

# **Cristalización de proteínas redox y predicción estructural de la FAD sintetasa humana.**

**Víctor Taleb Seral**

Directoras: Marta Martínez Júlvez y Ana Isabel Gracia Lostao

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI)

Instituto de Nanociencia de Aragón

Universidad de Zaragoza

<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Cristalografía de rayos X aplicada a proteínas</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Predicción estructural de la enzima FAD sintetasa humana</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Microscopia de fuerzas atómicas</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Proteínas estudiadas</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1. FAD sintetasa humana, isoforma 2 (hFADS_2)</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2. Riboflavin quinasa humana (hRFK)</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3. Flavodoxin reductasa de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv citri (<i>XacFPR</i>)</b>	<b>9</b>
<b>1.4.4. Especies mutantes del Factor de inducción de apoptosis humano (hAIF)</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Obtención de cristales</b>	<b>10</b>
<b>3.1.1 hFADS_2</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 <i>XacFPR</i></b>	<b>11</b>
<b>3.1.3 hRFK</b>	<b>12</b>
<b>3.1.4 Especies mutantes de la proteína hAIF</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Procesado y refinamiento de datos de difracción de rayos X</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Predicción estructural de la FAD sintetasa humana</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Microscopia de fuerzas atómicas</b>	<b>15</b>
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Estudios estructurales en hFADS_2</b>	<b>16</b>
<b>4.1.1. Cristalografía</b>	<b>16</b>
<b>4.1.2. Predicción de la estructura tridimensional</b>	<b>17</b>
<b>4.1.3. Estudios morfológicos mediante AFM</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Estudios estructurales en <i>XacFPR</i></b>	<b>21</b>
<b>4.3. Cristalización de hRFK</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Estudios estructurales en especies mutantes de hAIF</b>	<b>23</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>27</b>

## Resumen

Este trabajo ha abordado el estudio estructural de proteínas redox de interés biotecnológico y biomédico tales como el factor de inducción de la apoptosis humano, implicado en procesos de muerte celular (hAIF), la NADPH-flavodoxina reductasa del microorganismo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*XacFPR*) y las proteínas riboflavin quinasa humana (hRFK) y FAD sintetasa humana (hFADS\_2), implicadas en la síntesis del cofactor FAD necesario para múltiples rutas metabólicas así como para la actividad de las flavoproteínas.

Con este fin se han utilizado varias técnicas: la cristalografía de rayos X, la predicción estructural de proteínas y la microscopia de fuerzas atómicas.

La técnica de cristalografía de rayos X aplicada a proteínas está basada en la obtención de cristales proteicos que difractan los rayos X proporcionando datos que conducen a la resolución de la estructura tridimensional de la proteína. Esta técnica se puede llevar a cabo en presencia de ligandos de manera que se consigue información de la interacción proteína - ligando.

Durante el desarrollo de este trabajo se han identificado condiciones iniciales de cristalización de las proteínas riboflavin quinasa humana (hRFK) y de las especies mutantes del factor de inducción de la apoptosis humano (hAIF), así como la resolución de la estructura de la proteína *XacFPR* cocrystalizada con NADP<sup>+</sup> y/o un inhibidor de su actividad reductasa en la que no se observa densidad electrónica extra debida al ligando.

Con el fin de avanzar en el conocimiento de la estructura de la enzima hFADS\_2, y a falta de un modelo cristalográfico, se realizó una predicción de su estructura tridimensional así como un estudio morfológico del dominio C terminal mediante microscopia de fuerzas atómicas. Se observó que el dominio C terminal aislado dimeriza y que los monómeros presentan una altura promedio de  $3,5 \pm 0,5$  nm, que se ajusta a las dimensiones encontradas en las predicciones.

## **Abstract**

This work has approach the structural study of redox proteins of biotechnological and biomedical interest such as the human apoptosis induction factor, involved in cell death processes (hAIF), NADPH-flavodoxin reductase from the phytopathogenic microorganism *Xanthomonas axonopodis* pv citri (XacFPR) and Human riboflavin kinase (hRFK) and human FAD synthase (hFADS\_2) proteins, involved in the synthesis of the FAD cofactor required for multiple metabolic pathways as well as for flavoproteins activity.

To this end, several techniques have been used: X-ray crystallography, proteins structural prediction and atomic forces microscopy.

The X-ray crystallography applied to proteins technique is based on obtaining protein crystals that diffract the X-rays providing data that lead to the resolution of the three-dimensional structure of the protein. This technique can be carried out in the presence of ligands so that information of the protein-ligand interaction is obtained.

During the development of this work, the initial crystallization conditions of human riboflavin kinase (hRFK) and human apoptosis induction factor (hAIF) mutant species have been identified, as well as the resolution of the XacFPR protein structure Cocrystallized with NADP<sup>+</sup> and / or an inhibitor of its reductase activity in which no extra electron density due to the ligand is observed.

In order to advance the knowledge of the structure of the hFADS\_2 enzyme, and in the absence of a crystallographic model, a prediction of its three-dimensional structure was made as well as a morphological study of the C terminal domain by atomic forces microscopy. It was observed that the isolated C terminal domain dimerizes and that the monomers have an average height of  $3.5 \pm 0.5$  nm, which fits with the dimensions found in the predictions.

## **1. Introducción**

### **1.1. Cristalografía de rayos X aplicada a proteínas**

Un cristal es una agrupación de moléculas, átomos u otra unidad representativa que tiene la característica de tener un orden definido en las tres direcciones del espacio, basándose en una unidad mínima conocida como celdilla unidad que se va repitiendo en el cristal, y esta a su vez formada por una unidad mínima sin simetría interna, la unidad asimétrica. La celdilla unidad es una representación de la unidad asimétrica afectada por elementos de simetría que definen su posición con los tres ejes del espacio y los ángulos entre los mismos.

Los cristales proteicos tienen características diferentes a los cristales de moléculas pequeñas. Estos últimos suelen presentar interacciones fuertes entre los átomos que conforman el cristal lo que les confiere una alta dureza y fuertes propiedades ópticas y que sus patrones de difracción sean muy intensos. En el caso de cristales proteicos, las proteínas contenidas en los mismos están solvatadas por el disolvente (agua) de manera que el cristal es en gran proporción solvente, volviéndolo blando y debilitando la interacción entre moléculas. Debido a esto, la posición de las proteínas en cada una de las celdillas unidad puede ser ligeramente diferente y sus patrones de difracción son más débiles que aquellos de las moléculas orgánicas o inorgánicas.

Aun siendo una desventaja frente a la difracción, al estar solvatadas las moléculas de proteínas en el cristal son más representativas de la proteína en su medio natural que si no estuvieran solvatadas. Además esto ayuda a que los ligandos y cofactores difundan a través de los canales de solvente y se unan a las proteínas del cristal para poder estudiar su unión.

Para conseguir cristalizar una proteína hay que sobrepasar su límite de solubilidad y llegar a la zona de sobresaturación, donde la proteína comienza a precipitar hasta alcanzar el equilibrio entre la fase acuosa y la fase sólida (precipitado). El proceso de formación de cristales consta de las etapas de nucleación y crecimiento. La etapa de nucleación es aquella en la que un grupo de moléculas de proteína interactúan y forman núcleos cristalinos termodinámicamente estables. En la etapa de crecimiento se van agregando de manera ordenada el resto de moléculas de proteína sobre estos núcleos cristalinos. Si este proceso ocurre con demasiada rapidez las moléculas no llegarán a ordenarse y se generarán precipitados amorfos de la proteína, mientras que si el proceso es más lento se establece un equilibrio en el que da tiempo a que se produzca la ordenación de las moléculas de proteína.

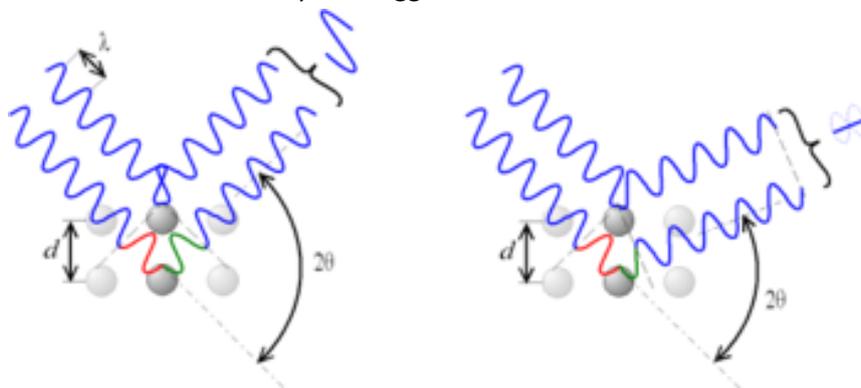
Para llegar a este equilibrio existen varios métodos como añadir un agente precipitante o eliminar agua de la disolución de proteína, entre otros.

El más común es el método de difusión de vapor. En este método se coloca una gota de una mezcla de proteína y agente precipitante frente a un reservorio de mayor volumen que contiene únicamente el agente precipitante. Dado que en la gota hay una menor concentración de agente precipitante el sistema evoluciona hacia el equilibrio pasando agua desde la gota al reservorio en forma de vapor, y así aumentando la concentración de agente precipitante en la gota. Si con el aumento en la concentración de la gota llegamos a la nucleación, observaremos la formación de cristales<sup>9</sup>.

Si las condiciones de cristalización no permiten llegar a la nucleación, no habrá formación de núcleos pero si previamente hay núcleos en la gota puede que se observe crecimiento de los mismos. Este principio se utiliza en la técnica de la microsiembra donde se llevan núcleos desde una disolución, donde la proteína no genera cristales de un tamaño adecuado, a otra en la que hay menor concentración de agente precipitante fomentando así el crecimiento sobre los núcleos ya existentes.

La técnica de difracción de rayos X se basa en la interacción entre los átomos de la estructura cristalina y el haz de rayos X. Al incidir el haz en la estructura, los electrones del cristal emiten radiación (rayos X) en todas las direcciones del espacio y debido al orden interno del cristal en ciertas direcciones se producen interferencias constructivas que es lo que se conoce como fenómeno de difracción (**Figura 1**). Los máximos de estos haces dispersados siguen la ley de Bragg (**Ecuación 1**).

**Ecuación 1:** Ley de Bragg:  $n\lambda = 2d \sin\theta$



**Figura 1:** Fenómeno de difracción donde se observan las interferencias constructivas (izquierda) y las interferencias no constructivas (derecha)

Esto proporciona un patrón de difracción, que depende de la estructura del cristal.

