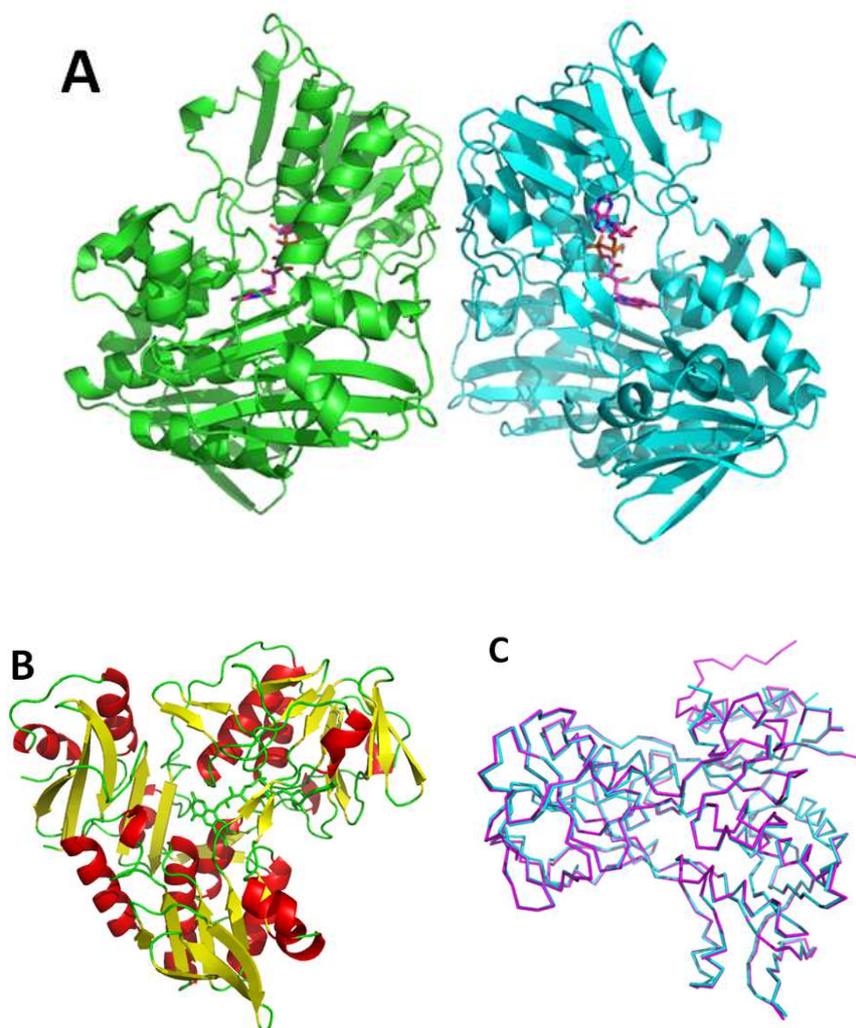
Los datos entre paréntesis corresponden a la concha de mayor resolución  
<sup>a</sup>R<sub>sym</sub>= Σ| I - I<sub>av</sub> | / Σ I, donde el sumatorio se refiere a las reflexiones equivalentes por simetría

<sup>b</sup>R calculado para el 7 % de datos excluidos para el refinado

La unidad asimétrica del cristal de E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub> contiene dos moléculas de proteína, que llamaremos cadena A y cadena B, dos moléculas de cofactor FAD unidas no covalentemente a cada una de ellas y un total de 123 moléculas de agua (**Figura 14A**). El número de cadenas polipeptídicas que aparece en la unidad asimétrica depende del empaquetamiento cristalino y su relevancia biológica debe ser probada.

