



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Relación estructura función en FAD sintetasas de
origen procariótico

Autor/es

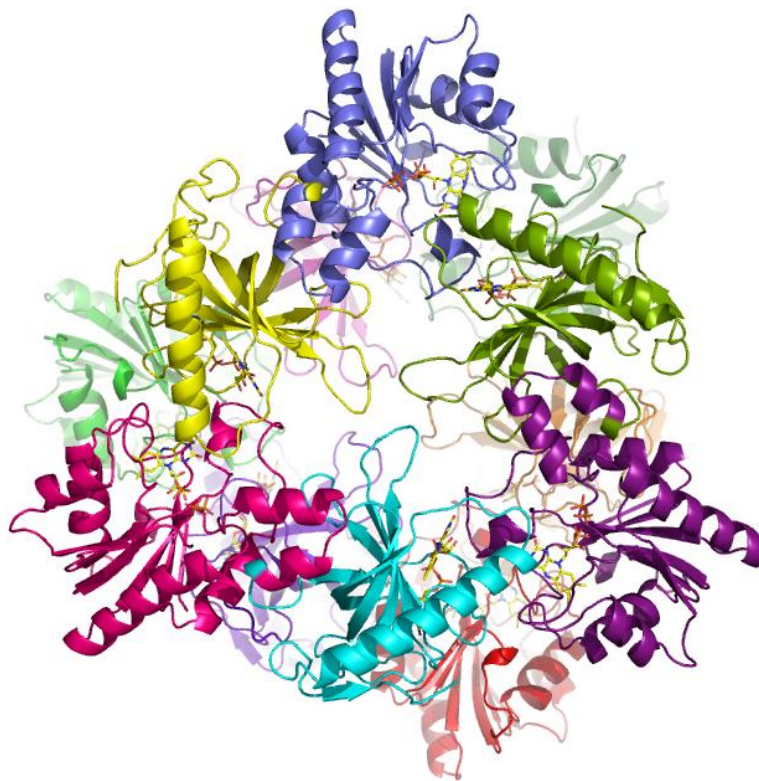
Silvia Baquedano Coarasa

Director/es

Milagros Medina Trullenque
Ana Serrano Esteban

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza
2012

Relación estructura función en FAD Sintetasas de origen procariótico



Silvia Baquedano Coarasa

Máster en Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

2012



Universidad
Zaragoza

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PROYECTO MÁSTER

**RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN EN FAD
SINTETASAS DE ORIGEN PROCARIÓTICO**

Memoria presentada por SILVIA BAQUEDANO COARASA
bajo la dirección de la Dra. MILAGROS MEDINA TRULLENQUE Y
la Dra. ANA SERRANO ESTEBAN

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

ZARAGOZA, JUNIO DE 2012



**Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**
Universidad Zaragoza

Dr Milagros Medina
Facultad de Ciencias
50009-Zaragoza
Tel (34)-976762476
Fax (34)-976762123
email: mmedina@unizar.es

Las Dras. Milagros Medina Trullenque, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, Ana Serrano Esteban, investigador del citado Departamento,

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster “ RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN EN FAD SINTETASAS DE ORIGEN PROCARIÓTICO” ha sido realizado por la licenciada Silvia Baquedano bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos, Universidad de Zaragoza, y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para ser defendido y optar al Título de Máster en Investigación en Biología Molecular y Celular por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Junio 2012

Fdo: Dr. MILAGROS MEDINA

Fdo: Dr. Ana Serrano

Índice

<u>Resumen</u>	1
<u>Capítulo 1: Introducción</u>	4
1. Flavinas y flavoproteínas	5
1.1. Historia	5
1.2. Estructura	5
1.3. Función	6
1.4. Propiedades redox	6
1.5. Propiedades espectroscópicas	7
1.5.1. Absorción UV-Visible	7
1.5.2. Fluorescencia	7
2. Síntesis de FMN y FAD	8
2.1. La Riboflavina Kinasa/FMN Adenililtransferasa bifuncional	8
2.1.1. FADS bifuncional de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> (CaFADS)	9
2.1.1.1. Mecanismo catalítico	9
2.1.1.2. Estructura	10
2.1.1.3. Unión de los ligandos	11
2.1.1.4. Estructura cuaternaria de la CaFADS	13
<u>Capítulo 2: Objetivos</u>	17
1. Antecedentes	19
2. Objetivos	19
<u>Capítulo 3: Materiales y métodos</u>	21
1. Cultivo, sobreexpresión y purificación de proteínas	23
2. Técnicas de caracterización de proteínas	23
2.1. Caracterización espectroscópica	23
2.1.1. Espectroscopia de absorción en el UV-Visible	23

2.1.2. Dicroísmo circular	24
2.1.3. Determinación de los espectros diferenciales del complejo CaFADS:flavina	24
2.2. Medidas cinéticas en estado estacionario	25
2.2.1. Análisis cuantitativo de la actividad RFK de la CaFADS mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	25
2.2.2. Análisis cuantitativo de la actividad FMNAT de la CaFADS mediante fluorescencia molecular	27
2.3. Medida de parámetros de interacción de CaFADS con sus ligandos	28
2.3.1. Determinación de las constantes de disociación del complejo CaFADS:ligando mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	28
2.3.2. Determinación de parámetros termodinámicos a partir de medidas de ITC	30
<u>Capítulo 4: Resultados</u>	31
1. Caracterización espectroscópica de los mutantes de CaFADS	33
1.1. Dicroísmo circular (CD)	33
1.2. Espectroscopia diferencial	33
2. Parámetros cinéticos de las variantes de CaFADS	35
2.1. Actividad RFK de los mutantes de CaFADS	35
2.2. Actividad FMNAT de los mutantes de CaFADS	37
3. Parámetros de interacción de las variantes de CaFADS con sus diferentes ligandos	38
<u>Capítulo 5: Discusión</u>	43
<u>Capítulo 6: Conclusiones</u>	51
<u>Capítulo 7: Bibliografía</u>	55

Resumen

Resumen

El FMN y el FAD se sintetizan en dos etapas secuenciales mediante la enzima FAD sintetasa (FADS) que, en procariontes, es una enzima bifuncional dividida en dos módulos, el dominio C-terminal, con actividad RF quinasa (RFK) y el N-terminal, con actividad FMN adenililtransferasa (FMNAT). Se propone la existencia de una estructura oligomérica, formada por un dímero de trímeros, que podría tener relevancia en el proceso catalítico.

En este proyecto se han analizado los parámetros de unión de los ligandos y las actividades RFK y FMNAT de variantes mutadas de FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS) en los residuos R66, K202, E203, D298 y E301, que están localizados en la interfase entre los dominios N- y C-terminal de cada dos monómeros que forman cada uno de los dos trímeros.

Los mutantes presentan una estructura tridimensional similar a la de la proteína WT, y mantienen la capacidad de unión de los ligandos. El residuo R66, del módulo N-terminal es crítico para la actividad RFK del C-terminal y la unión de los ligandos, y podría colaborar junto con E268 como base catalítica en el módulo RFK. Los residuos K202 y E203, del módulo RFK, afectan a la unión de los ligandos y la actividad FMNAT, al influir en el bucle L8n del módulo FMNAT. El residuo D298, situado en el dominio C-terminal, es relevante para las actividades tanto RFK como FMNAT y el E301 está implicado en la unión de los ligandos en el sitio FMNAT de CaFADS.

En conclusión, la influencia de la sustitución de residuos de un módulo en la actividad del otro apoya la hipótesis de que la forma oligomérica de CaFADS, en la que cada sitio activo estaría formado por residuos de su propio módulo y del módulo del protómero contiguo, juega un papel relevante durante la catálisis.

CAPÍTULO 1:

Introducción

1. FLAVINAS Y FLAVOPROTEÍNAS

1.1. Historia

En 1879 Wynter Blyth, aisló del suero de leche de vaca un pigmento amarillo al que llamó “lactocromo”. Más tarde se aislaron otros pigmentos similares que fueron identificados como un componente de la vitamina B, la vitamina B₂. Tras su síntesis química se pasó a denominar Riboflavina (RF), por su color amarillo (en latín *flavus*) y la cadena lateral de ribitol.

Otto Warburg aisló de levaduras la primera flavoproteína que catalizaba la oxidación del NADPH a partir de oxígeno. Esta proteína tenía como cofactor un derivado de la RF, conocido como Riboflavina 5'fosfato o Mononucleótido de Flavina (FMN), que tenía un grupo fosfato en la cadena de ribitol de la RF. Más tarde, Hans Krebs encontró otra flavoproteína, la D-aminoácido oxidasa, con otra flavina como cofactor, el Dinucleótido de Flavina y Adenina (FAD), derivado de la condensación de FMN y AMP. Desde entonces fue demostrada la necesidad de la RF como precursor de los cofactores enzimáticos.

1.2. Estructura

Las flavinas son compuestos heterocíclicos que tienen en común un anillo de isoaloxacina, que les otorga las propiedades redox. Las flavinas que se encuentran en la naturaleza son derivados del lumicromo o 7,8-dimetil-isoaloxacina, y las más relevantes son la RF o vitamina B₂ (7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxacina), y sus derivados FMN y FAD (Figura 1.1.).

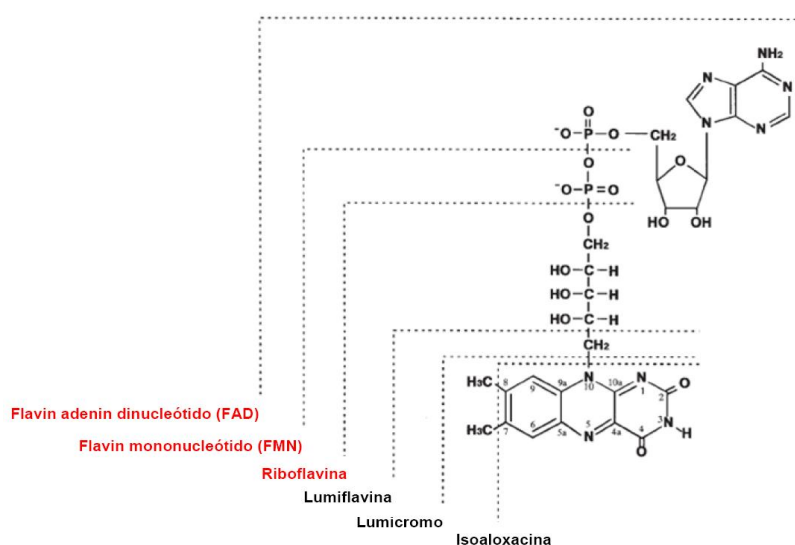


Figura 1.1. Derivados del anillo de isoalozacina. En rojo aparecen las formas biológicamente relevantes.

1.3. Función

Excepcionalmente, las flavinas pueden actuar como coenzimas de una familia de óxido-reductasas, que catalizan la reducción de RF, FMN y FAD por NAD(P)H (Fieschi, *et al.*, 1995). Sin embargo, la principal función de las flavinas es la de actuar como grupos prostéticos de un gran número de proteínas de óxido-reducción conocidas como flavoproteínas.

Estas flavoproteínas están implicadas en numerosos procesos biológicos como el metabolismo aeróbico, el desarrollo embrionario (Murty, *et al.*, 1982), la transducción de señales en la muerte celular programada (Susin, *et al.*, 1999), o la regulación de relojes biológicos (Ishikawa, *et al.*, 1999). También participan en procesos dependientes de la luz, como la fotosíntesis (Zanetti, *et al.*, 1991) o la reparación del DNA (Jorns, *et al.*, 1987).

Dado el gran número de flavoproteínas y flavoenzimas implicadas en el metabolismo celular en todos los organismos, la deficiencia de flavinas impediría el ensamblaje de numerosas holoproteínas esenciales para la célula, causando la acumulación de las correspondientes apoproteínas, incapaces de realizar sus funciones, e induciendo alteraciones metabólicas relacionadas con estados fisiológicos o patológicos (Serrano, *et al.*, 2012a).

1.4. Propiedades redox

La principal propiedad de las flavinas es la capacidad de experimentar reacciones de óxido-reducción. De forma general, el anillo de isoaloxacina es la parte de la molécula que participa en los procesos de reducción, pudiendo acoplar en flavoproteínas procesos de óxido-reducción de dos electrones con procesos de transferencia de un único electrón. El resto de la cadena sólo tiene función estructural.