En los experimentos de difracción la radiación emitida por la muestra se recoge en un detector y dado que un cristal contiene familias de planos paralelos en distintas direcciones es necesario girar la muestra mientras se realiza el experimento para que todos los planos del cristal sean observables. El objetivo final es obtener una función de densidad electrónica (**Ecuación 2**) que depende tanto de los módulos como las fases de los factores de estructura de las ondas difractadas. Esta información última se pierde durante los experimentos. Este hecho se conoce como el problema de las fases.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{\substack{hkl \\ -\infty \\ +\infty}} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

**Ecuación 2:** Función de densidad electrónica.

En cristales de macromoléculas el problema de la fase se puede resolver mediante el método de reemplazo molecular, que utiliza como modelo estructural el de una proteína con secuencia

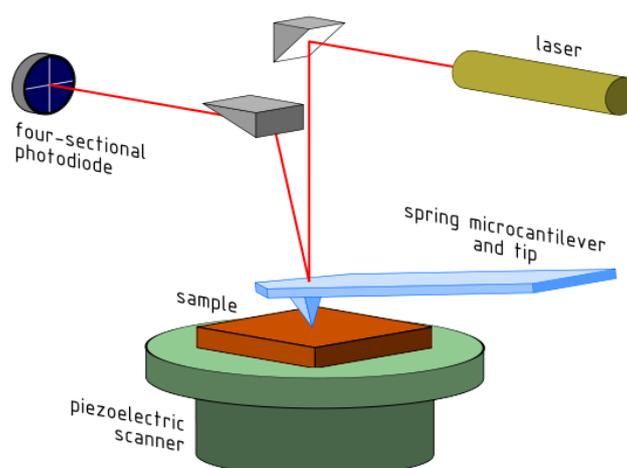
similar a la estudiada, de tal manera que usando los módulos experimentales y las fases iniciales calculadas con el modelo se calcula una primera función de densidad electrónica. Este mapa de densidad electrónica se refina alternando ciclos automáticos y manuales.

### **1.2. Predicción estructural de la enzima FAD sintetasa humana**

La predicción de la estructura tridimensional de una proteína que no se encuentra resuelta por cristalografía o RMN se consigue en varios pasos: (i) búsqueda de proteínas cuya secuencia de aminoácidos sea similar a la de la proteína y cuya estructura sea conocida, (ii) construcción de un modelo tridimensional basado en las estructuras de dichas proteínas ya que secuencias similares se pliegan de forma parecida en el espacio y (iii) evaluación de la calidad del modelo predicho para la proteína. Cada uno de estos pasos requiere programas especializados y acceso a bases de datos de estructuras y secuencias de proteínas <sup>15</sup>.

### **1.3. Microscopia de fuerzas atómicas**

La técnica de microscopia de fuerzas atómicas (AFM) nos permite observar partículas de tamaño nanométrico, así como calcular fuerzas de interacción y propiedades mecánicas y magnéticas del material estudiado. Se basa en la interacción de una punta nanométrica, situada en el extremo de una micropalanca o cantiléver, con la superficie de una muestra colocada sobre un escáner piezo-eléctrico. Sobre este cantiléver incide un láser cuyo reflejo recoge un fotodetector, donde se captan las variaciones generadas en la punta durante su interacción con la muestra (**Figura 2**). El sistema busca corregir las variaciones en la punta valiéndose del piezo-eléctrico sobre el que está colocada la muestra para desplazarla hasta que la señal recibida por el fotodetector sea igual a la original. Registrando estos movimientos del piezo-eléctrico se generan las imágenes de AFM.



**Figura 2:** detalle de la zona de medida de un microscopio de fuerzas atómicas.

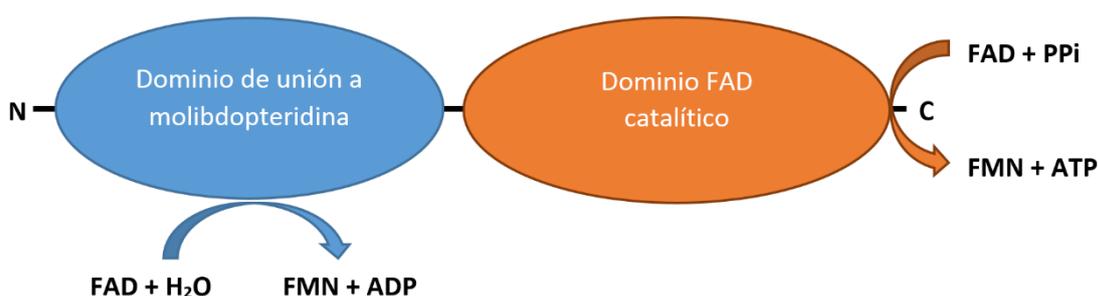
En esta técnica existen varios modos de medida, los más comunes son el modo contacto y el modo tapping.

El modo contacto es aquel en el que la punta está siempre en contacto con la muestra y el equipo busca detectar variaciones en la altura de la punta. El modo tapping es aquel en el que la punta está constantemente oscilando a una frecuencia próxima a la de resonancia de la palanca y el equipo busca mantener mediante un sistema de retroalimentación la amplitud de la oscilación de la punta, que es lo que queda fijado.

#### **1.4. Proteínas estudiadas**

##### **1.4.1. FAD sintetasa humana, isoforma 2 (hFADS 2)**

La proteína FAD sintetasa humana está implicada en la síntesis del cofactor FAD a partir de FMN que necesitan las flavoproteínas para realizar su función en rutas metabólicas vitales <sup>12</sup>. De estudios anteriores de similitud de secuencias con otras proteínas, se conoce que la hFADS\_2 está compuesta de dos dominios, un dominio C-terminal o de síntesis de FAD y un dominio N-terminal que guarda homología con el dominio de unión a molybdopteridina o FAD hidrolítico (**Figura 3**) <sup>2, 15</sup>.

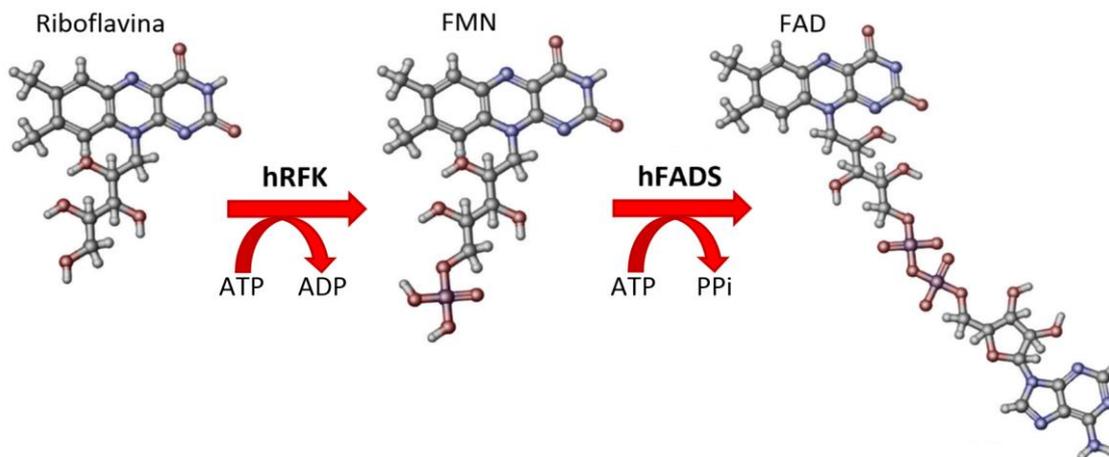


**Figura 3:** Distribución de los dominios de FAD sintetasa humana.

En mamíferos, esta proteína, junto a la riboflavin quinasa, llevan a cabo la síntesis de FAD a partir de riboflavina (RF) mientras que en procariontas esta función es realizada por una sola proteína bifuncional con un dominio riboflavin quinasa (RFK) y un dominio FMN adenilil transferasa (FMNAT) <sup>1, 4, 17</sup>. Por ello, es interesante estudiar esta proteína para comparar diferencias estructurales con la FAD sintetasa de procariontas dado que esta última es una buena diana terapéutica.

##### **1.4.2. Riboflavin quinasa humana (hRFK)**

La riboflavin quinasa humana es una proteína implicada en la misma ruta metabólica que la FAD sintetasa. Lleva a cabo la síntesis de FMN a partir de riboflavina que posteriormente es transformada en FAD por la FAD sintetasa (**Figura 4**) <sup>2, 13</sup>.



**Figura 4:** Ruta metabólica de la síntesis de FAD en humanos

Al actuar sobre la misma ruta metabólica esta proteína en procariontes es también una buena diana terapéutica y por ello resulta interesante estudiar esta proteína para detectar diferencias estructurales.

#### **1.4.3. Flavodoxin reductasa de *Xanthomonas axonopodis pv citri* (XacFPR)**

El patógeno *Xanthomonas axonopodis pv citri* es el responsable de causar la enfermedad “cancro” en cultivos de cítricos, provocando la pérdida de numerosas cosechas y la correspondiente pérdida económica. La enzima XacFPR está implicada en la ruta de respuesta a estrés oxidativo lo que se traduce en la supervivencia del patógeno. Este hecho ha convertido a la XacFPR en diana terapéutica de la que se han identificado algunos compuestos con función inhibitoria de su actividad. Un objetivo es conocer la unión de estos compuestos a la enzima y así conocer mejor el mecanismo de inhibición. Estos compuestos son la base de la síntesis de fármacos que combatan esta enfermedad de los cítricos.

#### **1.4.4. Especies mutantes del factor de inducción de apoptosis humano (hAIF)**

El factor de inducción de apoptosis es una proteína del espacio inter-mitocondrial que está directamente relacionado con el proceso apoptótico independiente de caspasas. Durante la vida de la célula esta proteína actúa como una oxidoreductasa sobre los complejos de la cadena respiratoria. Cuando es liberado de la mitocondria hAIF entra en el núcleo y produce la condensación de la cromatina y la fragmentación a gran escala del ADN. Al estar implicada en procesos de apoptosis es interesante estudiar la estructura de algunos mutantes (variantes artificiales de la enzima con uno o varios aminoácidos diferentes a los de la especie nativa) para avanzar en el estudio de su mecanismo catalítico <sup>5, 7, 11</sup>.