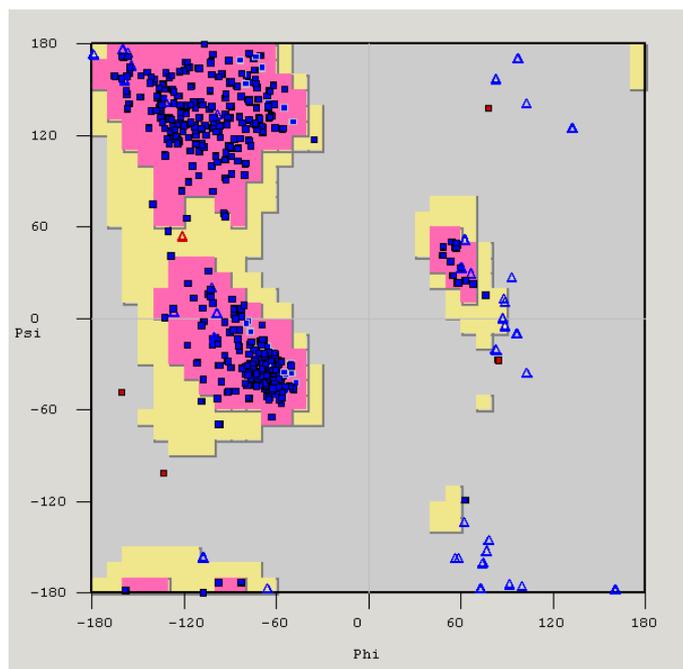
En el modelo estructural resuelto se encuentran los residuos 128-534 y 560-611 de la cadena A y los residuos 128-532 y 559-611 de la cadena B. Estos residuos se han colocado de forma que justifiquen la densidad electrónica observada en el experimento de difracción. Los residuos que no se muestran, 535-559 y 533-558 para las cadenas A y B, respectivamente, no pudieron ser modelados debido a su escasa o nula densidad electrónica. La ausencia de esta densidad electrónica necesaria para poder colocar los residuos podría ser debida, como en la mayor parte de los casos ocurre, a una movilidad elevada de los mismos en la proteína. Aunque las proteínas se encuentran en un estado cristalino, se encuentran rodeadas por el solvente, y las zonas que son poco rígidas (o que establecen interacciones más débiles con el resto de la proteína) pueden moverse sin alterar el conjunto de la red cristalina, es decir, estas zonas tienen conformaciones distintas en las diferentes moléculas que forman el cristal, y al realizarse el promedio de todas ellas en el experimento de difracción, no se puede establecer con exactitud suficiente una densidad electrónica que ayude a determinar su posición.

Además, en este modelo, faltan los residuos de los extremos amino (residuos 102-127 en las dos cadenas) y carboxilo (residuos 612 y 613 en las dos cadenas), aparte del ya mencionado fragmento móvil (segmento 509-560).



**Figura 14.** **A.** Representación de la unidad asimétrica del modelo estructural de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$ . En verde la cadena A y en azul la cadena B. En rosa se muestran los cofactores FAD. **B.** Representación en cintas (*cartoon*) de la cadena A de la estructura de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$ . Las hélices  $\alpha$  están coloreadas en rojo, las hebras  $\beta$  en amarillo y el resto en verde. **C.** Superposición de los esqueletos carbonados ( $C\alpha$ ) de la cadena A de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  (azul) y de la cadena A de la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$  nativa (4BV6) (rosa).

Se realizó la validación del modelo de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  con el diagrama de Ramachandran contenido en el programa Coot (**Figura 15**). El 96.70 % de los residuos se encontraban en zonas preferentes, un 2.31% en zonas permitidas y un 0.99% de los residuos se encontraban en zonas prohibidas. Este 1% de residuos situados en zonas prohibidas del diagrama de Ramachandran se comprobaron visualmente en el programa Coot. La posición de los residuos justifica la densidad electrónica, por lo tanto están bien colocados aunque no cumplen los valores geométricos ideales.



**Figura 15.** Diagrama de Ramachandran. En los ejes están definidos los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  (en grados). Las regiones favorables están representadas en rosa y las permitidas en amarillo, el fondo gris corresponde a las regiones no permitidas. Los residuos están representados como cuadrados azul oscuro, excepto la prolina y la glicina, que están representados como cuadrados azul claro y triángulos azul claro, respectivamente. Los residuos que se encuentran en regiones prohibidas se muestran en rojo.