El anillo de isoaloxacina en flavoproteínas puede presentarse en tres estados de reducción: la forma oxidada o quinona, la forma semiquinona o reducida por un único electrón, y la forma hidroquinona o reducida por dos electrones (Müller, 1991). Además, cada estado de reducción puede encontrarse en forma catiónica, aniónica o neutra según el pH.

1.5. Propiedades espectroscópicas

1.5.1. Absorción UV-Visible

El espectro de absorción de las flavinas es diferente para los distintos estados de oxidación debido a la distinta distribución electrónica en el anillo de isoaloxacina.

El espectro de las flavinas oxidadas presenta tres máximos de absorción a longitudes de onda mayores de 250 nm, en torno a 265, 370 (banda II) y 445 nm (banda I) (Figura 1.2.). Aunque la forma general del espectro está muy poco influenciada por el sustituyente en N10, la intensidad de las bandas y la posición del máximo de la banda I difieren en el caso del FAD (450 nm) debido a la formación de un complejo entre los anillos de isoaloxacina y adenina (Weber, 1950; van den Berg, *et al.*, 2002).

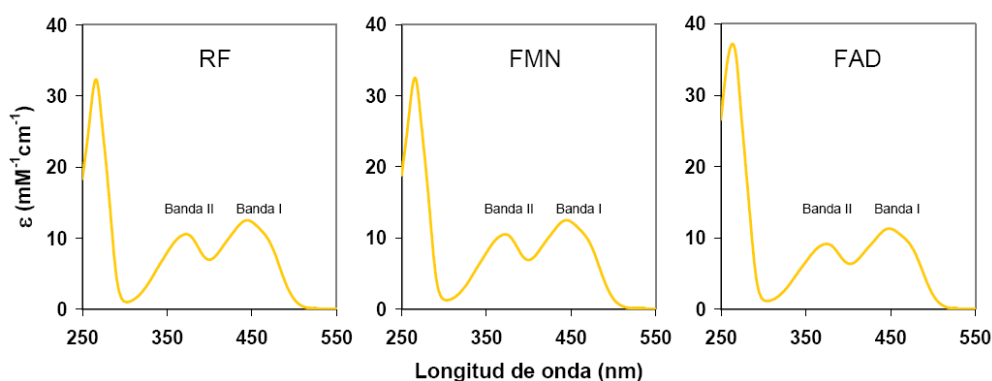


Figura 1.2. Espectros de absorción en el UV-Visible de RF, FMN y FAD en fosfato sódico 20 mM, pH 7.0.

La interacción de las flavinas con la proteína genera cambios tanto en la intensidad como en la posición de los máximos, que reflejan las propiedades de cada entorno proteico.

1.5.2. Fluorescencia

Las flavinas son uno de los grupos fluorescentes principales en proteínas, junto con los aminoácidos aromáticos. Mientras que las flavinas reducidas tienen una fluorescencia muy baja, en su estado oxidado presentan un alto rendimiento cuántico de fluorescencia (Sun, *et al.*, 1972) y un máximo de emisión a 525 nm. El FAD presenta un rendimiento cuántico unas 10 veces menor que el de la RF y el FMN, debido a la formación del complejo (no fluorescente) entre los anillos de isoaloxacina y adenina, que se encuentra en equilibrio con la forma abierta.

La unión de las flavinas a una enzima produce un cambio en la fluorescencia, que puede desaparecer o no, dependiendo de cómo se une el cofactor a la proteína.

2. SÍNTESIS DE FMN Y FAD

Las flavinas biológicamente activas, FMN y FAD, se sintetizan *in vivo* a partir de RF. Las plantas, hongos y ciertos microorganismos son capaces de sintetizar la RF a partir de una molécula de GTP y dos de ribulosa 5-fosfato. En el caso de los animales superiores la RF es una vitamina (vitamina B₂), no pueden sintetizarla y deben obtenerla de la dieta. En cualquier caso, todos los organismos tienen que convertir la RF en FMN y FAD mediante dos reacciones secuenciales (Figura 1.3.). En primer lugar, la RF se transforma en FMN mediante una actividad RF quinasa (RFK, ATP:riboflavina 5'fosfotransferasa, EC 2.7.1.26). Posteriormente, el FMN es transformado en FAD a través de una actividad ATP:FMN adenililtransferasa (FMNAT, EC 2.7.7.2).

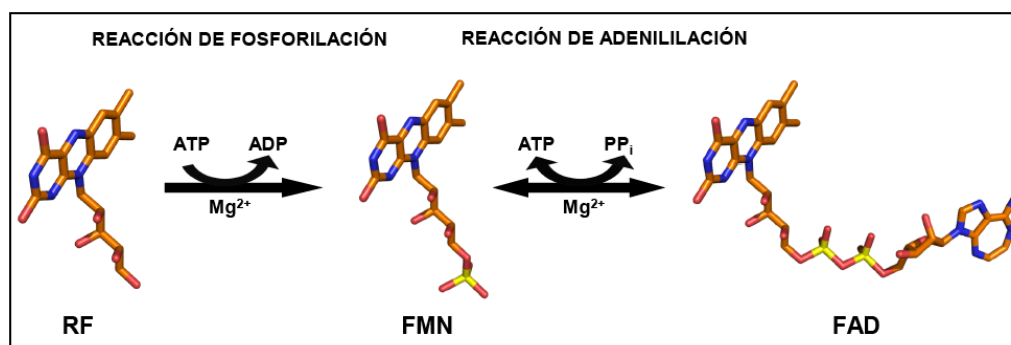


Figura 1.3. Reacciones secuenciales para la obtención de los derivados FMN y FAD.

Estas dos actividades se encuentran de forma general en enzimas independientes en los organismos eucariotas mientras que en bacterias, ambas funciones están codificadas por el mismo gen, *ribF*, que produce una única enzima bifuncional, a la que se ha dado el nombre de FAD sintetasa (FADS) (Manstein, *et al.*, 1986).

2.1. La Riboflavina Quinasa/FMN Adenililtransferasa bifuncional

Las FADS bifuncionales con actividad RFK y FMNAT han sido clonadas y caracterizadas a partir de diferentes bacterias (Kearney, *et al.*, 1979; Mayhew, *et al.*, 1980; Manstein, *et al.*, 1986; Efimov, *et al.*, 1998; Mack, *et al.*, 1998; Grill, *et al.*, 2008). Es una enzima ubicua en este tipo de organismos. La primera estructura disponible de una FADS bifuncional fue la de *Thermotoga marítima* (*TmFADS*), tanto libre como en complejo con algunos ligandos (Wang, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2005).

El análisis secuencial de la familia de las FADS procariontas indicó la existencia de dos dominios (Frago, *et al.*, 2008): un dominio C-terminal que tiene homología con

las RFK eucariotas, y que se propone que está implicado en la fosforilación de la RF (Wang, *et al.*, 2005); y un dominio N-terminal con plegamiento tipo Rossmann que no tiene homología con las FMNAT eucariotas sino que es similar a la familia de las NT (Rossmann, *et al.*, 1974), al que se le atribuye la actividad FMNAT (Krupa, *et al.*, 2003).

El hecho de que sean enzimas esenciales en microorganismos, junto con las diferencias detectadas con respecto a las enzimas monofuncionales eucariotas convierten a la FADS en una potencial diana terapéutica. La inhibición de esta enzima en organismos procariotas patógenos con un fármaco inocuo para la homóloga en eucariotas, podría resultar útil para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias patógenas.

2.1.1. FADS bifuncional de *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS)

La CaFADS fue purificada y caracterizada por primera vez en el año 1986. Se trata de un único polipéptido de 338 aminoácidos, con un peso molecular de 38 kDa y un punto isoeléctrico de 4.6 (Manstein, *et al.*, 1986) que posee las actividades RFK y FMNAT, además de una actividad FAD hidrolasa (síntesis de FMN y ATP a partir de FAD y PPi), ya que la reacción de adenilación es reversible (Figura 1.3).

Todas las actividades son dependientes de Mg^{2+} , aunque se ha descrito que la concentración óptima para llevar a cabo la reacción RFK *in vitro* es 0.75 mM mientras que para la reacción FMNAT es 10 mM (Manstein, *et al.*, 1986; Hagihara, *et al.*, 1995).

2.1.1.1. Mecanismo catalítico

Las dos etapas catalíticas de la FADS implican la unión de dos moléculas de ATP, una de RF y una de FMN como sustratos y la liberación de una molécula de ADP, una de PPi, una de FMN y una de FAD como productos.

En la fosforilación de la RF se ha propuesto que la RF se une a la proteína antes de la unión del ATP y que el ADP es liberado en primer lugar, seguido del FMN. En el proceso de adenilación, se ha propuesto que el FMN se une después del ATP y que el PPi es liberado antes que el FAD (Efimov, *et al.*, 1998) (Figura 1.4.).

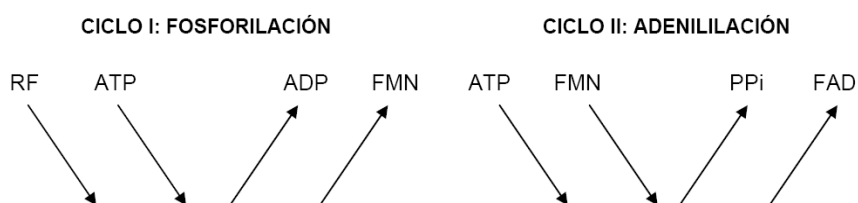


Figura 1.4. Mecanismo secuencial ordenado de las dos etapas catalíticas de CaFADS.

Estudios termodinámicos de unión a ligandos han confirmado que la CaFADS tiene un sitio de unión a adenina y un sitio de unión a flavina en cada módulo, y han mostrado que los sustratos modulan tanto la organización estructural de los sitios catalíticos como la afinidad por el resto de los ligandos (Frago, *et al.*, 2009).

2.1.1.2. Estructura

Recientemente se ha resuelto la estructura de la CaFADS (Herguedas, *et al.*, 2010). Los 186 primeros aminoácidos constituyen el dominio N-terminal con actividad FMNAT, y los residuos 187-338 constituyen el dominio C-terminal, con actividad RFK.

La CaFADS presenta los dos módulos dispuestos en una estructura alargada de unos 70 Å (Figura 1.5.).

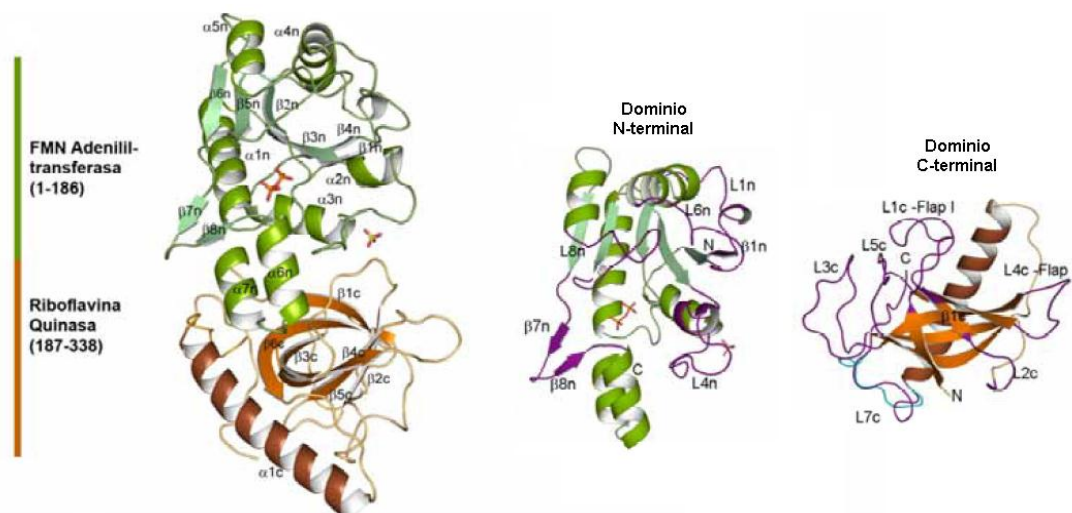


Figura 1.5. Estructura global de CaFADS con el dominio N-terminal en verde y el C-terminal en naranja.