## **2. Objetivos:**

El objetivo principal de este trabajo ha sido avanzar en el estudio estructural de algunas flavoproteínas utilizando la técnica de cristalografía de rayos X.

Para conseguir estos objetivos se han propuesto las siguientes actividades:

- Cristalización del dominio C terminal de la proteína FAD sintetasa humana (isoforma 2) o hFADS\_2.
- Predicción de la estructura tridimensional de la proteína FAD sintetasa humana (isoforma 2) o hFADS\_2.
- Toma de imágenes de AFM para estudiar la morfología del dominio C-terminal de la proteína FAD sintetasa humana (isoforma 2) o hFADS\_2.
- Cristalización de los mutantes W483G, W483Y y W483L hAIFs y la resolución estructural del complejo E413A/R422A/R430A hAIF:NADH.
- Cristalización de la proteína humana riboflavin quinasa (hRFK).
- Cristalización de la FPR de *Xanthomonas axonopodis pv citri* (XacFPR).
- Cocrystalización de la proteína XacFPR con el inhibidor D5 y con la coenzima NADP<sup>+</sup>.
- Resolución de la estructura cristalina de la proteína XacFPR cocrystalizada con el inhibidor D5 o con el coenzima NADP<sup>+</sup>.

Competencias adquiridas durante el desarrollo de este trabajo fin de grado:

- Conocimiento de las técnicas de cristalización mediante difusión de vapor en gota colgante y gota sentada.
- Conocimiento teórico y manejo de los programas informáticos necesarios para la resolución estructural y representación de proteínas (CCP4, Refmac5, COOT, Pymol, etc).
- Manejo del robot de dispensación de pequeños volúmenes NanoDrop 2 y de la granja de cristales (Formulatrix).
- Conocimiento de la técnica de microsiembra.
- Manejo de servidores y herramientas informáticas para la predicción y validación de estructuras tridimensionales de proteínas (GENO3D, SwissModel, RaptorX, Expasy).
- Conocimiento y manejo del equipo de microscopia de fuerzas atómicas.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Obtención de cristales**

Para la obtención de cristales de proteína se ha usado el método de difusión de vapor en gota colgante y en gota sentada.

Los experimentos en gota sentada se realizaron en placas de 96 pocillos con 0,3 µl de líquido madre y 0,3 µl de proteína. Las gotas se equilibraron frente a 60 µl de líquido madre. Los volúmenes se dispensaron con el robot NanoDrop 2 (Innovadyne Technologies).

Los experimentos en gota colgante se realizaron en placas de 24 pocillos con gotas que contenían proporciones variables de líquido madre y de proteína (1:1, 1:2 ó 2:1 v/v). Estas gotas se equilibraron frente a 500 µl de líquido madre.

Se utilizó también el método de microsiembra en la producción de cristales. Para esta técnica se usó un pelo de bigote de gato para recoger núcleos y pequeños cristales de gotas y

traspasarlos a las gotas de microsiembra, conteniendo éstas una menor concentración de agente precipitante. Esto propicia el crecimiento de los núcleos ya existentes en lugar de la formación de nuevos núcleos. La microsiembra se realizó en placas de 24 pocillos con gotas que contenían proporciones variables de líquido madre y de proteína (v/v). Estas gotas se equilibraron frente a 500  $\mu$ l de líquido madre.

El seguimiento de las placas de gota colgante se realizó con una lupa de 40-100 aumentos, tomando imágenes con una cámara Lexus. Para el seguimiento de las placas de gota sentada se utilizó la estación Formulatrix donde se almacenan las placas en condiciones óptimas de temperatura y son fotografiadas periódicamente por el módulo Rock imager.

Los cristales que alcanzaron un tamaño y calidad adecuados fueron recogidos en loops proporcionales a su tamaño y sumergidos en una disolución crioprotectora. Se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron en un dewar. Posteriormente se difractaron en el sincrotrón ALBA en Barcelona en la línea 13 (XALOC).

### **3.1.1 hFADS 2**

Con el dominio C terminal de la proteína hFADS\_2 se comenzaron los experimentos de cristalización con una concentración de proteína de 65,6  $\mu$ M en tampón 40 mM en HEPES pH 7,5 y 5 mM en  $\beta$ -mercaptoetanol. La mitad de la preparación se mezcló con FAD dado que la proteína pura contiene un 80% de sus moléculas ocupadas con FAD. De esta manera se favorece la homogeneidad de la población de moléculas. Se usaron los Screens comerciales JBScreen Basic HTS, JBScreenClassic HTS I, PEGSalt (Jena Bioscience), JCSG+, StructureScreen I+II, ProPlex, Midas y Pact-premier (Molecular Dimensions), de 96 condiciones diferentes cada uno.

Se optimizaron las condiciones iniciales identificadas en las placas de gota sentada, en placas de gota colgante usando proporciones de 1:1, 1:2 y 2:1 (líquido madre: proteína en  $\mu$ l) usando como líquidos madre variantes de la condición 2 % w/v de PEG 8K y 1 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  donde se cambiaron las concentraciones de PEG 8K entre el 1,6 % y el 2,6 % y de  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  entre el 0,6 M y el 1,5 M.

Para optimizar el crecimiento de microcristales se preparó la condición 2 % w/v de PEG 8K y 1,2 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . De la gota con la condición 2 % w/v de PEG 8K y 1,35 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  se tomaron pequeños cristales con el pelo de gato y se pasaron a otras gotas con menor concentración de agente precipitante de manera secuencial.

Se probó también si utilizando otro tampón (20 mM Tris pH 8,0 con DTT 1 mM) y 23,1  $\mu$ M de proteína en la condición 0,1 M HEPES pH 7,5 y 1,5 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  se mejoraba la cristalización.

### **3.1.2 XacFPR**

Para la cristalización de la XacFPR se utilizó la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporciones 1:1, 1:2, 2:1, 2:2, 2:4 y 4:2 (líquido madre: proteína en  $\mu$ l) y con unas concentraciones iniciales de proteína de 31,93 mg/ml y 20,0 mg/ml en

tampón 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl y líquido madre 4,3 M NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5<sup>16</sup>.

La cristalización de la XacFPR conjuntamente con el inhibidor o NADP<sup>+</sup>, se llevó a cabo utilizando dos aproximaciones:

(i) Se prepararon soluciones del inhibidor de la XacFPR a 50 mM en DMSO (100%) y de NADP<sup>+</sup> a 20 mM y se añadieron distintos volúmenes de estos compuestos (de D5: 0,1, 0,2 y 0,5 µl; de NADP<sup>+</sup>: 0,25 y 0,5 µl) directamente sobre las gotas que contenían los cristales de XacFPR para promover su difusión dentro de la estructura cristalina. Alternativamente se añadió una punta de espátula de D5 y NADP<sup>+</sup> en polvo sobre la gota y se dejó difundir a tiempos diferentes. Después los cristales se congelaron para su posterior difracción.

(ii) La cocrystalización de la XacFPR con el inhibidor se realizó en gotas con proporciones 1:2:0,5, 1:2:1 y 0,5:1:1 (líquido madre: proteína: inhibidor en µl) con una concentración inicial de proteína de 20,0 mg/ml en tampón 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, usando como líquido madre 4,3 M NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 e inhibidor preparado a 50 mM en DMSO.

### **3.1.3 hRFK**

Para la proteína hRFK los primeros experimentos se realizaron con una concentración de proteína de 35,2 mg/ml en tampón Tris 50:8, 300 mM NaCl, 2 mM DTT. Se probó en presencia y ausencia de MgCl<sub>2</sub> ya que el catión Mg<sup>2+</sup> se utiliza en el mecanismo de catálisis de la hRFK y puede tener un efecto estabilizante de la misma. Se usaron los Screens comerciales JBScreen Basic HTS, JBScreenClassic HTS I, PEGSalt (Jena Bioscience), JCSG+ y StructureScreen I+II (Molecular Dimensions).

Se optimizaron las condiciones previamente obtenidas en placas de gota colgante usando proporciones de 1:1, 1:2 y 2:1 (líquido madre: proteína en µl) con una concentración inicial de proteína de 35,2 mg/ml en tampón Tris 50:8, 300 mM NaCl, 2 mM DTT y líquido madre que contenía HEPES 0,1 M pH 7,5, 10 % w/v PEG 8K y 0,2 M acetato de calcio (condición G2 del Screen Classic). Se probó de nuevo en la ausencia o presencia de MgCl<sub>2</sub> (1 mol proteína: 2 moles de MgCl<sub>2</sub>).

### **3.1.4 Especies mutantes de la proteína hAIF**

Para cristalizar **el mutante W483G de la proteína hAIF**, se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporción 1:1 (líquido madre: proteína en µl) partiendo de una solución de proteína a 10 mg/ml en tampón Tris 50:8, 0,15 M NaCl y los líquidos madre indicados en la **tabla 1**.

**Tabla 1:** líquidos madre usados para la cristalización de hAIF<sub>W483G</sub>

14 % w/v PEG 8K, 5 mM DTT, 100 mM Tris pH 8,0
16 % w/v PEG 8K, 5 mM DTT, 100 mM Tris pH 8,0
18 % w/v PEG 8K, 5 mM DTT, 100 mM Tris pH 8,0
8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0

Se probó también la proteína a 5,1 mg/ml en tampón  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 8,0 con el líquido madre 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 y una proporción de 1:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ).

Se optimizó esta condición probando los líquidos madre indicados en la **tabla 2**.

**Tabla 2:** líquidos madre usados para la cristalización de hAIF<sub>W483G</sub>

8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0
10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0
18 % w/v PEG 4K, 0,2 M $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5

Se realizaron experimentos de microsiembra con gotas que contenían la misma concentración de enzima y se utilizó un líquido madre que contenía 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0.

Para cristalizar **el mutante W483Y de la proteína hAIF**, se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporción 1:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ) partiendo de una solución de proteína a 6,55 mg/ml en tampón  $\text{KPO}_4$  10 mM pH 8,0 y líquido madre 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0.

Para optimizar las condiciones se probaron los líquidos madre indicados en la **tabla 3**.

**Tabla 3:** líquidos madre usados para la cristalización de hAIF<sub>W483Y</sub>

8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0
10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0
18 % w/v PEG 4K, 0,2 M $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5

Se realizaron experimentos de microsiembra con gotas que contenían la misma concentración de enzima y se utilizó un líquido madre que contenía 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0.