El modelo estructural obtenido se validó también mediante el programa MolProbity.

Los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Resultados proporcionados por el programa MolProbity para la validación de la estructura E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta$ 1-102.

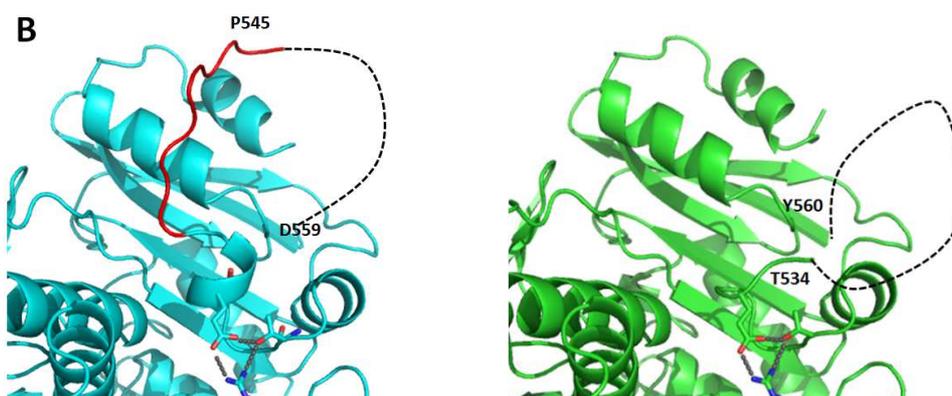
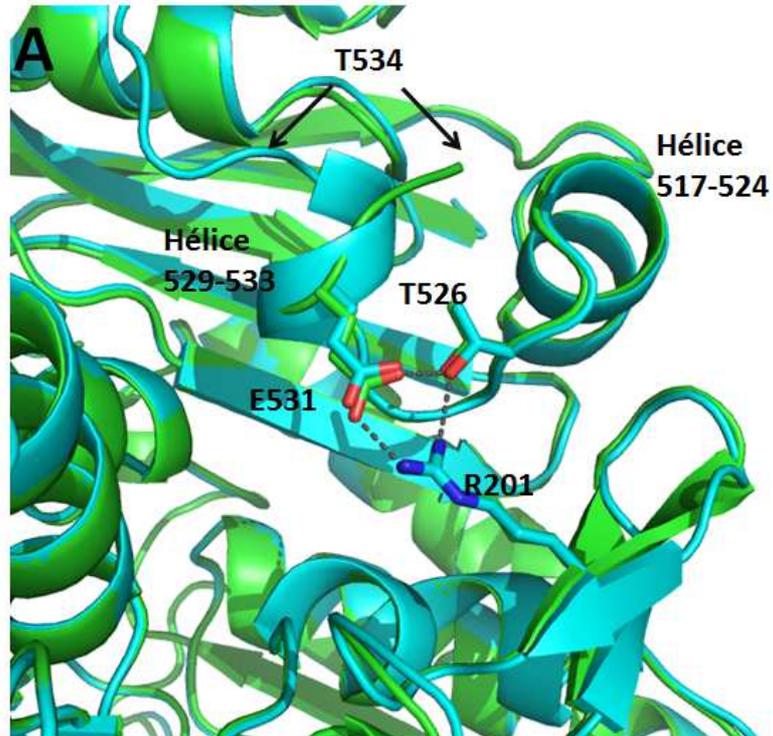
Contactos de todos los átomos	<i>Clashscore</i> , todos los átomos:	1.74	100 <sup>th</sup> percentile* (N=227, 2.60Å ± 0.25Å)	
	<i>Clashscore</i> es el número de solapamientos estéricos graves (> 0.4 Å) por 1000 átomos.			
Geometría de la proteína	Rotámeros pobres	16	2.15%	Objetivo: <1%
	Residuos fuera de las zonas permitidas del diagrama de Ramachandran	2	0.22%	Objetivo: <0.05%
	Residuos en zonas permitidas del diagrama de Ramachandran	883	97.14%	Objetivo: >98%
	Puntuación de MolProbity <sup>^</sup>	1.34	100 <sup>th</sup> percentile* (N=6237, 2.60Å ± 0.25Å)	
	Desviaciones de C $\beta$ >0.25Å	1	0.12%	Objetivos: 0
	Residuos con distancias de enlace incorrectas	0 / 7186	0.00%	Objetivos: 0%
	Residuos con ángulos incorrectos	0 / 9713	0.00%	Objetivos: <0.1%