El módulo FMNAT situado en la zona N-terminal presenta un plegamiento de unión a nucleótido α/β tipo Rossmann que consiste en una lámina β paralela alabeada con 6 hebras β ($\beta 1n$ - $\beta 6n$) y cinco hélices α ($\alpha 1n$ - $\alpha 5n$) distribuidas a ambos lados de la lámina. Las dos primeras hebras β están separadas por tres residuos (7-10) que forman una hélice 3_{10} . El dominio FMNAT termina en un pequeño subdominio formado por una horquilla β ($\beta 7n$ y $\beta 8n$) y dos hélices α cortas. No presenta homología con las enzimas eucariotas, y las principales diferencias con las enzimas de la superfamilia NT se encuentran en la primera hebra β , ausente en el resto de estructuras; en los bucles L1n, L4n, L6n y L8n, y en el subdominio formado por la horquilla β y las dos hélices α cortas ($\alpha 6n$ y $\alpha 7n$).

El módulo RFK se pliega formando un dominio globular de unos 25 Å de diámetro que contiene un barril β con 6 hebras antiparalelas ($\beta 1c$ - $\beta 6c$), una larga

hélice final ($\alpha 1c$), y siete bucles que conectan los elementos de estructura secundaria. El barril β central interactúa con la hélice α por tres puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Las principales diferencias con respecto a las RFK monofuncionales están en los bucles que conectan la estructura secundaria.

Por otro lado, en la zona de interacción entre los dos módulos se producen puentes de hidrógeno y contactos hidrofobos que dan rigidez a la interfase.

2.1.1.3. Unión de los ligandos

El módulo FMNAT presenta una cavidad abierta, con una superficie de potencial electrostático que está cargada positivamente (Figura 1.6.). Cadenas laterales de residuos de histidina y arginina conforman la parte central de esta cavidad, en la que se propone que se estabiliza la unión de los grupos fosfato de los ligandos (ATP, FMN, PPI y FAD). En general, los residuos V23, F24, H28, H31, H57, N125, R161, S164 y R168, que forman parte de las dos regiones consenso 19-32 y 162-174 altamente conservadas en la superfamilia NT, están relacionados con la unión del ATP y la estabilización de los fosfatos (Krupa, *et al.*, 2003; Frago, *et al.*, 2008; Herguedas, *et al.*, 2010)

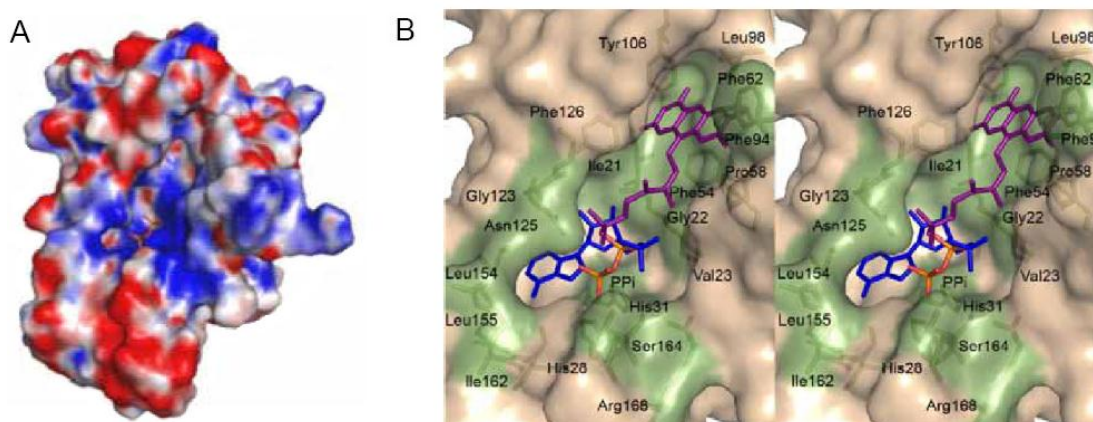


Figura 1.6. A) Superficie de potencial electrostático del módulo FMNAT. El color rojo son cargas negativas y el azul positivas. B) Sitio activo del módulo FMNAT donde se ha modelado el AMP (azul), el FMN (morado) y el PPI (naranja) (Frago, *et al.*, 2008; Herguedas, *et al.*, 2010).

A partir de la superposición de estructuras de RFK en complejo con varios ligandos, y basándose en la homología secuencial de las familias RFK y FADS bifuncional se ha propuesto un modelo para la unión del FMN y ADP-Mg²⁺ en el sitio activo del módulo RFK de CaFADS (Herguedas, *et al.*, 2010) (Figura 1.7.). Según este modelo, el sitio activo del módulo RFK estaría localizado en la parte externa del barril β , en la parte más alejada de la región de interacción entre los dos módulos, donde se observa una cavidad abierta con superficie de potencial electrostático negativo en la

cual se situaría la flavina con el anillo de isoaloxacina flanqueado por residuos con cadenas laterales hidrófobas (V224, F270, M294, F297, L303 y M307).

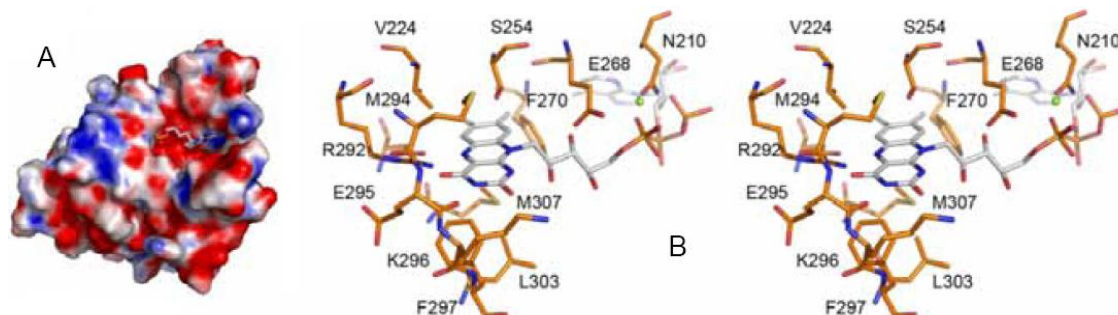


Figura 1.7. A) Superficie de potencial electrostático del módulo RFK. Se observa acumulación de cargas negativas hacia el interior (rojo). B) Modelo del entorno de la flavina, con los residuos relevantes del sitio activo (Herguedas, et al., 2010).

La estructura cristalográfica de CaFADS permite comprender parte de los estudios previos de interacción con los ligandos y el mecanismo enzimático de CaFADS (Efimov, et al., 1998; Frago, et al., 2009). Según los datos de calorimetría de titulación isoterma (ITC), CaFADS tiene un sitio de unión a adenina y un sitio de unión a flavina en cada módulo (Frago, et al., 2009). En la Figura 1.8. se muestra un modelo para la unión de los sustratos y productos a CaFADS. Según el modelo propuesto, independientemente de la concentración de Mg^{2+} , la RF tendría dos sitios de unión a la CaFADS (Figura 1.8 A), ya que dado su escaso tamaño y ausencia de cargas es capaz de unirse en los dos módulos, mientras que el FAD, de mayor tamaño y carga negativa, se une sólo al dominio FMNAT (Figura 1.8 D). Ambas observaciones concuerdan con la estructura cristalográfica del monómero donde existe una cavidad abierta en cada dominio. En el caso del ADP y ATP la aparición de un segundo sitio de unión depende de la presencia de Mg^{2+} , ya que en ausencia de éste sólo se unen al dominio FMNAT (Figura 1.8 B y C), (Serrano, 2011). Esta unión estaría favorecida debido a la existencia de residuos cargados positivamente en la cavidad del módulo FMNAT, a diferencia del potencial electrostático negativo en la cavidad del dominio RFK. Finalmente, el FMN presenta uno o dos sitios de unión dependiendo de la presencia de ADP y Mg^{2+} (Figura 1.8 E y F). La unión del grupo fosfato del FMN está favorecida en el módulo FMNAT debido a la carga positiva de la cavidad mientras que en el módulo RFK la acumulación de cargas negativas y, en particular, la presencia de la base catalítica E268 a corta distancia de la posición del grupo fosfato impide la estabilización del FMN. La presencia de Mg^{2+} reduce las repulsiones y el ADP provoca un cambio conformacional que estabilizaría la unión.

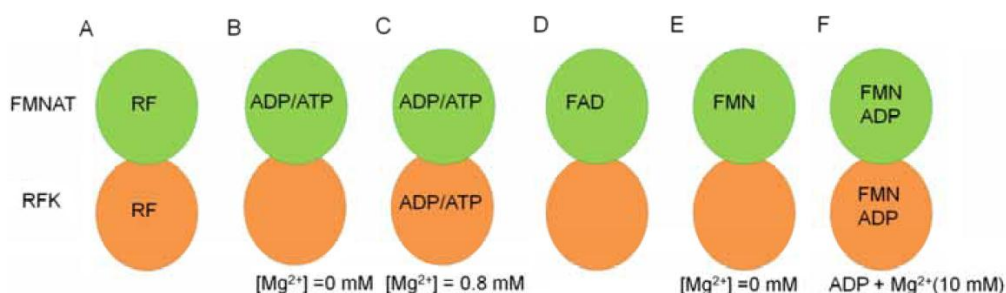


Figura 1.8. Esquema de los sitios de unión propuestos para los ligandos de CaFADS mediante un estudio de ITC en distintas condiciones (Frago, et al., 2009; Serrano, 2011).

2.1.1.4. Estructura cuaternaria de la CaFADS

La estructura cristalográfica de CaFADS se muestra como un hexámero (A_3B_3) compuesto por un dímero de trímeros (Figura 1.9.). La unión de los dos trímeros está estabilizada por puentes de hidrógeno, puentes salinos y contactos hidrófobos, además de presentar complementariedad de cargas. A su vez, los protómeros se estabilizan por puentes de hidrógeno, contactos hidrófobos y puentes salinos para formar el trímero.

Los protómeros presentan una disposición de tipo cabeza-cola, de tal forma que los dominios FMNAT y RFK de diferentes protómeros se aproximan. Esta estructura es compatible con la transferencia del producto de la primera reacción, el FMN, a la cavidad de la segunda, sin necesidad de liberarse totalmente de la proteína.

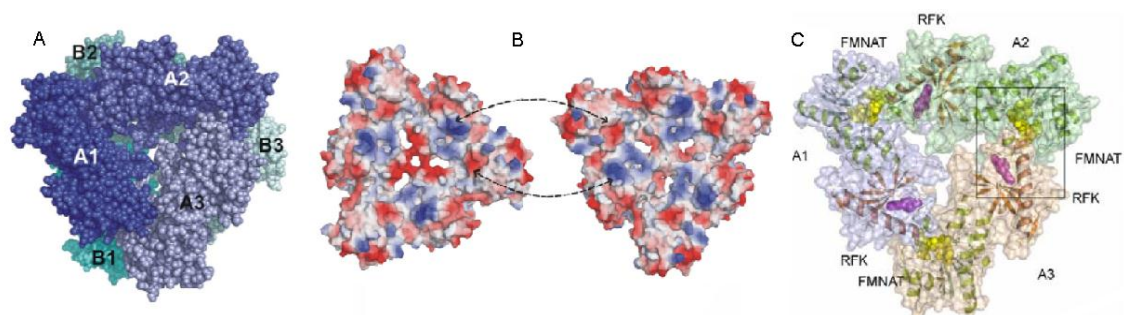


Figura 1.9. A) Vista del hexámero. B) Superficie de potencial electrostático en la interfase entre los trímeros A y B. C) Trímero A_3 con los protómeros en distinto color y los ligandos en amarillo (FMN y AMP unidos en el dominio FMNAT) y morado (FMN unido en el dominio RFK).

En esta estructura la cavidad observada en el módulo RFK para la unión de la flavina está parcialmente cerrada por el módulo FMNAT del protómero contiguo, y algunos residuos, como la R66, que forma un puente salino con la base catalítica del módulo RFK, E268, podrían jugar un papel importante en la actividad del módulo RFK. Igualmente, el sitio activo del módulo FMNAT se encuentra parcialmente cerrado por varios residuos del RFK (residuos 296-301) del protómero contiguo. Por todo esto, en

la estructura oligomérica cada sitio activo estaría compuesto por residuos de su propio módulo y del módulo del protómero contiguo.