Para cristalizar **el mutante W483L de la proteína hAIF**, se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporción 1:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ) partiendo de dos disoluciones de proteína (a 1,9 mg/ml en tampón  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 8,0 y a 1,1 mg/ml en el mismo tampón) y líquido madre 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0.

Para cristalizar **el complejo del mutante E413A/R422A/R430A de la proteína hAIF con NADH** se redujo la proteína con 18 mM de NADH en cámara de anaerobiosis, lo que provocó un cambio de color de la hAIF de amarillo a incoloro. Se utilizó el método de difusión de vapor en gota colgante. Las gotas se prepararon en proporción 1:1, 1:2 y 2:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ) partiendo de dos soluciones de proteína (a 12,4 mg/ml en tampón  $\text{KPO}_4$  10 mM, pH 8,0 y a 10 mg/ml en tampón 20 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,015 M NaCl y 10 % glicerol) probando los líquidos madre indicados en la **tabla 4**. La incubación de las gotas en las placas se realizó también en el interior de la cámara de anaerobiosis.

**Tabla 4:** líquidos madre usados para la cristalización del mutante triple de hAIF.

16 % w/v PEG 4K, 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5
18 % w/v PEG 4K, 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5
20 % w/v PEG 4K, 0,2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 M Tris-HCl pH 8,5

### **3.2. Procesado y refinamiento de datos de difracción de rayos X**

Los datos obtenidos de la difracción de rayos X de los cristales de los cristales de XacFPR con inhibidor o NADP<sup>+</sup> se procesaron con CCP4<sup>19</sup> (Collaborative Computational Project No. 4) y WinCOOT<sup>28</sup>. CCP4 es un conjunto de programas utilizado para la resolución de estructuras a partir de datos de difracción de rayos X. Dentro de CCP4 se usaron los programas Scala<sup>21</sup>, MolRep<sup>22</sup> y Refmac5<sup>20</sup>.

El procesamiento de los datos de difracción comienza con la etapa de escalado. Dado que durante el experimento de difracción puede haber variaciones en la fuente, la temperatura o el desgaste del propio cristal hay que normalizar las intensidades y reducir los datos a la unidad asimétrica. Durante el escalado se obtienen parámetros estadísticos que permiten evaluar la calidad de los datos de difracción en función de la resolución:

**Multiplicidad:** 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.

**Completitud:** Indica el porcentaje del patrón de difracción que se ha recogido. Es necesario que la completitud global de los datos supere el 90% para una correcta resolución de la estructura.

**I/σ:** Representa la relación de la intensidad con respecto al ruido y se aceptan valores por encima de 2.

Posteriormente se calculan los módulos de los factores de estructura, cuyo cuadrado es proporcional a la intensidad de los rayos difractados y recogidos en el detector. A partir de las posiciones atómicas conocidas dadas por el remplazo molecular, se pueden obtener los módulos de factores de estructura y las fases calculadas,  $|F_c(hkl)|$  y  $\Phi_c(hkl)$ , y con estos se obtiene una densidad electrónica interpretable.

Partiendo de esta densidad electrónica se construye un modelo de estructura de la proteína. Se comienza ajustando la proteína dentro de la densidad y partiendo de aquí se realizan ciclos de refinado matemático (REFMAC5) y de refinado manual (COOT). Mediante el refinamiento matemático se "mueven" ligeramente las posiciones atómicas y se aplican factores térmicos a cada átomo de tal modo que el patrón de difracción calculado con dicho modelo sea prácticamente igual que el experimental, minimizándose las diferencias entre los factores de estructura observados y calculados. Para asegurar que los cambios que se realizan durante cada etapa son representativos del modelo real, se hace uso del Rfree, el cual se calcula excluyendo un 5 % de las reflexiones durante el refinado. Si este factor Rfree disminuye durante un ciclo de refinamiento, significa que hemos mejorado las fases calculadas.

Entre los ciclos de refinamiento matemático se llevan a cabo refinamientos manuales, en los que se ajustan cadenas laterales, las regiones peor resueltas y la localización de ligandos en caso de haberlos.

El proceso de refinado concluye cuando el modelo estructural se ajusta a la densidad electrónica, no hay densidad electrónica sin explicar y los valores de R y Rfree son adecuados (Rfree < 30%, R < 25%)<sup>14</sup>.

### **3.3. Predicción estructural de la FAD sintetasa humana**

Debido a que la estructura tridimensional de la hFADS\_2 no se conoce todavía, se realizó una predicción de la misma usando los servidores **GENO 3D**<sup>25</sup>, **SwissModel**<sup>23</sup> y **RaptorX**<sup>24</sup>. Estos servidores buscan proteínas con elevado grado de homología en secuencia con la de hFADS\_2, y de las que se conoce su estructura tridimensional, y seguidamente las toman como modelos en los que basan la predicción. Para contrastar las proteínas modelo que ofrecían los servidores se hizo una búsqueda de secuencias similares a la de la hFADS\_2 en EXPASY<sup>26</sup> con la herramienta BLAST, escogiendo como base de datos el Protein Data Bank<sup>27</sup>. Después se realizó un alineamiento de secuencias mediante el programa ClustalW para comparar la homología entre las secuencias de los modelos y la hFADS\_2.

### **3.4. Microscopia de fuerzas atómicas**

Para la preparación de muestras de AFM se cortó una porción de mica muscovita (Electron Microscopy Sciences) de aproximadamente 1x1 cm. La porción de mica se exfolió con cinta adhesiva para conseguir que mostrara sus grupos O<sup>-</sup> a la superficie y se colocó en un pocillo de una placa de seis (Nunclon) con la cara exfoliada hacia arriba, y sujeta al fondo con grasa de vacío.

Sobre la superficie de mica, nanométricamente plana, y por tanto idónea para visualizar moléculas pequeñas como las proteínas, se añadieron aproximadamente 100 µl de solución de proteína y se dejaron incubar 15 min. Estas soluciones de proteína contenían una concentración 500 nM y 162 nM del dominio C terminal de hFADS2 en tampón de 40 mM en HEPES pH 6 y 5 mM β-mercaptoetanol en ausencia y en presencia de Mg<sup>2+</sup> (1 mol proteína: 4 moles Mg<sup>2+</sup>). Pasado este tiempo la muestra se lavó con 3 ml del mismo tampón en el que está disuelta la proteína y se desechó después este tampón de lavado. El lavado se repitió tres veces y posteriormente se cubrió la muestra con tampón para evitar que se secase antes de colocarla en el equipo.

En las medidas realizadas en el microscopio de fuerzas atómicas MultiMode 8 (Bruker) se eligieron las puntas ultra-afiladas con un radio final de 2 nm, de tipo MSNL (Bruker Probes), en concreto las puntas C, D y E, con frecuencias de resonancia 7, 15 y 38 kHz, respectivamente; el piezoeléctrico para muestras en líquido (E), y como modo de medida el tapping, poco intrusivo para biomoléculas.

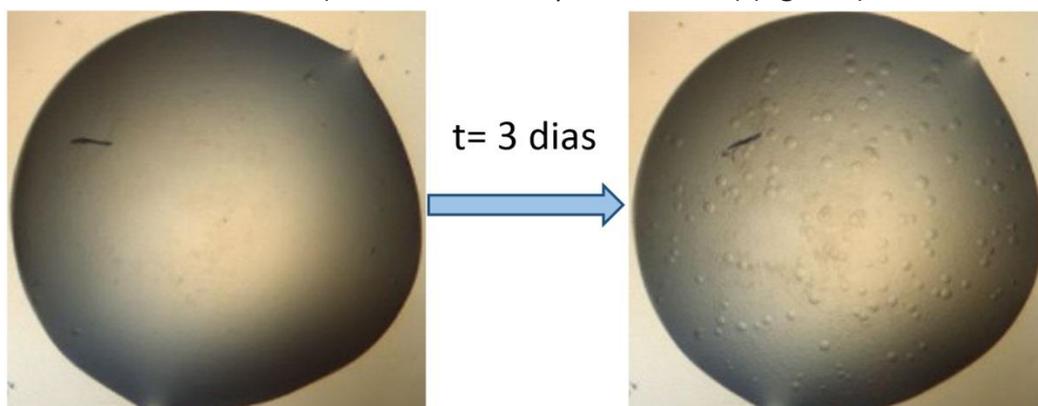
Las imágenes obtenidas se procesaron después con el programa WSxM<sup>18</sup>.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Estudios estructurales en hFADS\_2

#### 4.1.1. Cristalografía

Al cabo de 3 días, en las gotas sentadas del dominio C terminal de la proteína hFADS\_2 con las condiciones de los Screens comerciales, se observó la aparición de separación de fases en la condición D2 del Screen Basic (2 % w/v de PEG8K y 1 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) (**Figura 5**).



**Figura 5:** imágenes de gota sentada del dominio C terminal de la proteína hFADS\_2 en las condiciones 2 % w/v de PEG 8K y 1 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  donde se observa la aparición de la separación de fases.

Esta condición se optimizó en placas de gota colgante donde se observó la aparición de microcristales (**Figura 6**).



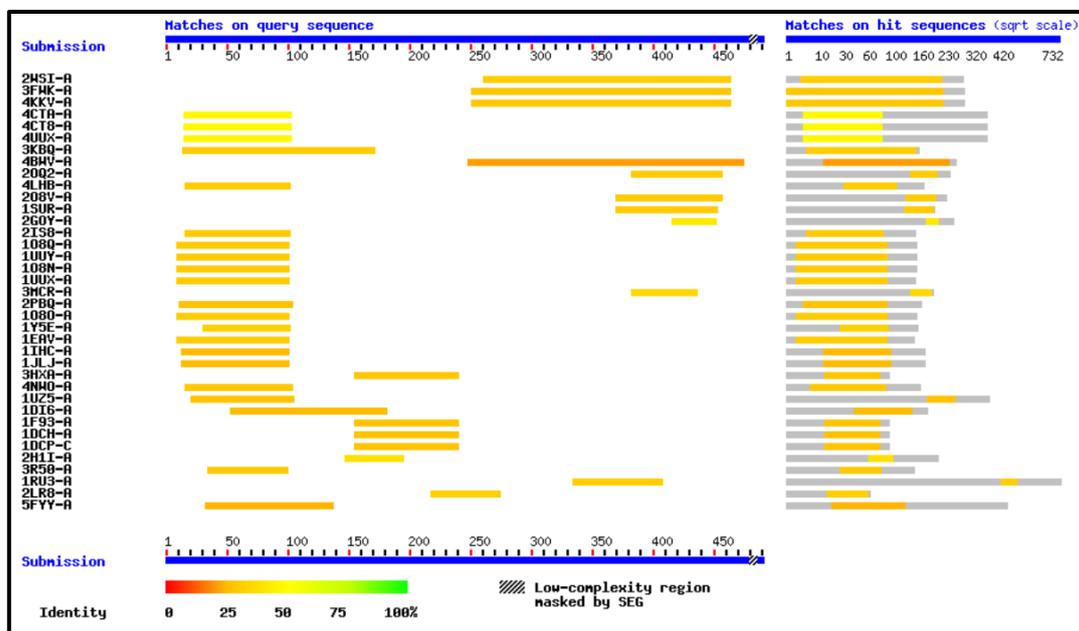
**Figura 6:** imágenes de gota colgante donde se observan microcristales del dominio C terminal de la proteína hFADS\_2 en las condiciones (A) 1,6 % w/v de PEG 8K y 1 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  en proporciones 1:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ) y (B) 2 % w/v de PEG 8K y 0,8 M en  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  en proporciones 2:1 (líquido madre: proteína en  $\mu\text{l}$ ).