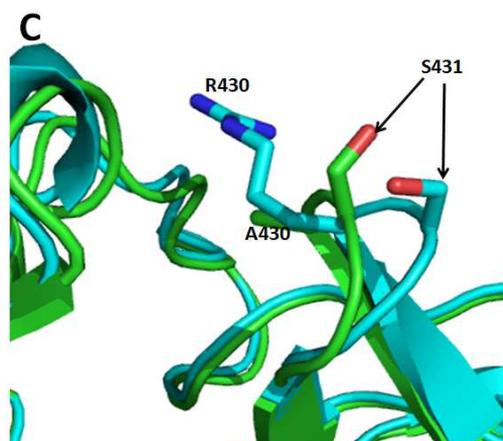
Aunque hay más rotámeros pobres y residuos fuera de las zonas permitidas del diagrama de Ramachandran de los deseados, la posición de esos residuos en la estructura se ha comprobado que es correcta según la densidad electrónica obtenida. La validación del diagrama de Ramachandran hecha con la herramienta del programa Coot (**Figura 15**) también muestra que esos residuos se encuentran en zonas no permitidas.

Mediante el programa PyMOL se realizó la superposición de los C $\alpha$  de las cadenas A y B de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$ . Se superpusieron 458 C $\alpha$  y se obtuvo un valor de la desviación cuadrática media (r.m.d.s.) de 0,104 Å, lo que indica un plegamiento similar de las dos cadenas A y B. Por esta razón a partir de ahora se tomará la cadena A como modelo estructural a efectos comparativos.

De la misma forma, se realizó la superposición de la cadena A de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  con la estructura de la proteína nativa 4BV6 (hAIF $_{\Delta 1-102}$ ) (**Figura 14C**). Se alinearon 414 C $\alpha$  y el valor de r.m.d.s. fue de 0,323 Å. Estos datos muestran que la estructura de la proteína mutante E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  es globalmente similar a la estructura de la proteína nativa en su estado oxidado. Sin embargo y a pesar de la elevada similitud, hay algunas diferencias que podrían ser significativas para explicar el comportamiento del mutante. En esta comparativa con la estructura nativa se observa que los residuos 532-534 de la especie mutante siguen una trayectoria diferente que los residuos homólogos en la cadena de la enzima nativa (**Figura 16A**). Además en el modelo de la nativa se predice una hélice  $\alpha$  formada por los residuos 529-533, mientras que los mismos residuos en la estructura de la mutada no son representados en esta estructura secundaria. Estos residuos y las dos hélices  $\alpha$  cortas 517-524 y 529-533 reducen la accesibilidad al anillo de flavina a través del residuo W483, y que en el modelo de la proteína reducida (4BUR) estos residuos se encuentran desplazados y el espacio ocupado por una molécula de NAD $^+$  [12]. Como no se dispone de densidad electrónica entre los residuos 535-559 en el mutante y entre los residuos 546-558 en la nativa, no se puede visualizar si en esta zona existen diferencias en esta zona entre la especie mutante y la nativa (**Figura 16B**). Para saber si esta diferencia en la trayectoria de los residuos 532-534 se debe a la elevada movilidad de los mismos, se comparó su factor B con el factor B promedio de la proteína. Los residuos 532-534 tienen un factor B de 41,9 Å $^2$ , un valor muy alto comparado con el promedio de la

proteína ( $22,4 \text{ \AA}^2$ ). Estos mismos residuos en la estructura de la proteína nativa tienen un factor B de  $19,4 \text{ \AA}^2$ , muy similar al del promedio de la proteína ( $17,4 \text{ \AA}^2$ ). Sin embargo, aunque los residuos 532-534 tengan una mayor movilidad en la estructura de la proteína mutante, la densidad electrónica observada indica que están en esa posición. Por lo tanto la trayectoria de los residuos 532-534 de la proteína mutante es distinta con respecto a los mismos residuos de la proteína nativa.