Se piensa que, en organismos eucariotas, la presencia de distintas isoformas de las actividades RFK y FMNAT y su localización en los distintos compartimentos celulares podría tener un importante papel en la regulación de estas actividades en el control de la homeostasis de flavinas y la biogénesis de flavoproteínas. En los organismos procariontas, en los que no existe compartimentalización celular, la regulación de la síntesis de flavinas podría venir dada por la formación de la estructura oligomérica, que podría presentar una mayor eficacia catalítica para la actividad FMNAT debido a la canalización de sustratos entre los módulos RFK y FMNAT de protómeros distintos (Serrano, *et al.*, 2012a).

Recientemente, se ha descrito que algunas mutaciones en el sitio RFK modulan los parámetros de unión y la eficiencia catalítica del sitio FMNAT de CaFADS. Esto apoya la hipótesis de que el dímero de trímeros puede jugar un papel funcional durante la catálisis y que la canalización del FMN entre el sitio RFK y el FMNAT de diferentes protómeros podría ocurrir.

La Figura 1.10 muestra la interfase entre los dominios N- y C-terminal de dos de los protómeros que forman cada uno de los dos trímeros que se ha propuesto que componen la forma oligomérica de CaFADS (Herguedas, 2011), mostrando algunos de los residuos que aparentemente estabilizan dicha estructura y cierran los sitios catalíticos.

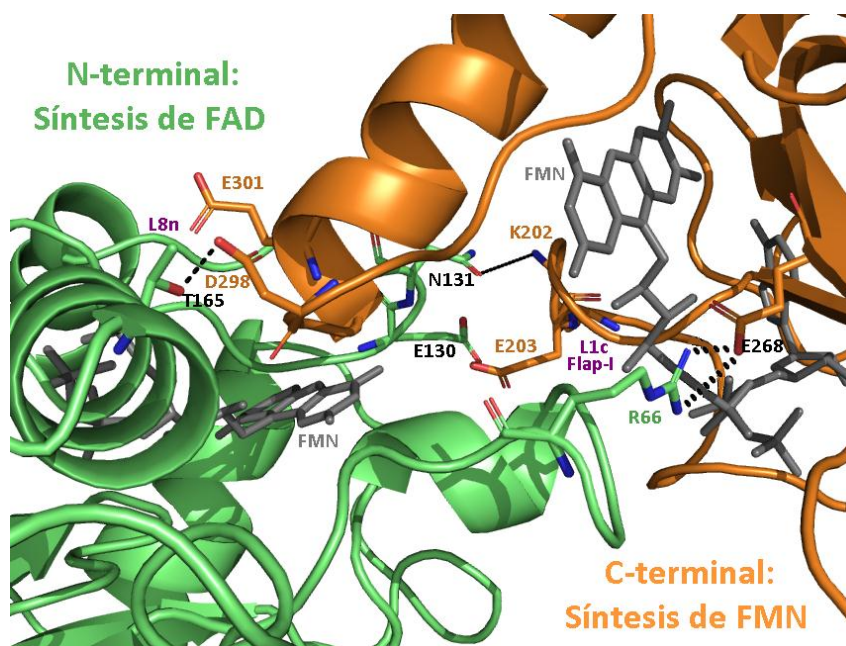


Figura 1.10. Detalle de la zona de interacción entre los dominios FMNAT (verde) y RFK (naranja) con los residuos que podrían estar implicados en la estabilización y las interacciones que se producen.

En base a estos datos estructurales, se han producido diversos mutantes en los residuos R66, K202, E203, D298 y E301, con objeto de analizar la relevancia de la estructura oligomérica de CaFADS.

En esta estructura, R66, cargada positivamente, interacciona con la base catalítica, E268, del módulo RFK del protómero adyacente. Este residuo ha sido sustituido por los aminoácidos alanina y glutamato (R66A y R66E), sin carga y con carga negativa, respectivamente, para estudiar la relevancia de una carga positiva en esta posición.

K202 y E203 están localizados en el bucle L1c (o Flap-I), que rodea el sitio catalítico para la actividad RFK y está implicado en la unión de los ligandos. Además, en la estructura oligomérica, estos residuos se sitúan cerca de residuos del bucle L8n que configura la cavidad del módulo FMNAT. Su sustitución por alanina, un aminoácido sin carga, permitirá obtener información sobre el papel que juegan dichos residuos en la unión de los ligandos y en las actividades RFK y FMNAT.

Por su parte, el residuo D298, que se localiza en el bucle L6c, interacciona con la T165, situada en la hélice $\alpha 6n$, que flanquea la cavidad del módulo FMNAT. Además, su cadena lateral se dirige hacia el lugar de unión de los fosfatos de los ligandos. Se ha realizado la mutación D298A para evaluar la influencia de la carga negativa del aspartato, y la mutación D298E para estudiar el efecto producido al aumentar la longitud de su cadena lateral.

Finalmente, se han producido las variantes E301A y E301K con objeto de analizar el papel del residuo E301. Se propone que dicho residuo puede ser importante en la actividad de la proteína o en su capacidad de unión de los ligandos, ya que podría interactuar con residuos del bucle L8n, como el enlace peptídico de N125, y por tanto puede influir en la organización de la cavidad del módulo FMNAT. Además, se localiza en el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 1c$ del módulo RFK, que se orienta con su extremo N-terminal hacia el sitio de unión de los ligandos en el FMNAT.

CAPÍTULO 2:

Objetivos

1. ANTECEDENTES

Las características moleculares diferenciales descritas hasta la fecha entre las enzimas encargadas de la síntesis de FMN y FAD en eucariotas y procariotas han convertido a la FADS bacteriana en una potencial diana para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos. La información estructural y mecánica disponible de estas enzimas es todavía limitada, pero la obtención de su estructura tridimensional ha permitido identificar los posibles sitios de interacción de sus sustratos y proponer una estructura oligomérica que podría estar implicada en la homeostasis de las flavinas en el interior celular.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este proyecto máster es aportar pruebas sobre la posible relevancia de la forma oligomérica de CaFADS, constituida por un dímero de trímeros, en la actividad de la proteína, y verificar el papel particular de los residuos R66, K202, E203, D298 y E301 tanto en la localización de los sustratos en los centros activos como en la estabilización de la estructura oligomérica.

Para alcanzar este objetivo general se ha planteado llevar a cabo la caracterización de los mutantes de la FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS) R66A, R66E, K202A, E203A, D298A, D298E, E301A, y E301K, incluyendo la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Confirmar el correcto plegamiento de los mutantes producidos.
- Determinar cuantitativamente si las mutaciones introducidas tienen algún efecto en las actividades RFK y FMNAT.
- Determinar si las mutaciones introducidas modifican la capacidad de la proteína de unir sus diferentes ligandos.
- Determinar si las mutaciones introducidas modifican los parámetros termodinámicos de la unión con los ligandos.

CAPÍTULO 3:

Materiales y métodos

1. CULTIVO, SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células de *E. Coli* previamente transformadas con el plásmido pET28a que contiene la CaFADS nativa (WT) y un gen de resistencia a kanamicina se cultivaron en medio de cultivo LB con 30 µg/ml de kanamicina. En el momento de crecimiento exponencial se indujo la expresión de la proteína con IPTG a concentración 1 mM. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en tampón de rotura y se sonicaron. El sobrenadante obtenido de la centrifugación fue purificado siguiendo el procedimiento descrito previamente (Frago, *et al.*, 2008), que consta de una primera etapa de fraccionamiento con sulfato amónico, una etapa de separación por cromatografía de hidrofobicidad en fenil-sefarosa, y una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa. En estas condiciones la proteína se purifica como una mezcla de monómero y otras especies oligoméricas. Estas especies diferentes se separaron en una columna de exclusión molecular HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-200 HR utilizando como fase móvil PIPES 20 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.0.

Todas las variantes mutadas de la CaFADS habían sido obtenidas previamente por el mismo procedimiento por Sonia Arilla, miembro del grupo.

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.1. Caracterización espectroscópica

2.1.1. Espectroscopia de absorción en el UV-Visible

Se registraron los espectros de absorción en la región UV-Visible de los distintos mutantes de CaFADS entre 250 y 700 nm en PIPES 20 mM, pH 7.0 y MgCl₂ 10 mM con objeto de comprobar la integridad de las proteínas purificadas y para la cuantificación de las mismas. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 100, cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y las medidas se realizaron con una velocidad de barrido de 300 nm/min.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ec. 1}$$

donde A es la absorbancia a una determinada longitud de onda, ϵ el coeficiente de extinción molar de la proteína a dicha longitud de onda, c la concentración de la

muestra y l la longitud del paso de luz. Como coeficiente de extinción molar se utilizó el valor calculado previamente para la WT, $\epsilon = 27.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a la longitud de onda del máximo, $\lambda = 278 \text{ nm}$, para todos los casos, ya que las mutaciones realizadas no implican residuos aromáticos.

2.1.2. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron registrados a 25°C en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photosystem Ltd.) con el fin de comprobar el correcto plegamiento de las proteínas mutadas y que dichas variantes no presentan cambios estructurales importantes respecto a la proteína WT. Los espectros correspondientes a la región del UV lejano proporcionan información acerca de la estructura secundaria, y fueron registrados entre 190 y 260 nm, utilizando una cubeta de cuarzo con paso de luz de 0.1 cm y con una concentración de proteína de $\sim 5 \mu\text{M}$ en PIPES 5 mM, pH 7.0 y MgCl_2 10 mM. Los espectros de la región del UV cercano, que permiten comprobar cambios en la estructura terciaria, se registraron entre 260 y 320 nm, con cubetas de cuarzo de 0.4 cm de paso de luz, y una concentración de proteína de $\sim 20 \mu\text{M}$ en PIPES 20 mM, pH 7.0 y MgCl_2 10 mM. El tiempo de medida en cada punto fue de 10 segundos en el caso del UV lejano y de 16 segundos para el UV cercano y la resolución fue en ambos casos de 0.5 nm. Los espectros fueron corregidos con la señal correspondiente al tampón de trabajo y la señal de dicroísmo circular obtenida se expresó como elipticidad molar por residuo (MRE, $[\theta]_{\text{mr}}$):

$$[\theta]_{\text{mr}} = \frac{\theta}{(10 \cdot c \cdot l \cdot (N - 1))} \quad \text{Ec. 2}$$

donde θ es la señal obtenida (mdeg), c es la concentración de proteína (M), l es el paso de luz de la cubeta (cm), y N es el número de residuos de la proteína.

2.1.3. Determinación de los espectros diferenciales del complejo CaFADS: flavina

Cuando las flavinas interactúan con la CaFADS se produce una perturbación en su espectro de absorción en el visible que permite el estudio de dicha interacción mediante espectroscopia diferencial. Para los distintos mutantes se obtuvieron los espectros diferenciales de los complejos para una concentración de flavina saturante, en ausencia y en presencia de ADP. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Cary 100 de doble haz, y se emplearon cubetas de cuarzo de paso de luz de 1 cm. En un experimento típico, la cubeta de muestra contiene 700 μl de CaFADS a concentración de $\sim 5 \mu\text{M}$ mientras que la de referencia tiene 700 μl de tampón. Se realizan adiciones

sucesivas sobre ambas cubetas del mismo volumen de ligando hasta observar que los espectros diferenciales no cambian. En el caso de las medidas en presencia de ADP, ambas cubetas contienen ADP en concentración saturante ~ 450 μ M.

2.2. Medidas cinéticas en estado estacionario

2.2.1. Análisis cuantitativo de la actividad RFK de la CaFADS mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La actividad RFK de los mutantes de CaFADS se analizó de forma cuantitativa midiendo la RF consumida durante la reacción, calculada como la suma del FMN y FAD formados. La actividad se cuantificó mediante la separación de las flavinas producidas durante la reacción por HPLC. Se utilizó un equipo de HPLC Alliance (Waters) conectado a un inyector automático 2707 Autosampler (Waters) y a un detector de fluorescencia 2475 Multi-Wavelength Detector (Waters). Las condiciones cromatográficas utilizadas se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Condiciones cromatográficas para la separación de flavinas mediante HPLC.

Fase estacionaria	HSS T3 (4.6x150 mm, 3.5 μ m, Waters) ^a
Fase móvil	metanol 40% en acetato de amonio 5mM, pH 6.0
Método	Isocrático
Flujo	1 ml/min
Sistema de detección	fluorescencia: λ_{ex} = 470 nm; λ_{em} = 530 nm (Ganancia 10)

^a La columna va precedida de una pre-columna (4.6 x 20 mm, 3.5 μ m, Waters) del mismo material, con el fin de alargar su vida media.