Para optimizar el crecimiento de los microcristales se realizaron experimentos de microsiembra no consiguiendo mejora de los mismos tras varias semanas de incubación.

Tampoco se observó durante ese mismo periodo de tiempo crecimiento de cristales en el tampón 1 mM en DTT, 20 mM Tris pH 8,0.

#### 4.1.2. Predicción de la estructura tridimensional

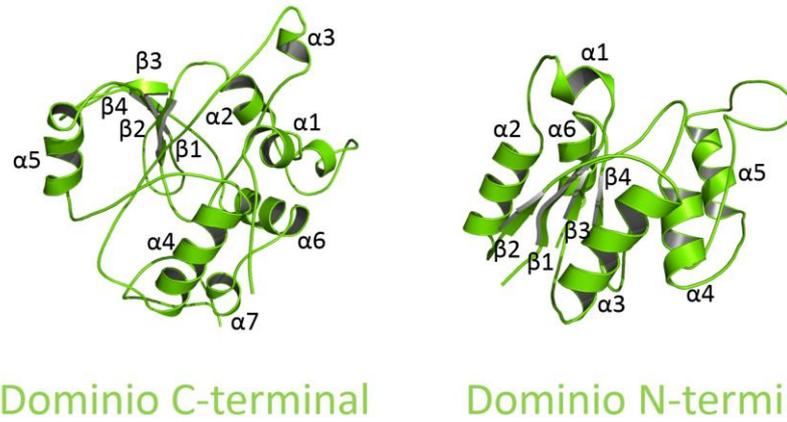
La búsqueda en BLAST de secuencias parecidas a la de la hFADS\_2 proporcionó los siguientes resultados (Figura 7).



**Figura 7:** Resultados de coincidencias de secuencia usando BLAST. A la izquierda se muestran los códigos PDB de las proteínas modelo y en el centro las zonas de su secuencia que coinciden con las de la hFADS\_2.

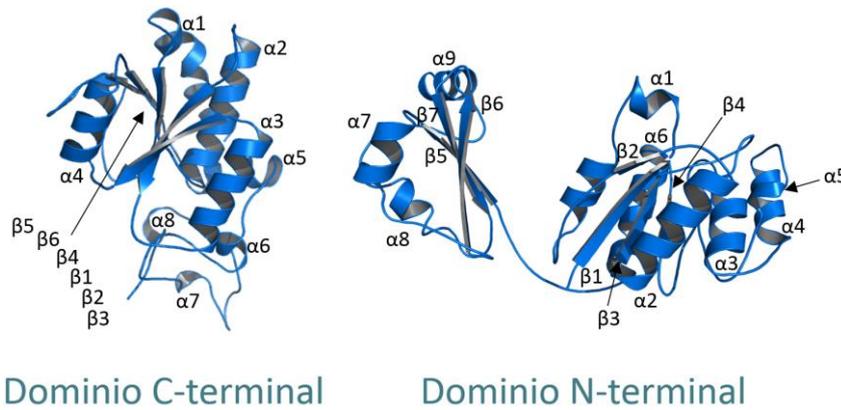
Dado que no hay proteínas similares en secuencia que cubran toda la secuencia de la hFADS\_2, se seleccionaron modelos para cada uno de los dominios: *S. cerevisiae* FAD sintasa (PDB: 2WSI) y *C. glabrata* FMN adeniltransferasa (PDB: 3FWK) para el dominio C terminal, y para el dominio N-terminal la *T. acidophilum* CinA (PDB: 3KBQ).

La estructura predicha para el dominio C terminal por el servidor **GENO 3D** muestra un plegamiento con contenido en estructura secundaria significativo, caracterizada por un núcleo formado por 4 láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por 7 hélices  $\alpha$ , 2 de las cuales muestran ejes prácticamente paralelos ( $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ ). Para el dominio N terminal se obtiene un plegamiento del mismo tipo donde hay 4 láminas  $\beta$  como núcleo rodeadas por 6 hélices  $\alpha$ , 5 de ellas con ejes prácticamente paralelos ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$ ) (Figura 8).



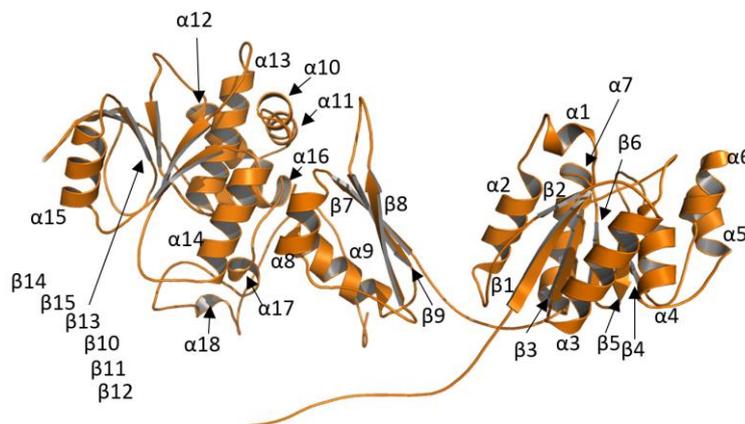
**Figura 8:** Predicción generada por el servidor **GENO 3D** representada en cintas color verde.

El servidor **SwissModel** predice para el dominio C terminal un plegamiento similar, con un núcleo formado por 6 láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por 8 hélices  $\alpha$ , mostrando  $\alpha 2$   $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  ejes paralelos. Para el dominio N terminal se obtiene un plegamiento con 4 láminas  $\beta$  como núcleo rodeadas por hélices  $\alpha$ , mostrando  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  ejes paralelos. Este servidor predice una zona interdominios formada por 3 láminas  $\beta$  paralelas y 3 hélices  $\alpha$  (**Figura 9**).



**Figura 9:** Predicción generada por el servidor **SwissModel** representada en cintas color azul.

Con el servidor **Raptor X** se usaron las mismas proteínas y además *T. thermophilus* CinA (PDB: 4CT8) dado que este servidor proponía esta proteína con gran similitud con el dominio N terminal. Este servidor permitió obtener un modelo estructural completo de la hFADS<sub>2</sub> (**Figura 10**).



**Figura 10:** Predicción generada por el servidor **RaptorX** representada en cintas color naranja.

El dominio C terminal predicho por el servidor **RaptorX** muestra un plegamiento consistente en un núcleo formado por 6 láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por 9 hélices  $\alpha$ , mostrando  $\alpha$ 13,  $\alpha$ 14 y  $\alpha$ 15 ejes paralelos y para el dominio N terminal la predicción muestra un plegamiento del mismo tipo donde hay 6 láminas  $\beta$  como núcleo rodeadas por 7 hélices  $\alpha$ , 6 de ellas con ejes prácticamente paralelos ( $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6 y  $\alpha$ 7). Este servidor predice una zona interdominios formada por 3 láminas  $\beta$  paralelas y 2 hélices  $\alpha$ .

Comparando las tres predicciones obtenidas se observa un mayor porcentaje de estructura secundaria predicha por el servidor **RaptorX** que por los servidores **SwissModel** y el **GENO 3D**, siendo este último el que predice menor contenido en estructura secundaria (**tabla 5**).

**Tabla 5:** Porcentajes de estructura secundaria por dominio y servidor

Servidor	Hélices $\alpha$ (%)		Laminas $\beta$ (%)		Otros (%)		Zona interdominios
	Nterm.	Cterm.	Nterm.	Cterm.	Nterm.	Cterm.	
GENO 3D	32,7	25,5	10,1	8,5	57,2	66,0	No
SwissModel	36,5	34,0	18,9	9,0	44,6	57,0	Si, unido al N-terminal.
RaptorX	40,3	37,3	22,0	14,6	37,7	48,1	Si

A pesar de las diferencias, en los tres casos se predicen estructuras ricas en hélices alfa y láminas beta en porcentajes variables y tienen una buena similitud como se observa en la superposición de las predicciones (**Figura 11**). Los servidores que incluyeron la zona interdominios en su predicción fueron **RaptorX** y **SwissModel**, y tienen gran similitud entre si excepto por la hélice  $\alpha$ 9 predicha por el servidor **SwissModel**.