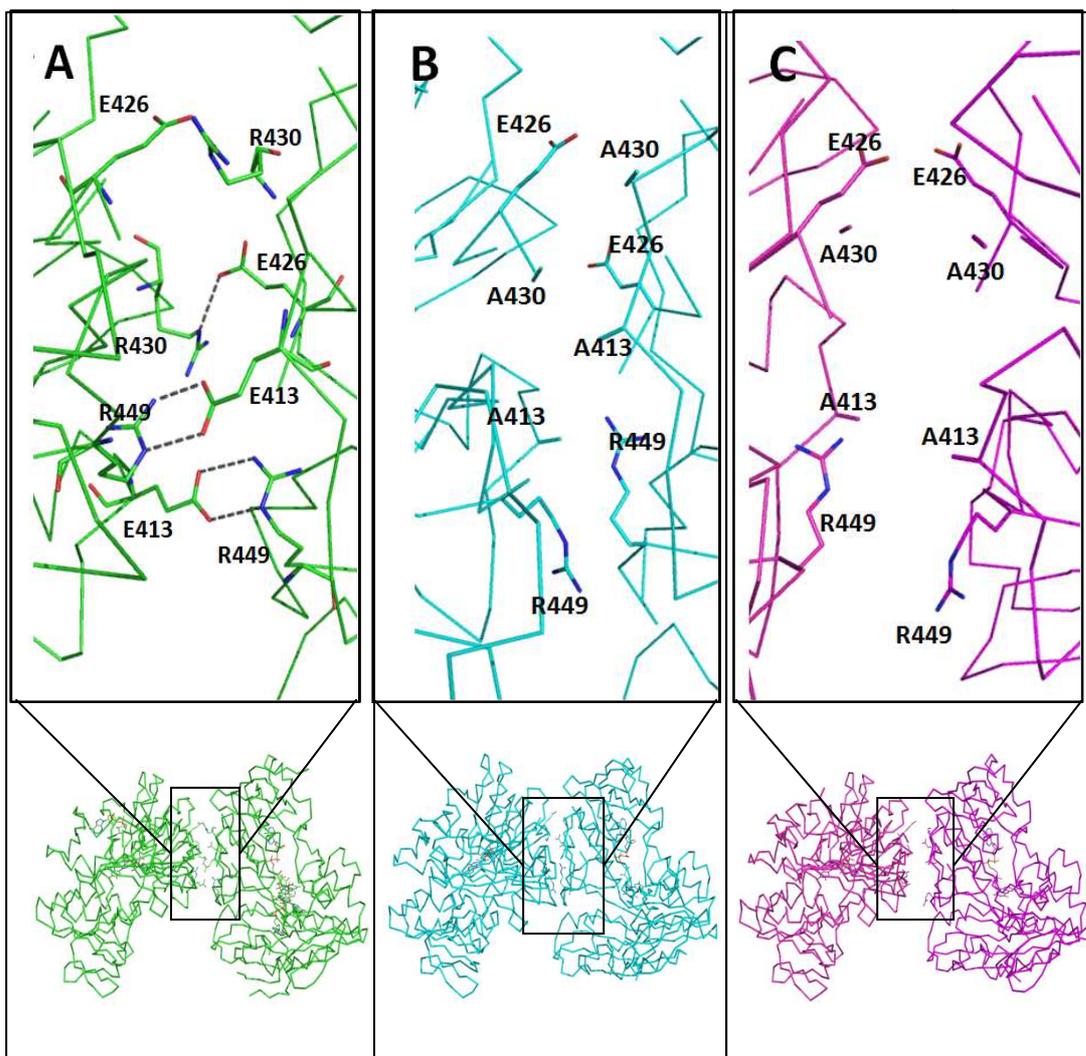
**Figura 16. A.** Superposición de los C $\alpha$  de la cadena A de E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$  (verde) con los de la proteína hAIF nativa (azul). Se han etiquetado las dos hélices  $\alpha$  cortas y los residuos R201, T526 y E531 con sus interacciones. También se indica con flechas el cambio de dirección de las cadenas a partir de los residuos 532-534. **B.** Estudio comparativo de una zona de la hAIF nativa y de la especie mutada. En azul, modelo de la proteína hAIF nativa (4BV6) con sus residuos 434-445 en rojo. La línea discontinua muestra la posible trayectoria de los C $\alpha$  que no tienen densidad electrónica en el modelo (546-558). En verde, modelo de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$ . La línea discontinua muestra la posible trayectoria de los C $\alpha$  de los residuos sin densidad electrónica en el modelo (535-559). **C.** Detalle del modelo de la proteína mutante E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$  (en verde), en la que se muestra la posición mutada 430 y el desplazamiento del residuo S431 con respecto al de la proteína hAIF nativa (en azul).