En estas condiciones las flavinas se separaron en 6 min con tiempos de retención 2.2 para el FAD, 3.4 para el FMN y 5.5 min para la RF.

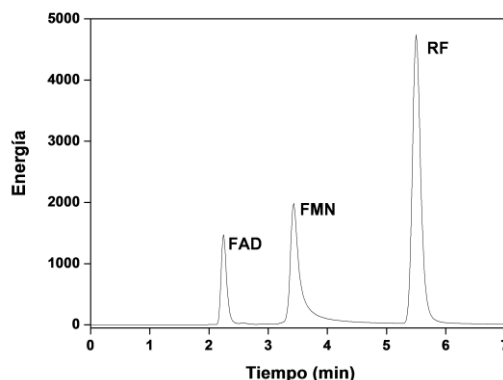


Figura 3.1. Separación cromatográfica de FAD, FMN y RF por HPLC en las condiciones de laTabla 3.1.

Para la cuantificación de FMN y FAD se realizaron dos rectas de calibrado con disoluciones patrón de FMN y FAD de concentración conocida y se representó para cada una de ellas el área del pico obtenido frente a la concentración de la solución patrón.

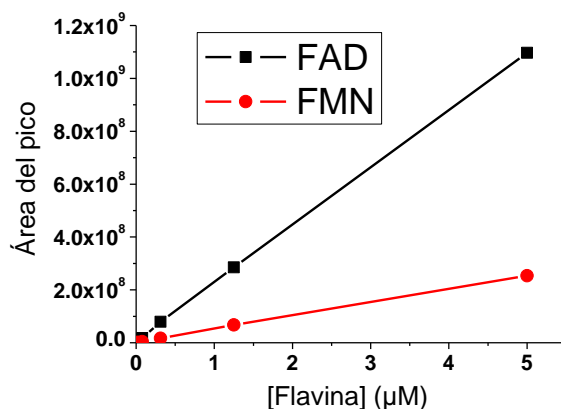


Figura 3.2. Rectas de calibrado para FAD y FMN en las condiciones recogidas en la Tabla 3.1.

Las mezclas de reacción contenían RF (0 - 33 µM), ATP (0 - 400 µM) y MgCl₂ (0.8 mM) en PIPES 20mM, pH 7.0, en un volumen final de 500 µl y se preincubaron a 25°C. La reacción se inició por adición de enzima a una concentración final de 20 nM y se incubó durante 1 min a 25°C. Seguidamente se detuvo la reacción por calentamiento a 100 °C durante 5 min y se eliminó la enzima de la mezcla de reacción mediante centrifugación.

Se inyectaron 20 µl de cada muestra en la columna HSS T3 para separar las flavinas de la mezcla y se calcularon las concentraciones de FMN y FAD a partir de las áreas de los picos, y haciendo uso de las rectas de calibrado obtenidas en las mismas condiciones. Se sumaron las concentraciones de FMN y FAD obtenidas para cada reacción y se dividió el resultado por la concentración de enzima en el ensayo, obteniendo de este modo la actividad enzimática. Las cinéticas se realizaron a concentración saturante de RF, variando la concentración de ATP y viceversa.

La reacción medida a concentración fija de RF y distintas concentraciones de ATP sigue el modelo de Michaelis-Menten, por lo que los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los datos de la curva de saturación experimental a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [A]}{(K_m + [A])} \quad \text{Ec. 3}$$

donde v_0 es la velocidad en cada punto, V_{\max} es la velocidad máxima, K_m representa la concentración de sustrato a la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima, y $[A]$ es la concentración de sustrato.

Sin embargo, la reacción a concentración constante de ATP y distintas concentraciones de RF no presenta una dependencia hiperbólica, sino que se produce una inhibición por sustrato, de modo que a altas concentraciones, la velocidad de reacción disminuye. Por ello, en este caso, los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación general de inhibición del sustrato:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [A]}{\left(K_m + [A] + \left(\frac{[A]}{K_i} \right) \right)} \quad \text{Ec. 4}$$

donde K_i es la constante de disociación del complejo enzima:inhibidor.

2.2.2. Análisis cuantitativo de la actividad FMNAT de la CaFADS mediante fluorescencia molecular

Se llevaron a cabo medidas a lo largo del tiempo de muestras que contenían FMN (0 - 8 μM), ATP (0 - 400 μM), y MgCl_2 (10 mM) en PIPES 20 mM, pH 7.0, en un volumen final de 1 ml y se preincubaron a 25°C. La reacción se inició por adición de enzima a una concentración final de 40 nM en el caso de la WT y de 60 - 75 nM en el caso de los mutantes. Las medidas fueron realizadas en un espectrofluorímetro Cary Eclipse a 25°C durante 30 segundos, con una longitud de onda de excitación y emisión de 420 y 530 nm, respectivamente. La fluorescencia del FAD y el FMN fue calibrada individualmente utilizando disoluciones de concentración conocida. Bajo las condiciones experimentales, la constante de fluorescencia del FAD (K_{FAD}) era unas 10 veces menor que la del FMN (K_{FMN}).

La velocidad de formación de FAD (v_0) fue calculada a partir de la disminución de la fluorescencia en el tiempo ($\Delta F/\Delta t$) aplicando la ecuación:

$$v_0 = \frac{\Delta F}{\Delta t \cdot (K_{FMN} - K_{FAD})} \quad \text{Ec. 5}$$

Los datos cinéticos obtenidos para un sustrato a concentraciones saturantes del segundo sustrato fueron interpretados con el modelo cinético de Michaelis-Menten (Ec. 3), lo que permitió obtener los valores de k_{cat} y K_m con errores de un $\pm 10\%$.

2.3. Medida de parámetros de interacción de CaFADS con sus ligandos

2.3.1. Determinación de las constantes de disociación del complejo

CaFADS:ligando mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

a) Fundamento de la técnica

La ITC es una técnica analítica que consiste en la medida directa del calor liberado o absorbido en una reacción que pone en juego interacciones inter- e intramoleculares, como son las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína o proteína-DNA/RNA (Ladbury, *et al.*, 1996). El calor liberado o absorbido durante la interacción se mide directamente a presión constante. Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande puede determinarse con precisión la estequiometría, la entalpía de formación y la constante de unión de estos complejos.

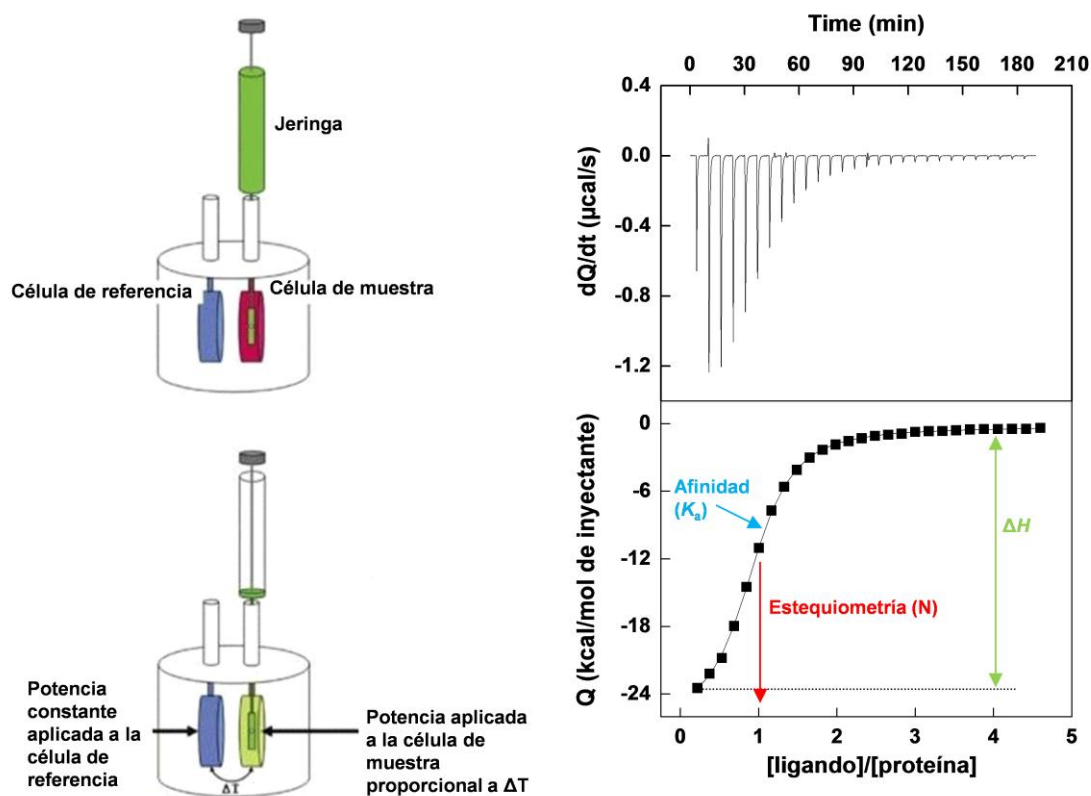


Figura 3.3. Esquema de un experimento típico de ITC. La solución de proteína se coloca en la célula de muestra, mientras que la célula de referencia contiene únicamente tampón. La magnitud física medida en un experimento de ITC es el cambio en la potencia aportada por unidad de tiempo al sistema para mantener las células de muestra y referencia a la misma temperatura. Al inyectar el ligando en la célula de muestra se generará o absorberá calor, según si la reacción es exotérmica o endotérmica. Este calor es proporcional a la variación de la fracción de ligando unido. Tras las primeras inyecciones, todo o casi todo el ligando se une a la proteína, lo que se traduce en mayores señales que las obtenidas en posteriores inyecciones, cuando la concentración de ligando va aumentando, ya que la proteína se satura y por tanto la cantidad de calor puesta en juego es menor.

b) Metodología:

Para llevar a cabo el estudio de la interacción de los distintos mutantes de CaFADS con los ligandos FAD, FMN y ATP se utilizó un calorímetro MicroCal Auto-ITC200 termostatzado a 25 °C. Se emplearon placas de 96 pocillos donde se colocaron 400 µl de proteína, 150 µl de ligando y 400 µl de tampón previamente desgasificados. La célula de referencia contenía agua, mientras que en la de muestra fue inyectada la solución de proteína, con una concentración de ~ 20 µM en los distintos ensayos. La concentración de los ligandos FAD, FMN y ATP en la jeringa fue de unas 10 - 15 veces mayor. Debido a la baja solubilidad de la RF, se utilizó una concentración de RF de ~ 244 µM y las titulaciones con este ligando se hicieron sobre una menor concentración de proteína. Se estudió también la unión del FMN en presencia de ADP, y en ese caso la solución de proteína contenida en la célula de muestra contenía ADP a concentración 462 µM. Para cada muestra se realizaron de modo automático 19 inyecciones de 2 µl de ligando cada una. Entre los distintos experimentos la célula y la jeringa fueron lavadas con tampón (PIPES 20 mM, pH 7.0, MgCl₂ 10 mM).

Los parámetros termodinámicos, K_a , ΔH y N se obtuvieron mediante regresión no lineal de los datos experimentales a un modelo de uno o dos sitios de unión (Serrano, 2011). El error estimado en la determinación de los parámetros es de unas 0.3 kcal/mol para ΔH y de $\pm 10\%$ para K_a .

2.3.2. Determinación de parámetros termodinámicos a partir de medidas de ITC.

Los experimentos de ITC para estudiar la interacción de la CaFADS con sus ligandos proporcionan el valor de K_a y el valor de ΔH . Teniendo en cuenta la ecuación $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_a$ se puede calcular el valor de la energía libre de Gibbs. La entropía se puede obtener haciendo uso de la ecuación $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$. Finalmente, la constante de disociación, K_d , se puede calcular teniendo en cuenta que $K_d = 1 / K_a$.