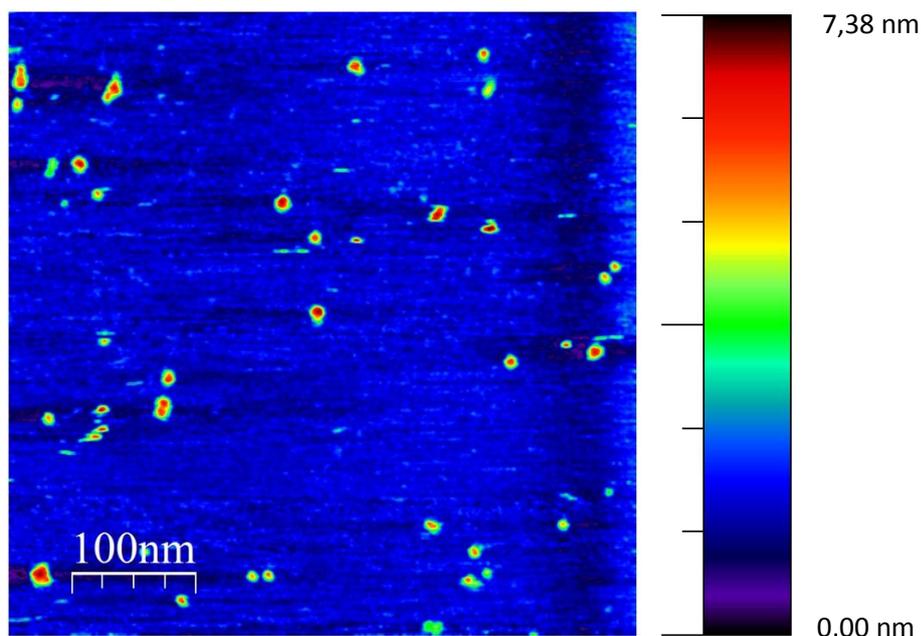


**Figura 11:** Superposición de las predicciones generadas por los servidores **GENO 3D** (verde), **SwissModel** (azul) y **RaptorX** (naranja) donde se observa una gran similitud en las estructuras.

#### 4.1.3. Estudios morfológicos mediante AFM

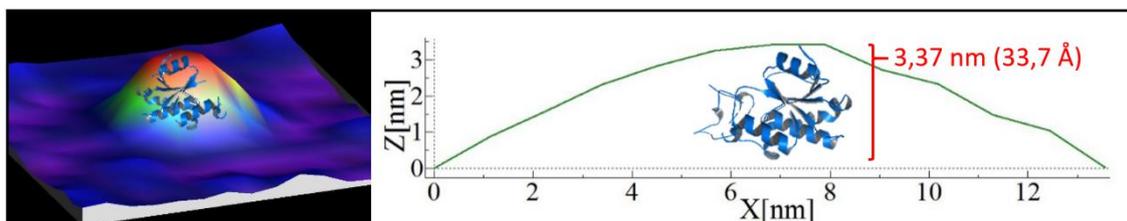
Para llevar a cabo el estudio morfológico del dominio C terminal de la proteína hFADS\_2, ésta se inmovilizó sobre mica. En las muestras de 500 nM se observó una población de proteínas que dificultaba su estudio de manera individual y se decidió disminuir la concentración de proteína a 162 nM en las mismas condiciones (**Figura 12**). Se comprobó que  $Mg^{2+}$  no promovía la inmovilización de la proteína sino que alteraba ligeramente las medidas, por lo que se tomó

como óptima la condición 162 nM hFADS, en 40 mM HEPES pH 6,0 y 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol en ausencia de  $Mg^{2+}$ .

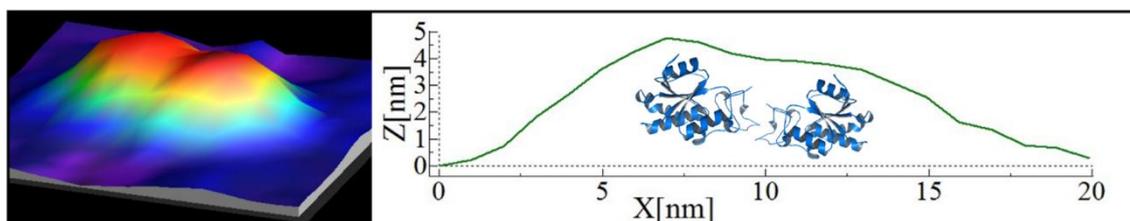


**Figura 12:** Imagen topográfica 2D de AFM de una muestra de 162 nM C-terminal hFADS\_2 en las condiciones óptimas de análisis con la escala de colores según la altura.

De las imágenes en estas condiciones se calculó un 34 % de dimerización de la proteína y se observó una altura promedio de  $3,5 \pm 0,5$  nm para el monómero (**Figura 13**) y  $5,0 \pm 0,5$  nm para los picos de los dímeros (**Figura 14**) y también se observó una compactación de los dímeros. La altura encontrada para el monómero encaja con una de las dimensiones calculadas en las predicciones teóricas de la estructura tridimensional.



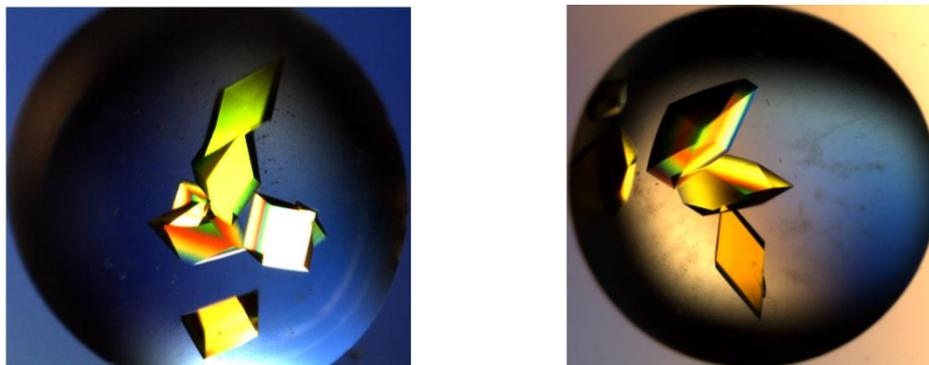
**Figura 13:** Imagen 3D de un monómero representativo y su perfil de altura, donde se compara el resultado de la predicción del dominio C terminal generada por el servidor SwissModel.



**Figura 14:** Imagen 3D de un dímero representativo y su perfil de alturas. Las moléculas de monómero representadas son meramente comparativas dado que hay compactación en las moléculas de dímero y no se conoce la orientación relativa entre monómeros.

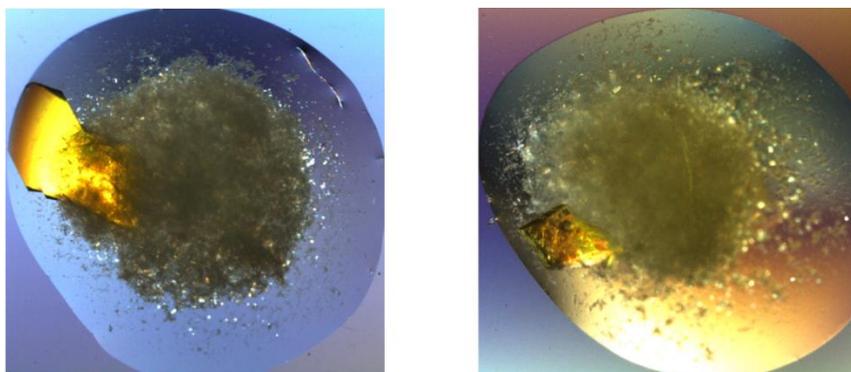
#### **4.2. Estudios estructurales en *XacFPR***

Se observó la aparición de cristales en gota colgante de la enzima *XacFPR* en la condición 4,3 M NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 al cabo de 5 días (**Figura 15**). Los cristales se reservaron para realizar pruebas de adición de volúmenes de inhibidor y NADP<sup>+</sup>.



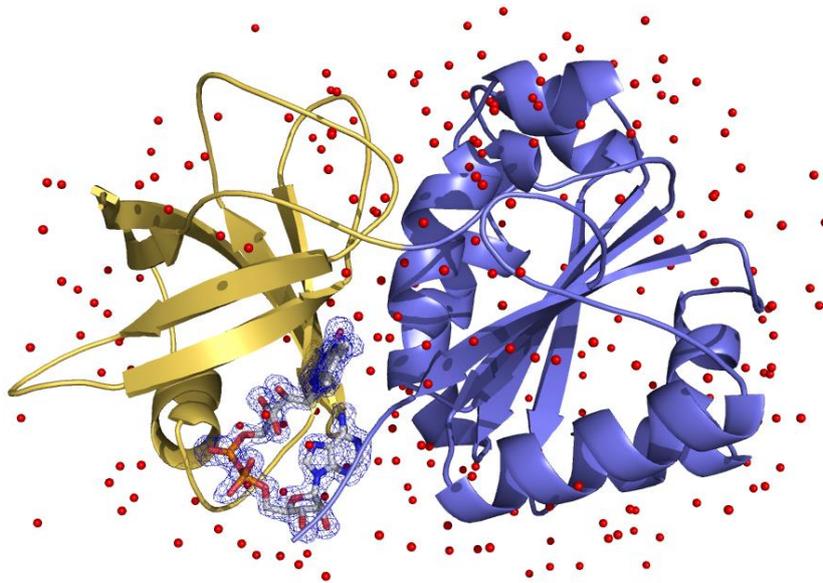
**Figura 15:** imagen de cristales de la proteína *XacFPR* en la condición 4,3 M NaCl, 100 mM HEPES pH=7,5.

En las gotas de cocrystalización se observó la aparición inmediata de un precipitado blanco, debida a la falta de miscibilidad del inhibidor en agua. Tras varias semanas se observó la aparición de cristales en las proporciones 1:2:0,5 (líquido madre: proteína: inhibidor en  $\mu$ l) (**Figura 16**). Se congelaron para su posterior difracción.



**Figura 16:** imagen de cristales de la proteína *XacFPR* en las condiciones 4,3 M NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 junto con el inhibidor en proporciones 1:2:0,5 (líquido madre: proteína: inhibidor en  $\mu$ l).

Tras resolver la estructura, no se observó densidad electrónica extra en la que encajar el inhibidor o el coenzima NADP<sup>+</sup> dentro de la estructura de la proteína (**Figura 17**).

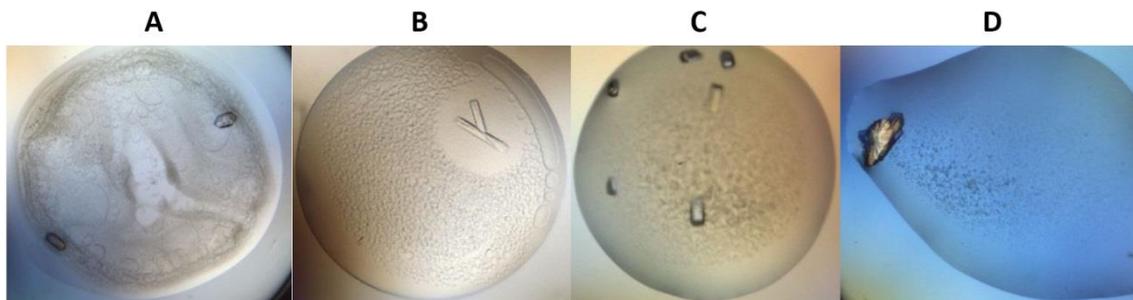


**Figura 17:** Estructura cristalográfica de *XacFPR* donde se observa el cofactor FAD (en modelo de varillas y coloreado en CPK) y las aguas de solvatación (esferas rojas).