La posición de la cadena principal de los residuos mutados 413, 422 y 430 es la misma en la enzima nativa que en la especie mutada. Sin embargo la conformación de la serina 431 es diferente en ambas proteínas (**Figura 16D**). Como las interacciones con los residuos cercanos son las mismas en los dos modelos, este último cambio no se puede considerar significativo.

La superposición de los C $\alpha$  del modelo estructural de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$  y del modelo 4BV6 también mostró que tanto el residuo W483 como el grupo prostético FAD se encuentran en la misma posición.

También se realizó la superposición de los C $\alpha$  de la cadena C del complejo hAIF<sub>red</sub>:2NAD<sup>+</sup> (4BUR) con la cadena A de la hAIF $\Delta_{1-102}$  nativa (4BV6) por una parte y de la cadena C del complejo con la cadena A de E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$ . En el caso de la superposición del complejo reducido con la nativa se alinearon 387 C $\alpha$  con un r.m.d.s. de 0,905 Å, y en el caso de la superposición del complejo con el mutante se alinearon 382 C $\alpha$  con un r.m.d.s. de 0,908 Å. Estos datos muestran que, tanto la hAIF nativa como la proteína mutante E413A/R422A/R430A hAIF $\Delta_{1-102}$  deben sufrir un cambio conformacional para adoptar la estructura de la hAIF reducida con NADH que se asocia en dímeros [12].

Como ya se ha explicado, cuando la proteína hAIF nativa se reduce con  $\text{NAD}^+$  dimeriza con otra molécula de hAIF. En la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  los residuos mutados no pueden establecer los puentes salinos estabilizadores de la estructura dimérica (E413 y R449 y entre R430 y E426) (**Figura 17A y 17B**) y tampoco se produce el apilamiento de las Arg422, ya que dicha arginina es en la especie mutante una alanina. La ruptura de estas interacciones y los pequeños cambios conformacionales descritos pueden ser la causa de que no se pueda producir la dimerización de la proteína mutante E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  una vez ha sido reducida con NADH.



**Figura 17.** A. Interfase del dímero hAIF<sub>red</sub>:2NAD<sup>+</sup>. B. Interfase de las dos cadenas presentes en la unidad asimétrica del modelo estructural de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$ . C. Interfase de las cadenas A y B del modelo estructural de E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  si se orientan como en el dímero de hAIF<sub>red</sub>. Debajo de cada interfase se encuentran las cadenas de la unidad asimétrica de cada estructura.