CAPÍTULO 4:

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS MUTANTES DE CaFADS

1.1. Dicroísmo circular (CD)

Todos los mutantes producidos mostraron un espectro de dicroísmo circular en la región UV lejano similar al de la CaFADS WT (Figura 4.1. A), lo que indica que las proteínas mutadas mantienen los elementos de estructura secundaria de la CaFADS. Los mutantes también presentan la misma forma general del espectro en el UV cercano en relación a la WT, una ancha banda negativa en la región entre 260 y 300 nm, con dos mínimos relativos en 284 y 291 (Frago, *et al.*, 2009), lo que sugiere que las mutaciones introducidas no modifican la estructura tridimensional de forma significativa. En cualquier caso sí que se observan diferencias en la intensidad de las bandas, siendo menor para los mutantes respecto a la CaFADS WT (Figura 4.1.B). Esto sugiere cambios en el entorno de alguno de los aminoácidos aromáticos de esta proteína. En conjunto los espectros de CD sugieren que los mutantes producidos se pliegan sin producir mayores cambios en la estructura global de la proteína, aunque pudiendo producir cambios locales en la conformación de algunos residuos.

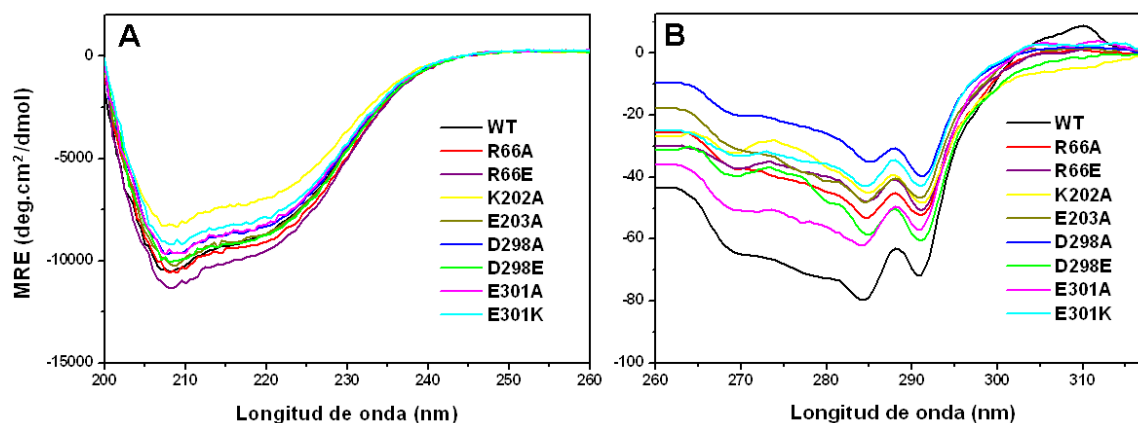


Figura 4.1. Espectros de dicroísmo circular (elipticidad molar por residuo) en la región del UV lejano (A) y en la región del UV cercano (B) de la CaFADS WT y las distintas formas mutadas. Espectros registrados a 25°C en PIPES 5 mM y 20 mM, pH 7.0, 10 mM MgCl₂, respectivamente.

1.2. Espectroscopia diferencial

La titulación mediante espectroscopia diferencial de las variantes de CaFADS con RF, FMN y FAD produjo en todos los casos la aparición de espectros diferenciales en la región del visible (Figura 4.2.). Esto indica que los mutantes mantienen la capacidad de interactuar con sus ligandos flavínicos, al menos en uno de los dos sitios de unión descritos para ellos. Aunque todas las variantes producen espectros

diferenciales similares, se observan desplazamientos en la posición de los picos y diferencias en su intensidad (Figura 4.2.). Este hecho sugiere pequeños cambios en el entorno dieléctrico de los anillos de isoaloxacina de las flavinas cuando se unen a las distintas variantes de CaFADS.

La unión de RF, FMN y FAD a los complejos preformados de CaFADS:ADP produce, de forma general, un incremento en la magnitud de la variación de absorbancia inducida por la unión del ligando de casi el doble, con máximos y mínimos mejor definidos (Figura 4.2.). Este hecho se ha asociado a la aparición del segundo sitio de unión a FMN, situado en el dominio C-terminal o RFK, bajo esas condiciones (Frago, *et al.*, 2009).

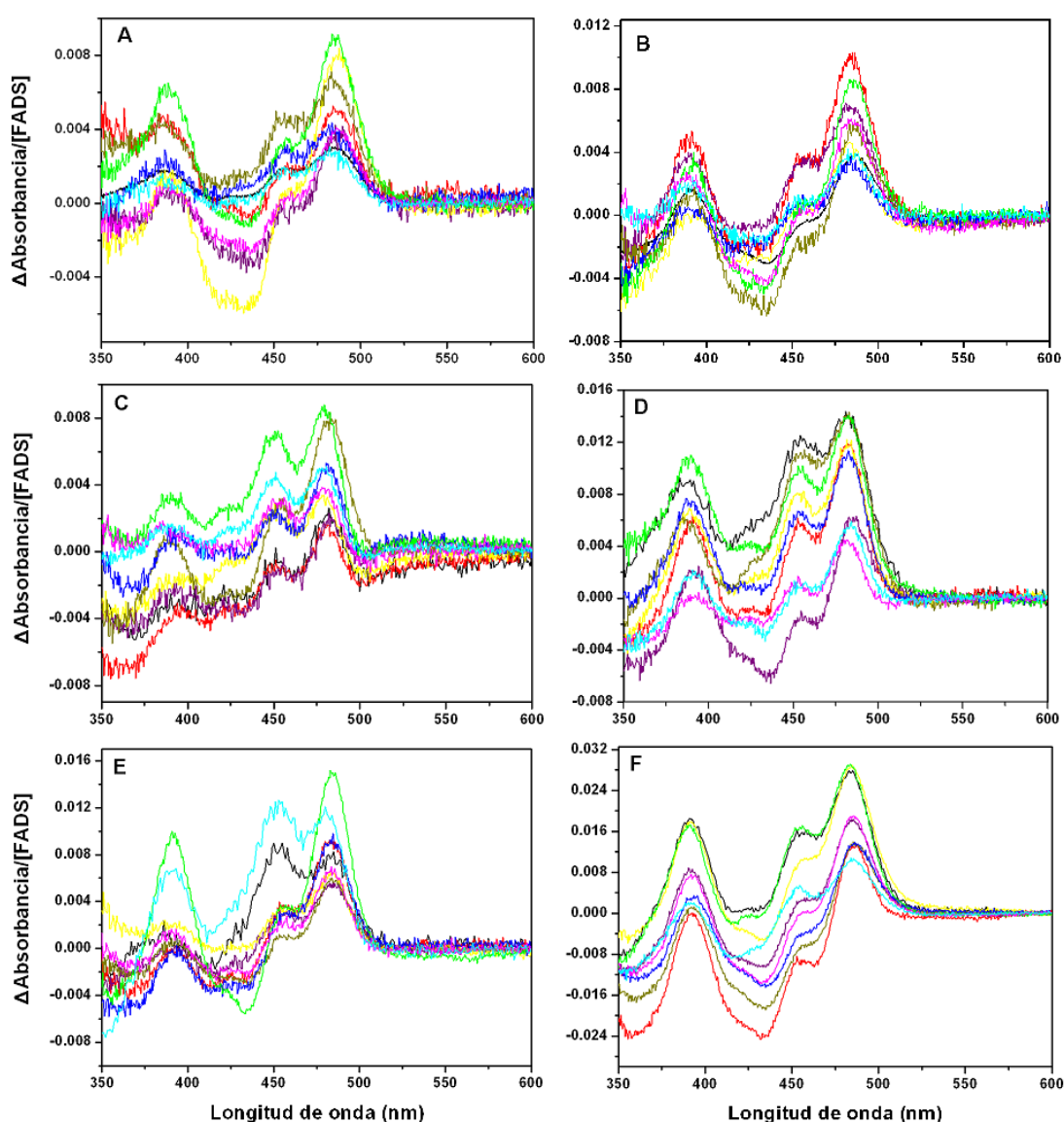


Figura 4.2. Espectros diferenciales obtenidos por titulación a saturación de las variantes de CaFADS libres (izquierda) y sus complejos CaFADS:ADP (derecha) con RF (A y B), FAD (C y D) y FMN (E y F). La CaFADS WT se muestra en negro, R66A en rojo, R66E en morado, K202A en amarillo, E203A en amarillo oscuro, D298A en azul, D298E en verde, E301A en rosa y E301K en azul claro.

En conjunto estas medidas indican que las variantes estudiadas son, en principio, capaces de interactuar con los ligandos flavínicos.

2. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS VARIANTES DE CaFADS

2.1. Actividad RFK de los mutantes de CaFADS

La actividad RFK de las variantes de CaFADS se determinó siguiendo la evolución de RF en la suma de FMN y FAD a concentración 0.8 mM de $MgCl_2$ para minimizar la actividad FMNAT correspondiente a la conversión de FMN en FAD.

Al determinar la actividad RFK a saturación de ATP, se observó en todos los casos una disminución de la actividad a concentraciones de RF superiores a 2 - 3 μM (Figura 4.3.), lo que sugiere una inhibición por exceso de sustrato. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación general para un mecanismo cinético con inhibición por sustrato (Ec. 4), permitiendo, en la mayoría de los casos, obtener los valores de k_{cat} , K_m^{RF} y K_i (Tabla 4.1.). En general, para la mayoría de los mutantes de CaFADS se observó una potente inhibición a concentraciones de RF incluso menores que para el caso de la proteína WT. En algunas de las variantes, este hecho imposibilitó el ajuste realista de los datos experimentales a la ecuación, impidiendo determinar el valor de parámetros cinéticos del proceso ya que K_i es mayor que K_m^{RF} . Al determinar la actividad RFK a la concentración de RF a la cual se tiene la máxima actividad variando la concentración de ATP no se observó inhibición por sustrato (Figura 4.3.). Por tanto, estos datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 3), obteniendo los valores de k_{cat} y K_m^{ATP} .

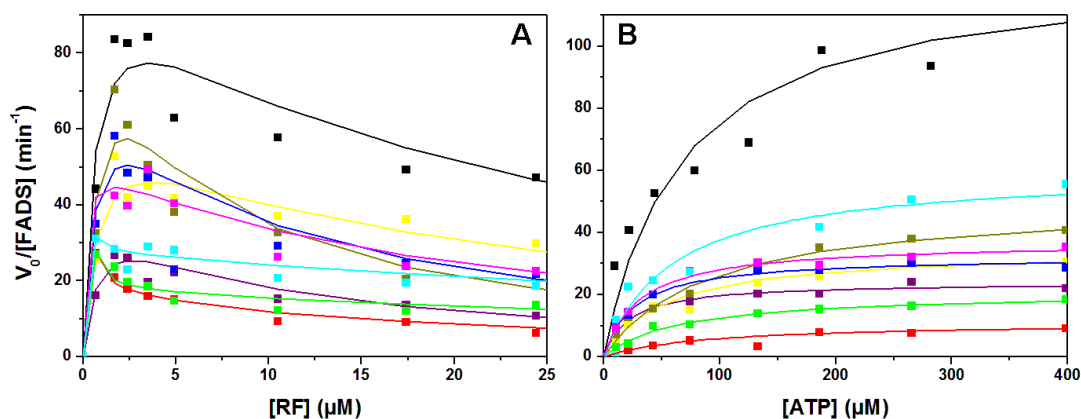


Figura 4.3. Cinética en estado estacionario de la actividad RFK a concentración saturante de ATP (A) y a concentración saturante de RF (B), de CaFADS WT (negro), R66A (rojo), R66E (morado), K202A (amarillo), E203A (amarillo oscuro), D298A (azul), D298E (verde), E301A (rosa) y E301K (azul claro).

La Tabla 4.1. recoge los parámetros cinéticos de la actividad RFK obtenidos para la CaFADS WT y las formas mutadas, tanto a concentración de ATP saturante como a la concentración de RF a la que se obtiene la máxima k_{cat} .

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos en estado estacionario para la actividad RFK (RF → FMN (+FAD)) de las variantes de CaFADS. Los datos se han obtenido a 25°C, en PIPES 20 mM, pH 7.0, 0.8 mM MgCl₂.