De ello se concluye que las condiciones probadas para la cristalización conjunta de la *XacFPR* con inhibidor o NADP<sup>+</sup> no son las adecuadas y habrá que investigar otras concentraciones y/o tiempos de incubación además de probar otros cristales hasta conseguir resolver la posición de dichos ligandos en la estructura.

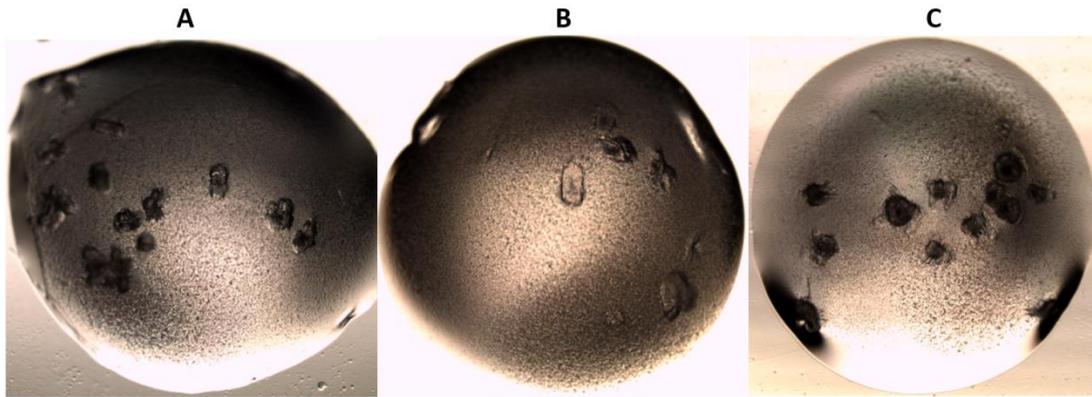
#### **4.3. Cristalización de hRFK**

Cuando se dispusieron las placas de gota sentada de la proteína hRFK se observó la aparición de cristales en varias condiciones (**Figura 18**).



**Figura 18:** imagen de cristales de la proteína hRFK en las condiciones (A) 70 % v/v 2-Metil-2,4-pentanediol y 0,1 M en HEPES pH 7,5 , (B) 0,2 M MgCl<sub>2</sub>, 3,4 M – Hexanediol, 0,1 M Tris pH 8,5 , (C) 0,1 M HEPES pH 7,5, 10 % w/v PEG 8K y 0,2 M acetato de calcio, y (D) 20 % v/v glicerol, 14,4 % w/v PEG 8K, 0,16 M acetato de calcio y 0,08 M MES pH 6,5.

Ante la posibilidad de que fueran cristales de sal (CaAc<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub>), por estar en la mayoría de condiciones en las que se encontraron cristales y por la rapidez de la aparición de los mismos, se tiñeron con azul de Coomassie que es un tinte específico para proteínas. Se comprobó que los cristales se teñían así que partiendo de estas condiciones se pasó a realizar los experimentos de optimización de condiciones en placas de gota colgante y se observó la aparición de cristales en las gotas en el mismo instante en el que se prepararon (**Figura 19**).



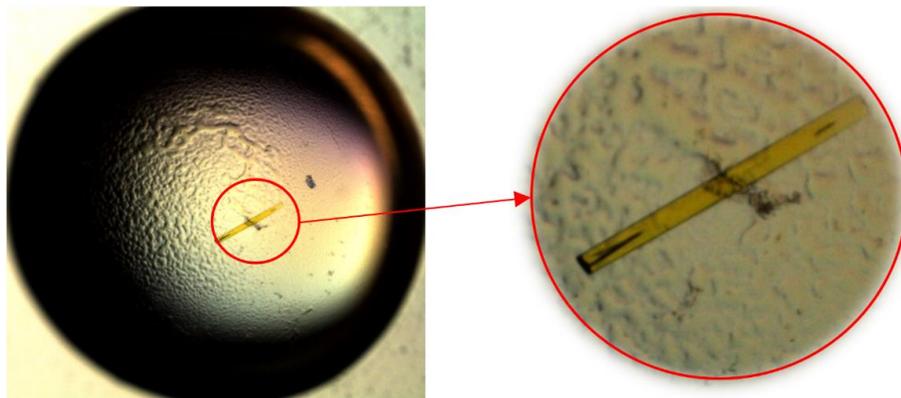
**Figura 19:** imagen de cristales de la proteína hRFK en las condiciones 0,1 M HEPES pH 7,5, 10 % w/v PEG 8K y 0,2 M acetato de calcio (A) gota en proporciones 1:1  $\mu$ l, (B) gota en proporciones 1:2  $\mu$ l en presencia de cloruro de magnesio y (C) gota en proporciones 2:1  $\mu$ l en presencia de cloruro de magnesio.

Alguno de los cristales de estas gotas han sido congelados y en breve serán difractados en la estación sincrotrón Diamond (UK).

#### 4.4. Estudios estructurales en especies mutantes de hAIF

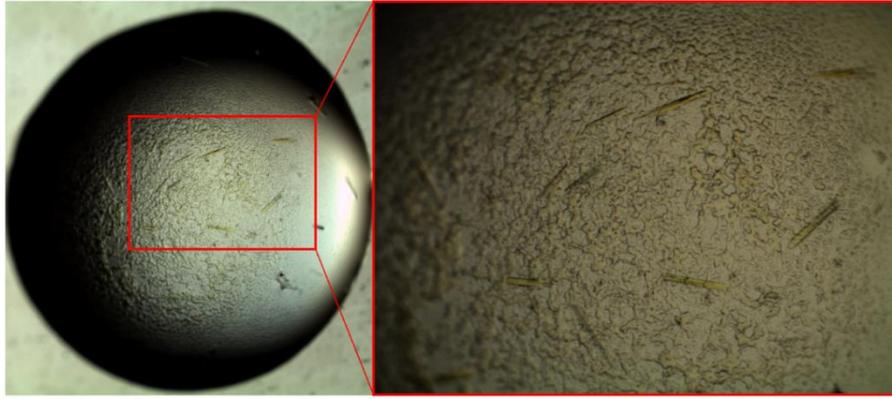
Tras varios días de incubación, se observó la aparición de precipitado en las gotas que contenían el **mutante W483G** en tampón Tris 50:8, 0,15 M NaCl y no se observó la aparición de cristales.

Cuando se probó la misma técnica con la proteína a 5,1 mg/ml en tampón  $KPO_4$  50 mM pH 8,0 con el líquido madre 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 se observó a los 6 días la aparición de un cristal monodimensional amarillo (**Figura 20**).



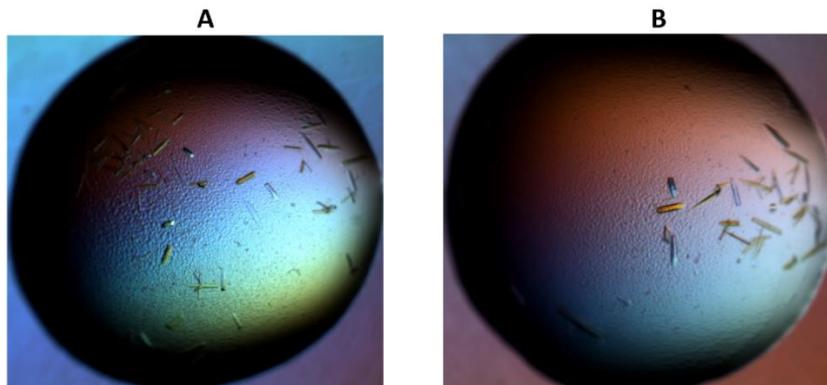
**Figura 20:** cristal monodimensional amarillo de la proteína hAIF<sub>W483G</sub> en la condición 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 (izquierda) y aumento del cristal (derecha).

Debido a la aparición de pocos cristales se optimizaron las condiciones. Se observó la aparición de un mayor número de cristales monodimensionales de menor tamaño (**Figura 21**) en la condición 10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0.



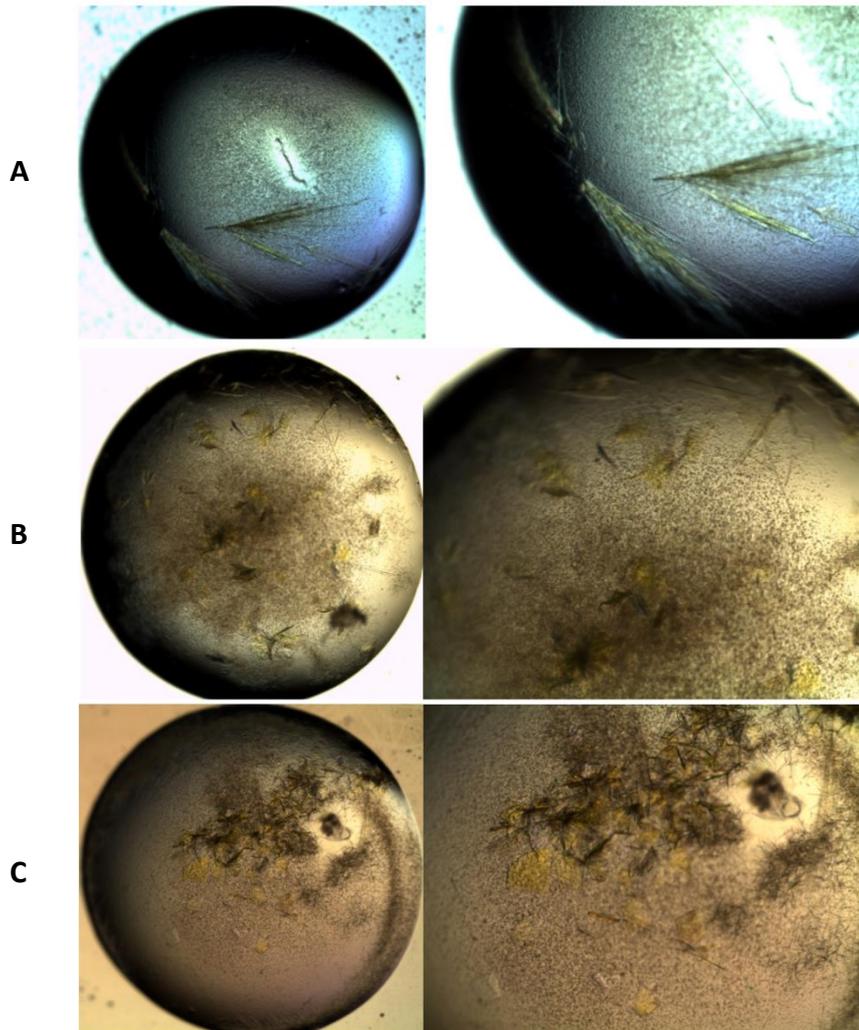
**Figura 21:** cristales monodimensionales amarillos de la proteína hAlF<sub>W483G</sub> en la condición 10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 (izquierda) y un aumento de los cristales encontrados en la gota (derecha).