Además hay que tener en cuenta que la orientación relativa entre las cadenas A y B en el mutante no es la misma que la que tienen las cadenas cuando la enzima se reduce y dimeriza. Por este motivo, y para estudiar la interfase de la especie mutante con la orientación relativa adecuada de sus cadenas como si dimerizasen como la nativa, se superpusieron dichas cadenas con las respectivas del dímero hAIF<sub>red</sub>:2NAD<sup>+</sup> (**Figura 17C**). Se pudo observar que, a pesar de que la orientación relativa entre las cadenas del mutante sea la misma que la del dímero reducido, no se forman enlaces entre las cadenas para que se establezca un dímero.

#### **4.2.3. Estructura cuaternaria**

Para estudiar si tiene relevancia biológica la asociación de las dos cadenas en la unidad asimétrica del cristal de E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub> o si una de las cadenas de la misma pudiera establecer alguna organización cuaternaria con otra vecina en la red cristalina, el archivo que contenía las coordenadas del mutante de hAIF fue estudiado en el servidor PISA. El servidor PISA no fue capaz de predecir la formación de estructura cuaternaria alguna a partir del modelo estructural de E413A/R422A/R430A hAIF<sub>Δ1-102</sub>, es decir, que las cadenas A y B así organizadas no tienen probabilidad de ser un dímero ni tampoco cualquiera de ellas con ninguna cadena vecina. En el caso de la hAIF<sub>Δ1-102</sub> (4BV6) el mismo estudio concluyó que la cadena de la unidad asimétrica de la hAIF nativa no forma, con esa conformación, asociación dimérica con otras cadenas vecinas. Por tanto debe sufrir un cambio conformacional motivado por la unión del NADH para dimerizar [12].

## 5 CONCLUSIONES

Se ha resuelto la estructura de la proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  a partir de datos de difracción de rayos X utilizando el método de reemplazo molecular.

La proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  se pliega globalmente de forma similar a la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$ .

La trayectoria de los residuos 432-434 del modelo E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  es distinta a la de los mismos residuos de la proteína hAIF $_{\Delta 1-102}$ .

La proteína E413A/R422A/R430A hAIF $_{\Delta 1-102}$  debería sufrir cambios conformacionales al reducirse, al igual que la proteína nativa, para que se pudiesen establecer las interacciones que estabilizan el dímero.

Las mutaciones E413A/R422A/R430A provocan que en la estructura de la especie mutante hayan desaparecido fuerzas estabilizantes en la interfase del dímero que se forma cuando la hAIF nativa es reducida con NADH.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. Rhodes (2000). *Crystallography. Made Crystal Clear*. Academic Press.
- [2] Herguedas, B. (2011). Proteínas con dominios de unión a flavina: bases estructurales de la biosíntesis de cofactores flavínicos en procariontas y de la interacción y transferencia de electrones entre flavinas. *Bioquímica y Biología Molecular y Celular*, Universidad de Zaragoza
- [3] E.E. Lattman and P. J. Loll (2008). *Protein Crystallography: A Concise Guide*. The Johns Hopkins University Press
- [4] E. F. Garman and T. R. Schneider (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* 30, 211-237.
- [5] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan and V. Sasisekharan (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* 7, 95-99.
- [6] E. Daugas, D. Nochy, L. Ravagnan, M. Loeffler, S. A. Susin, N. Zamzami, G. Kroemer (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* 476, 118-123
- [7] S. K. Natarajan and D. F. Becker (2012) Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell Health Cytoskelet* 11-27
- [8] I. F. Sevrioukova (2011). Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14, 2545-2579
- [9] H. Ye, C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer and H. Wu (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature Structural Biology*. Vol. 9, num. 9, 680-684
- [10] E. C. Cheung, N. Joza, N. A. Steenaart, K. A. McCellan, M. Neuspiel, S. McNamara, J. G. MacLaurin, P. Rippstein, D. S. Park, G.C. Shore, H. M.