	[ATP] saturante				[RF] de la máxima k_{cat}		
	$^{app}k_{cat}$ (min ⁻¹)	K_m^{RF} (μM)	K_i (μM)	k_{cat} / K_m^{RF} (min ⁻¹ μM ⁻¹)	$^{app}k_{cat}$ (min ⁻¹)	K_m^{ATP} (μM)	k_{cat} / K_m^{ATP} (min ⁻¹ μM ⁻¹)
WT	104.6	0.62	20.1	168.7	126.2	66.9	1.9
R66A	--	--	--	--	10.9	87.0	0.13
R66E	42.1	0.89	8.2	47.3	23.8	21.5	1.1
K202A	63.8	0.74	19.4	86.2	34.5	52.7	0.66
E203A	115.8	1.2	4.5	99.8	50.1	89.2	0.56
D298A	78.4	0.66	8.7	118.9	32.2	26.6	1.2
D298E	--	--	--	--	20.9	64.9	0.32
E301A	53.0	0.16	18.0	331.1	36.7	30.9	1.2
E301K	--	--	--	--	59.9	59.3	1.0

* En los mutantes R66A, D298E y E301K no fue posible determinar los parámetros cinéticos debido a la elevada inhibición por sustrato producida, que tiene lugar a concentraciones de RF menores que para la WT.

En la reacción a concentración saturante de ATP se observa por lo general una disminución significativa en los valores de k_{cat} (entre 1.5 y 2.5 veces) de las formas mutadas con respecto a la WT y a E203A CaFADS. Los valores de K_m^{RF} son del mismo orden en todas las variantes, destacando solo un incremento de este parámetro en 2 veces para el mutante E203A, y una disminución en unas 5 veces para E301A. En general, esto resulta en un gran incremento en la eficiencia catalítica para la variante E301A con respecto a la proteína WT, mientras que la mayoría de los mutantes son menos eficientes (particularmente R66E, con aproximadamente la cuarta parte de eficiencia).

Los parámetros obtenidos a concentración fija de RF en función de la concentración de ATP indican valores de k_{cat} para las distintas variantes entre 2 y 10 veces menores que para la WT, siendo E301K y E203A las variantes donde este parámetro disminuye menos. Los mutantes R66E, D298A y E301A presentan un valor de K_m^{ATP} de unas 2 - 3 veces menor que la WT, mientras que el resto de variantes mantienen valores similares. Debido fundamentalmente a las disminuciones descritas

en los valores de k_{cat} , todos los mutantes presentan una menor eficiencia catalítica, siendo el descenso más significativo para los mutantes K202A, E203A, y, particularmente, para R66A y D298E, variantes que además muestran una alta inhibición por sustrato en la titulación con RF a saturación de ATP.

2.2. Actividad FMNAT de los mutantes de CaFADS

Ninguna de las variantes de CaFADS mostró inhibición por sustrato cuando se determinó su actividad FMNAT tanto a concentración saturante de FMN como de ATP (Figura 4.4.). Por tanto, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 3), obteniendo los valores de k_{cat} , K_m^{ATP} y K_m^{FMN} que se recogen en la Tabla 4.2. Los valores de k_{cat} obtenidos en la reacción a concentración saturante de ATP y en la reacción a concentración saturante de FMN, fueron en todos los casos muy similares entre ellos, como se podía esperar, por lo que los datos de k_{cat} presentados corresponden al valor medio entre ambos.

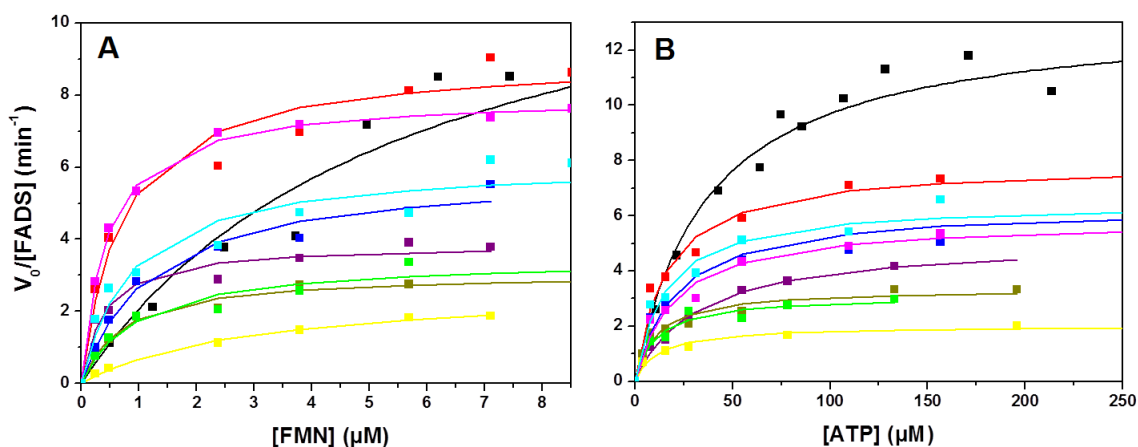


Figura 4.4. Cinética en estado estacionario de la actividad FMNAT a concentración saturante de ATP (A) y a concentración saturante de FMN (B), de CaFADS WT (negro), R66A (rojo), R66E (morado), K202A (amarillo), E203A (amarillo oscuro), D298A (azul), D298E (verde), E301A (rosa) y E301K (azul claro).

Los parámetros cinéticos k_{cat} , K_m^{FMN} y K_m^{ATP} correspondientes a la conversión del FMN en FAD (actividad FMNAT) para la CaFADS WT fueron 13.5 min^{-1} , $5.9 \text{ } \mu\text{M}$, y $37.1 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente (Tabla 4.2), lo que supone una ligera disminución en la actividad de la proteína a 25°C con respecto a datos anteriores a 37°C (Serrano, *et al.*, 2012b). Las mutaciones estudiadas presentaron una actividad FMNAT de entre 1.5 y 6 veces menor que la WT.

Cabe destacar que los valores de K_m^{FMN} obtenidos para todos los mutantes son bastante menores (entre 2 y 15 veces) que el valor de la WT. Además, las variantes de CaFADS estudiadas presentan también un valor ligeramente inferior de K_m^{ATP} que el

de la proteína WT, particularmente R66A, K202A, E203A, D298E, y E301K (entre 2.5 y 3.5 veces) (Tabla 4.2.).

Tabla 4.2. Parámetros cinéticos en estado estacionario para la actividad FMNAT de las variantes de CaFADS. Los datos se han obtenido a 25°C, en PIPES 20 mM, pH 7.0, 0.8 mM MgCl₂.

	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m^{FMN} (μM)	K_m^{ATP} (μM)	k_{cat} / K_m^{FMN} (min ⁻¹ μM ⁻¹)	k_{cat} / K_m^{ATP} (min ⁻¹ μM ⁻¹)
WT	13.5	6.0	37.1	2.25	0.36
R66A	8.5	0.69	15.8	12.3	0.54
R66E	4.5	0.38	31.1	11.8	0.14
K202A	2.3	2.9	12.1	0.80	0.19
E203A	3.2	0.70	10.8	4.6	0.30
D298A	6.1	1.2	20.7	5.2	0.30
D298E	3.3	0.95	10.4	3.5	0.31
E301A	6.9	0.42	19.7	16.4	0.35
E301K	6.3	0.85	15.3	7.4	0.41

* Los valores de k_{cat} mostrados corresponden al valor medio de los valores de k_{cat} obtenidos para concentración de ATP saturante y para concentración de FMN saturante.

El cociente k_{cat} / K_m^{FMN} indica que las variantes de CaFADS son algo más eficientes que la WT, particularmente R66A, R66E y E301A (entre 5 y 7 veces), como consecuencia de sus bajos valores de K_m^{FMN} . Sin embargo, la eficiencia catalítica de K202A es 3 veces menor que la de la forma WT como consecuencia de una notable disminución en k_{cat} y un valor de K_m^{FMN} mayor que en el resto de variantes.

3. Parámetros de interacción de las variantes de CaFADS con sus diferentes ligandos

Se analizaron los parámetros de interacción de las distintas formas de CaFADS con RF, FAD, FMN y ATP mediante ITC en PIPES 20 mM, pH 7.0 y MgCl₂ 10 mM, obteniendo los perfiles que se muestran en la Figura 4.5.

El análisis de la interacción de RF, FAD y FMN con la CaFADS WT mostró un único sitio de unión para FAD y FMN, con valores de K_d de 0.8 y 7.8 μM, respectivamente. En el caso de la titulación con RF se encontraron dos sitios de unión con un valor mayor de K_d ($K_d^{RF} = 24.1$ μM), (Tabla 4.3.).

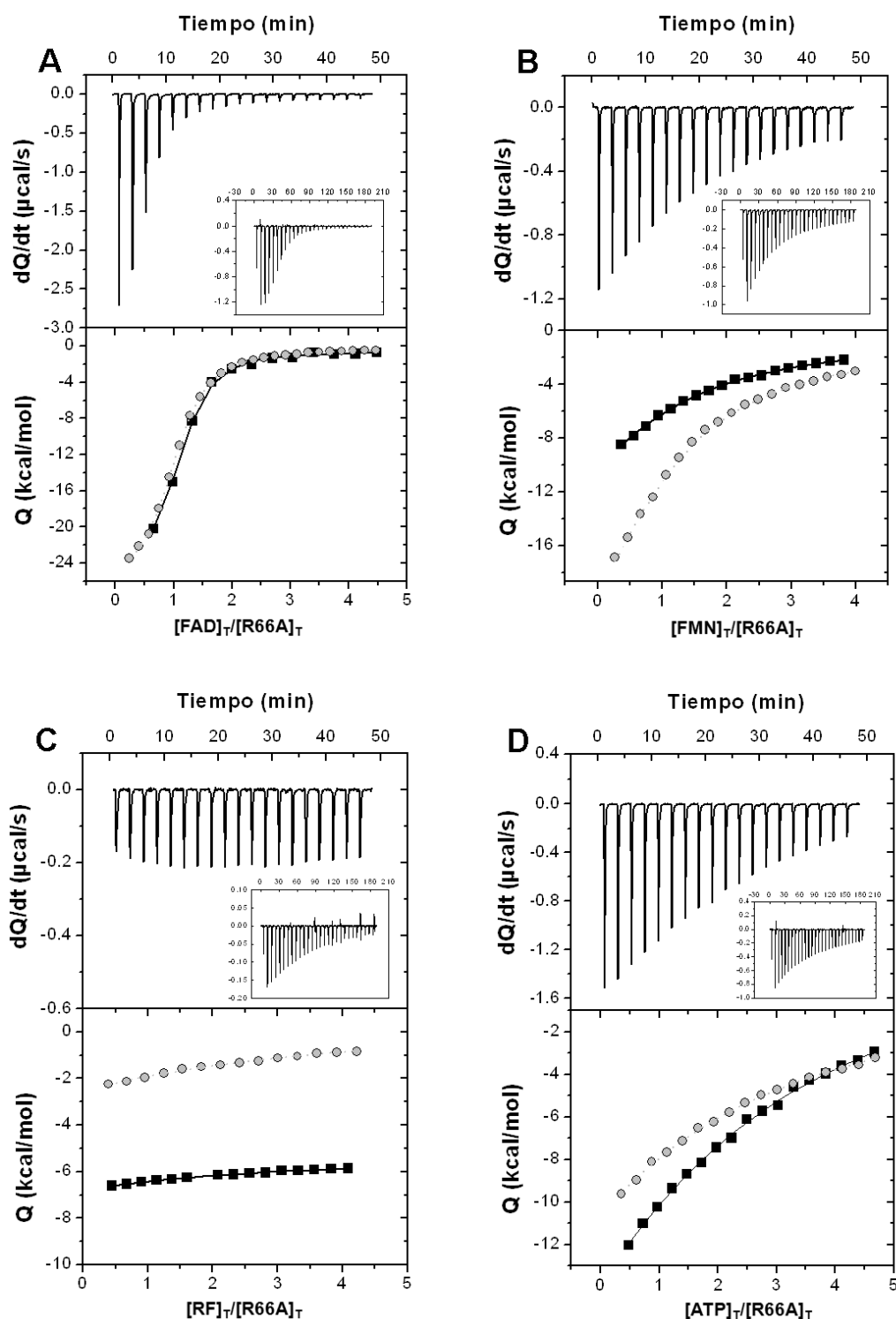


Figura 4.5. Titulaciones calorimétricas para la interacción entre la variante R66A de CaFADS y FAD (A), FMN (B), RF (C) y ATP (D) en PIPES 20 mM, pH 7.0. y MgCl_2 10 mM. En las partes superiores se muestran los termogramas de la interacción de R66A y la forma WT (en el interior). La parte inferior de las figuras muestra las isotermas de unión con los calores de reacción integrados para R66A (curva negra) y WT (curva gris).