En las gotas en las que se realizó la siembra se observó, tras varios días de incubación, el crecimiento de cristales tridimensionales amarillos (**Figura 22**).



**Figura 22:** imagen de cristales de la proteína hAlF<sub>W483G</sub> conseguidos mediante microsiembra en las condiciones 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 donde (A) contiene un mayor número de núcleos y (B) contiene un menor número de núcleos.

A los 6 días se observó la aparición de cristales bidimensionales (placas) en las gotas que contenían el **mutante W483Y**. Debido a que este tipo de cristales no son adecuados para difracción, se optimizaron las condiciones. Se observó la aparición de un mayor número de cristales bidimensionales de menor tamaño en la condición 10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0. En las gotas en las que se realizó la siembra se observó, tras varios días de incubación, el crecimiento de múltiples cristales bidimensionales y agrupamientos de agujas de pequeño tamaño (**Figura 23**).



**Figura 23:** (A) cristales bidimensionales amarillos de la proteína hAIF<sub>W483Y</sub> en la condición 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0, (B) cristales bidimensionales amarillos de la proteína hAIF<sub>W483Y</sub> en la condición 10 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0 y (C) imagen de cristales bidimensionales de la proteína hAIF<sub>W483Y</sub> conseguidos mediante microsiembra en las condiciones 8 % w/v PEG 8K, 0,1 M imidazol, pH 8,0. A la derecha de cada imagen se puede observar un aumento de los cristales encontrados en esa condición.

Tras varias semanas de incubación no se observó la aparición de cristales o de precipitado en las gotas que contenían el **mutante W483L**.

La aparición de cristales en condiciones anaeróbicas **del complejo E413A/R422A/R430A hAIF: NADH** se observó a los 35 días de incubación. En breve se congelarán dentro de la cámara de anaerobiosis y serán difractados en el sincrotrón Diamond (UK).

## 5. Conclusiones

- Se ha predicho la estructura tridimensional de la proteína hFADS\_2 mediante tres servidores.
- El estudio morfológico mediante AFM del dominio C terminal de hFADS\_2 muestra una altura para el monómero de  $3,5 \pm 0,5$  nm, que coincide con las dimensiones de la estructura predicha para dicho dominio y un porcentaje de dimerización de la proteína de 34 % con picos internos de  $5,0 \pm 0,5$  nm y  $4,0 \pm 0,5$  nm para los dímeros.
- Se ha resuelto la estructura de la proteína *XacFPR* a partir de datos de difracción de rayos X pero no se han localizado en la misma inhibidor o coenzima.
- Se ha avanzado en la optimización de las condiciones de cristalización de las proteínas hRFK, el dominio C terminal de la proteína hFADS\_2, especies mutantes de la proteína hAIF y el complejo E413A/R422A/R430A hAIF: NADH.

## **6. Bibliografía:**

- [1] Beatriz Herguedas, Marta Martínez-Júlvez, Susana Frago, Milagros Medina y Juan A. Hermoso (2009). *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of FAD synthetase from Corynebacterium ammoniagenes*. Structural Biology and Crystallization Communications ISSN 1744-3091.
- [2] Maria Barile, Teresa Anna Giancaspero, Piero Leone, Michele Galluccio y Cesare Indiveri (2016). *Riboflavin transport and metabolism in humans*. J Inherit Metab Dis (2016) 39:545–557.
- [3] Philip R. Evans y Garib N. Murshudov (2013). *How good are my data and what is the resolution?* Biological Crystallography ISSN 0907-4449.
- [4] Susana Frago, Marta Martínez Júlvez, Ana Serrano y Milagros Medina. (2008). *Structural analysis of FAD synthetase from Corynebacterium ammoniagenes*. BMC Microbiology 2008, 8:160.
- [5] Chris A. Brosey, Chris Ho, Winnie Z. Long, Gregory R. Bowman, Tom Ellenberger y John A. Tainer, (2016). *Defining NADH-Driven Allostery Regulating Apoptosis-Inducing Factor*. Structure.
- [6] Carlos Marcuello, Sonia Arilla Luna, Milagros Medina y Anabel Lostao (2013). *Detection of a quaternary organization into dimer of trimers of Corynebacterium ammoniagenes FAD synthetase at the single-molecule level and at the in cell level*. Biochimica et Biophysica Acta 1834 (2013) 665–676.
- [7] Patricia Ferreira, Raquel Villanueva, Marta Martínez Júlvez, Beatriz Herguedas, Carlos Marcuello, Patricio Fernández Silva, Lauriane Cabon, Juan A. Hermoso, Anabel Lostao, Santos A. Susin, y Milagros Medina (2014). *Structural Insights into the Coenzyme Mediated Monomer–Dimer Transition of the Pro-Apoptotic Apoptosis Inducing Factor*. Biochemistry 2014, 53, 4204–4215.
- [8] Subramanian Karthikeyan, Qingxian Zhou, Faika Msee, Nick V. Grishin, Andrei L. Osterman, y Hong Zhang, (2013). *Crystal Structure of Human Riboflavin Kinase Reveals a  $\beta$  Barrel Fold and a Novel Active Site Arch*. Structure, Vol. 11, 265–273, March, 2003.
- [9] Annette Faust, Santosh Panjikar, Uwe Mueller, Venkataraman Parthasarathy, Andrea Schmidt, Victor S. Lamzin y Manfred S. Weiss (2008). *A tutorial for learning and teaching macromolecular crystallography*. Applied Crystallography ISSN 0021-8898.
- [10] Alessandro S Nascimento, Daniela L Catalano-Dupuy, Amanda Bernardes, Mario de Oliveira Neto, María Auxiliadora M Santos, Eduardo A Ceccarelli y Igor Polikarpov (2007). *Crystal structures of Leptospira interrogans FAD-containing ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and its complex with NADP<sup>+</sup>*. BMC Structural Biology 2007, 7:69.

- [11] Hong Ye, Celine Cande, Nicolas C. Stephanou, Sulin Jiang, Sundeep Gurbuxani, Nathanael Larochette, Eric Daugas, Carmen Garrido, Guido Kroemer y Hao Wu (2002). *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor*. Nature structural biology, volumen 9 numero 9, septiembre 2002.
- [12] Enza M. Torchetti, Francesco Bonomi, Michele Galluccio, Elisabetta Gianazza, Teresa A. Giancaspero, Stefania Iametti, Cesare Indiveri y Maria Barile (2011). *Human FAD synthase (isoform 2): a component of the machinery that delivers FAD to apo-flavoproteins*. FEBS Journal 278 (2011) 4435–4449.
- [13] Subramanian Karthikeyan, Qingxian Zhou, Andrei L. Osterman y Hong Zhang (2003). *Ligand Binding-Induced Conformational Changes in Riboflavin Kinase: Structural Basis for the Ordered Mechanism*. Biochemistry 2003, 42, 12532-12538.
- [14] Alexander Wlodawer, Wladek Minor, Zbigniew Dauter y Mariusz Jaskolski (2007). *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures*. FEBS Journal 275 (2008) 1–21.
- [15] Teresa Anna Giancaspero, Michele Galluccio, Angelica Miccolis, Piero Leone, Ivano Eberini, Stefania Iametti, Cesare Indiveri y Maria Barile (2015). *Human FAD synthase is a bi-functional enzyme with a FAD hydrolase activity in the molybdopterin binding domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications 465 (2015) 443 e 449.
- [16] María Laura Tondo, Ramon Hurtado Guerrero, Eduardo A. Ceccarelli, Milagros Medina, Elena G. Orellano, y Marta Martínez Júlvez (2013) *Crystal Structure of the FAD-Containing Ferredoxin-NADP+ Reductase from the Plant Pathogen Xanthomonas axonopodis pv. Citri* Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 906572.
- [17] Nicolas Leulliot, Karine Blondeau, Jenny Keller, Nathalie Ulryck, Sophie Quevillon-Cheruel y Herman van Tilbeurgh (2010). *Crystal Structure of Yeast FAD Synthetase (Fad1) in Complex with FAD*. J. Mol. Biol. (2010) 398, 641–646.
- [18] I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez Herrero y A. M. Baro. (2007) *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments 78, 1, 013705 (2007).
- [19] M. D. Winn. (2011) *Overview of the CCP4 suite and current developments*. D67, 235-242 (2011) International Union of Crystallography
- [20] G. Murshudov, A.Vagin y E.Dodson, (1996) *Application of Maximum Likelihood Refinement* (1996) in the Refinement of Protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend.
- [21] P.R.Evans, (1993) *Data reduction*, Proceedings of CCP4 Study Weekend, on Data Collection & Processing, pages 114-122 (1993).

- [22] A.Vagin y A.Teplyakov (1997) *MOLREP: an automated program for molecular replacement*. *J. Appl. Cryst.* (1997) 30, 1022-1025.
- [23] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L y Schwede T (2014). *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*. *Nucleic Acids Research* 2014 (1 Julio 2014) 42 (W1): W252-W258
- [24] Jian Peng y Jinbo Xu. (2011) *A multiple-template approach to protein threading*. *PROTEINS*, 2011.
- [25] Combet, C., Jambon, M., Deléage, G. y Geourjon, C. (2002) *Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein*, *Bioinformatics*, 2002, 18, 213-214
- [26] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, y Stockinger H. (2012) *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*, *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603, 2012.
- [27] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov y P.E. Bourne. (2000) *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
- [28] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott y K. Cowtan (2010) *Features and development of Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* ISSN 0907-4449.