- McBride, J. M. Penninger and R. S. Slack (2006). Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *Embo J.* 25, 4061-4073
- [11] C. Rinaldi, C. Grunseich, I. F. Sevrioukova, A. Schindler, I. Horkayne-Szakaly, C. Lamperti, G. Landouré, M. L. Kennerson, B. G. Burnett, C. Bönnemann, L. Biesecker, D. Ghezzi, M. Zeviani, and K. H. Fischbeck (2012). Cowchock Syndrome Is Associated with a Mutation in Apoptosis-Inducing Factor. *The American Journal of Human Genetics* 91, 1095 – 1102
- [12] P. Ferreira, R. Villanueva, M. Martínez-Júlvez, B. Herguedas, C. Marcuello, P. Fernandez-Silva, L. Cabon, J. A. Hermoso, A. Lostao, S. A. Susin and M. Medina (2014). Structural insights into the coenzyme mediated monomer-dimer transition of the pro-apoptotic apoptosis inducing factor. *Biochemistry.* 53(25), 4204-4215.
- [13] P. Ferreira, R. Villanueva, L. Cabon, S. A. Susin, M. Medina (2013). The oxidoreductase activity of the apoptosis inducing factor: a promising pharmacological tool? *Curr. Pharm. Des.* 19, 2628-2636
- [14] L. L. Chan, M. Pineda, J. T. Heeres, P. J. Hergenrother and B. T. Cunningham (2008). A General Method for Discovering Inhibitors of Protein-DNA Interactions Using Photonic Crystal Biosensors. *ACS Chem. Biol.* 3 (7), 437-448
- [15] E. Norberg, V. Gogvadze, H. Vakifahmetoglu, S. Orrenius and B. Zhivotovsky (2010). Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free Radical Biology & Medicine.* 48, 791-797.
- [16] F. Chiappini, C. Pontillo, A. S. Randi, L. Alvarez and D. L. Kleiman de Pisarev (2013) Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediate hexachlorobenzene-induced cell death in FRTL-5 rat thyroid cells. *Toxicol Sci.* 134 (2): 276-290

- [17] Schmetterer G and Pills D. Cyanobacterial respiration (2004) In: Bryant DA, ed. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994:409–435.
- [18] C. A. Kerfeld, K. K. Ho and D. W. Krogmann. The cytochrome *c* of cyanobacteria. In: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G, eds. The Phototrophic Prokaryotes. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999:259–268.
- [19] G. A. Peschek. Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. Bioenergetic significance and molecular interactions. In: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G, eds. The Phototrophic Prokaryotes. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999:201–209.
- [20] E. Padan. Facultative anoxygenic photosynthesis in cyanobacteria (1979) *Annu Rev Plant Physiol* 30:27–40.
- [21] H. K. Ki. Cytochrome *c<sub>6</sub>* Genes in Cyanobacteria and Higher Plants. In: Pessaraki M, ed. Handbook of Photosynthesis, Second Edition, CRC Press, 2005.
- [22] C. Walsh, J. Fisher, R. Spencer, D. W. Graham, W. T. Ashton, J. E. Brown, R. D. Brown and E. F. Rogers (1978). Chemical and enzymatic properties of riboflavin analogues. *Biochemistry*. 17(10), 1942-1951.
- [23] B. Herguedas, M. Martínez-Júlvez, S. Frago, M. Medina and J. A. Hermoso (2010). Oligomeric state in the crystal structure of modular FAD synthetase provides insights into its sequential catalysis in prokaryotes. *J. Mol Biol.* 400(2), 218-230.
- [24] D. M. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin and K. S. Wilson. (2011). Overview of the *CCP4* suite and current developments. *Acta Cryst.* D67, 235-242

- [25] A. Faust, S. Panjikar, U. Mueller, V. Parthasarathy, A. Schmidt, V. S. Lamzin and M. S. Weiss (2008). "A tutorial for learning and teaching macromolecular crystallography" *J. Appl. Cryst.* 41, 1161-1172
- [26] G. N. Murshudov, P. Skubák, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long and A. A. Vagin (2011). *REFMAC5* for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst.* D67, 355-367
- [27] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Cryst.* D66, 486-501
- [28] V. B. Chen, W. B. Arendall III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* D66, 12-21
- [29] E. Krissinel and K. Henrick (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372(3): 774-797