Tabla 4.3. Parámetros de interacción de la CaFADS WT y los mutantes con RF, FAD, FMN, ATP y FMN en presencia de ADP obtenidos por ITC. Datos a 25°C en PIPES 20 mM, pH 7.0, y 10 mM MgCl₂.

	K_d^{RF} (μ M)	K_d^{FAD} (μ M)	K_d^{FMN} (μ M)	K_d^{ATP} (μ M)
WT	24.1*	0.78	7.8	26.0*
R66A	45.6*	1.9	66.2	148.5*
R66E	4.4	30.2	89.0	227.8*
K202A	31.4*	6.4	12.2	64.5*
E203A	10.3	61.8	7.2	43.4*
D298A	5.3*	3.0	18.8	32.9*
D298E	17.9*	3.7	19.1	46.2*
E301A	58.0*	2.4	5.9	60.7*
E301K	142.9*	2.9	13.6	60.2*

* Estos valores de K_d corresponden al valor medio de los valores de K_d de los dos sitios de unión detectados ($K_{d,av}$).

De igual modo, las variantes de CaFADS producidas presentan un único sitio de unión para el FAD y el FMN y dos sitios para la RF, salvo los mutantes R66E y E203A que pierden uno de los sitios de unión para este último ligando. Además, los mutantes muestran algunas diferencias en los valores de las constantes de disociación respecto a la WT (Tabla 4.3.). En concreto, para la unión de RF, se observa un aumento en el valor de $K_{d,av}$ de 2.5 veces para E301A y de 6 veces para E301K con respecto a la WT, mientras que este parámetro disminuye significativamente para los mutantes R66E, D298A y E203A (que presentan valores 6, 4 y 2 veces menores que la WT, respectivamente). La unión del FAD es, en todas las variantes de CaFADS, más débil que en la forma WT, pero particularmente para los mutantes R66E y E203A, que presentan una afinidad por este ligando 30 y 60 veces menor, respectivamente, que la enzima WT. Por su parte, la unión de FMN a las distintas variantes también es en general más débil que en la proteína WT, con la excepción de los mutantes E203A y E301A. El efecto es particularmente significativo para los mutantes R66A y R66E, con valores de K_d de 9 y 11 veces superior al valor de la forma WT, respectivamente.

Las titulaciones permitieron también determinar los componentes entrópico y entálpico de las interacciones (Figura 4.6.). La unión de RF, FAD y FMN a la CaFADS WT está dirigida por el componente entálpico con una contribución entrópica desfavorable, aunque en la unión de la RF ambas componentes son notablemente inferiores en magnitud. Este último efecto ha sido relacionado con la menor polaridad

de la RF respecto a FAD y FMN. Las mutaciones introducidas en la CaFADS producen también variaciones en las contribuciones de los componentes entrópico y entálpico.

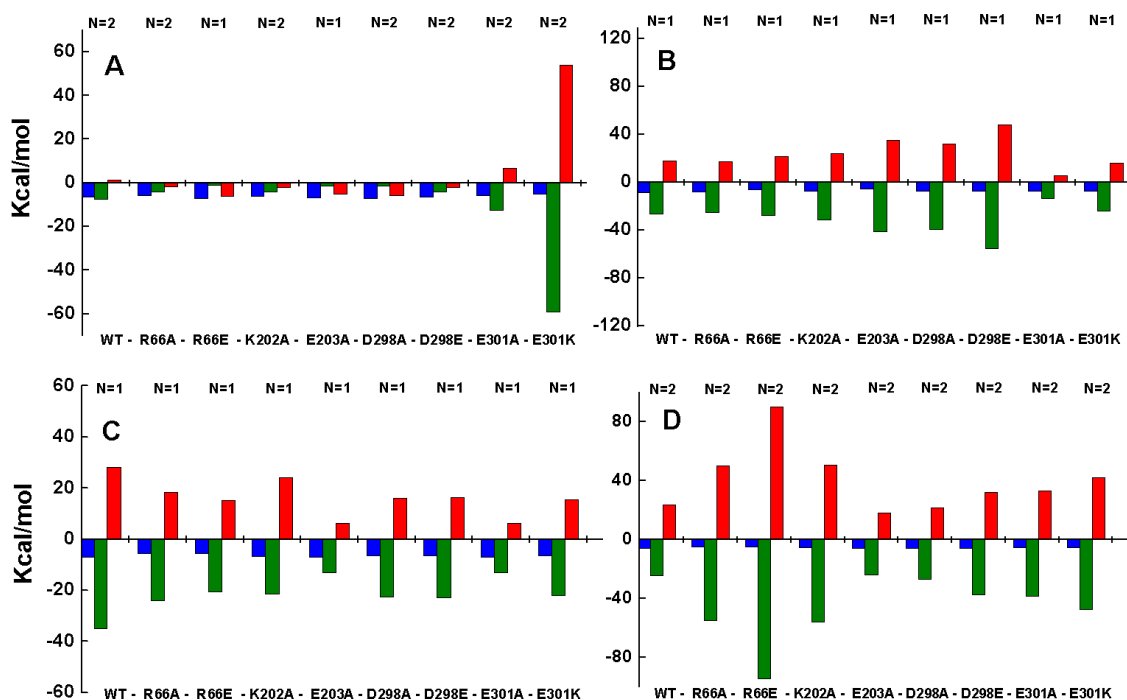


Figura 4.6. Contribuciones termodinámicas de la interacción de las variantes de CaFADS con RF (A), FAD (B), FMN (C) y ATP (D). La energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH), y la entropía ($-T\Delta S$) se representan en barras azules, verdes y rojas, respectivamente. La estequiometría de la interacción viene indicada como N.

En general, la unión de la RF a las variantes de CaFADS está dirigida tanto por el componente entrópico, que en estos casos se vuelve ligeramente favorable, como por el componente entálpico que se hace menos favorable que en la WT. La excepción a este comportamiento se produce solamente en el caso de los mutantes E301A y E301K, que presentan una contribución entálpica más favorable a la unión, mientras el componente entrópico se vuelve notablemente desfavorable. Concretamente, cabe destacar la magnitud de ambas contribuciones en el caso del mutante E301K, mucho mayores que en el resto de variantes y que no llegan a compensarse, resultando en un valor de ΔG algo menor. Como se ha mencionado ya antes, la unión de FAD está ligeramente menos favorecida en las formas mutadas respecto a la proteína WT, estando el proceso dirigido entálpicamente con un factor entrópico desfavorable. En general las mutaciones aumentan la magnitud de ambas contribuciones con respecto a la WT, excepto en los mutantes E301A y E301K, donde ambas contribuciones disminuyen en magnitud. Por último, la unión de FMN en las formas mutadas de CaFADS está dirigida entálpicamente con oposición del factor entrópico, siendo ambas contribuciones de menor magnitud que para la WT.

La interacción del ATP con la CaFADS mostró dos sitios de unión en todas las variantes, con un valor de $K_{d,av}^{ATP}$ de 26.0 μ M para la WT y valores algo mayores para las formas mutadas, sobre todo en R66A y R66E, donde el valor de $K_{d,av}^{ATP}$ es unas 5 y 10 veces mayor, respectivamente, sugiriendo que las mutaciones reducen la afinidad por ATP (Tabla 4.3.). Esta unión está dirigida entálpicamente con la oposición de un factor entrópico en todas las variantes de CaFADS. La magnitud de ambas contribuciones aumenta en todos los mutantes respecto a la WT (excepto en E203A y D298A que presentan contribuciones similares a la WT) siendo estas diferencias más significativas en los mutantes R66A, R66E y K202A.

El análisis de la interacción de FMN con complejos de CaFADS:ADP mostró dos sitios de unión en el caso de la WT, con valores de K_d de 0.04 y 0.90 μ M, respectivamente, resultando la unión favorecida tanto por el componente entálpico como por el entrópico. El estudio de esta interacción con los mutantes de CaFADS produjo unos perfiles calorimétricos con dos sitios de unión aparentes, pero que no se ajustaron al modelo de sitios independientes utilizado para el ajuste de los datos de la WT, y que podrían corresponder a un modelo de unión diferente en el que ambos sitios podrían presentar cooperatividad. Esto puede sugerir cambios en la interacción con FMN en presencia de ADP que deberán ser tenidos en cuenta en estudios posteriores.

CAPÍTULO 5:

Discusión

Los residuos K202, E203, D298 y E301 de la CaFADS se encuentran localizados en el dominio C-terminal de CaFADS, mientras que R66 se localiza en el N-terminal. Todos ellos están localizados en la interfase entre los dominios N- y C-terminal de cada dos protómeros que forman cada uno de los dos trímeros que se ha propuesto que pueden participar en la formación del oligómero de esta proteína (Herguedas, 2011). En este trabajo se ha analizado el efecto producido en los parámetros de interacción con los sustratos y en los parámetros cinéticos de las actividades RFK y FMNAT de la CaFADS cuando se han mutado estas posiciones, con objeto de determinar la posible relevancia de la forma oligomérica en la actividad de la proteína y, en consecuencia, su posible implicación en la homeostasis de las flavinas en procariotas.

La caracterización espectroscópica indica que las variantes de CaFADS no producen alteraciones significativas en la estructura secundaria y terciaria. Sin embargo, los datos de CD sugieren pequeños cambios conformacionales en el entorno de los aminoácidos aromáticos, por lo que las mutaciones podrían desestabilizar ligeramente alguna región de la estructura tridimensional en el entorno de los aminoácidos aromáticos que dan lugar a la señal de CD en el UV-cercano, como queda reflejado en la pequeña disminución en la intensidad de la señal de CD en esta región (Figura 4.1.). Además, tanto las formas libres como los complejos de CaFADS:ADP mantienen la capacidad de interacción con los ligandos flavínicos, como puede deducirse de la aparición de espectros diferenciales en la región del UV-Visible similares a los mostrados por la proteína WT tras titulación con dichos ligandos. Los desplazamientos observados en las posiciones de los máximos y mínimos en estos espectros diferenciales también indican que los residuos mutados intervienen de alguna forma en la interacción con estos ligandos (Figura 4.2.).

Los parámetros de interacción obtenidos por ITC sugieren que el residuo R66 del módulo FMNAT es uno de los residuos críticos de la proteína para la unión de los ligandos y podría estar involucrado en la estabilización del FMN y el ATP en sus sitios de unión, ya que los mutantes de esta posición, R66A y R66E, producen una importante disminución de la afinidad por ambos ligandos (Tabla 4.3.). La unión del ATP además está dirigida por una contribución entálpica favorable muy grande a la que se opone un elevado factor entrópico, indicando cambios conformacionales en las interacciones producidas en la unión del ligando a estos mutantes. Este aumento en las contribuciones tanto entálpica como entrópica respecto a la WT se observa en mayor medida en el mutante R66E que en el R66A. Esto puede relacionarse con el mayor efecto que tiene en las interacciones la sustitución de un aminoácido cargado

positivamente por uno negativo. Además, a diferencia de la CaFADS WT, el mutante R66E presenta una baja afinidad por FAD, y un único sitio de unión para RF, aunque de mayor afinidad que el valor medio de los dos sitios de la WT. Estas observaciones indican que la mutación R66E tiene consecuencias importantes en la conformación del sitio de unión de los ligandos, que dificultan la unión del FAD e impiden la unión de la RF a uno de los dos sitios de unión que exhibe la WT para este ligando. Hay que tener en cuenta que el residuo R66 se localiza muy cerca del sitio de unión de las flavinas del módulo RFK del protómero adyacente, lo que explicaría la pérdida de uno de los dos sitios de unión descritos para RF en los mutantes, y que dicho residuo sea crítico para la unión de los ligandos en este módulo. La caracterización cinética también indica que la R66 es más crítica para la actividad RFK que para la actividad FMNAT. Las variantes R66A y R66E son muy poco eficientes en la actividad RFK, mientras que en el caso de la actividad FMNAT los efectos son mucho más suaves. El residuo R66 se encuentra situado en el bucle L4n del módulo N-terminal, que cierra parcialmente la cavidad del módulo RFK del protómero adyacente, y su cadena lateral interacciona a través de un puente salino con E268, que es base catalítica de la actividad RFK. (Figura 5.1.). Además, se propone que R66 también participa en el proceso de catálisis en el sitio RFK. Estos hechos explican la reducción de la actividad RFK encontrada al mutar este residuo, y apoyan la hipótesis de que en la forma oligomérica cada sitio activo estaría formado por residuos de su propio módulo y por residuos del otro módulo del protómero contiguo.

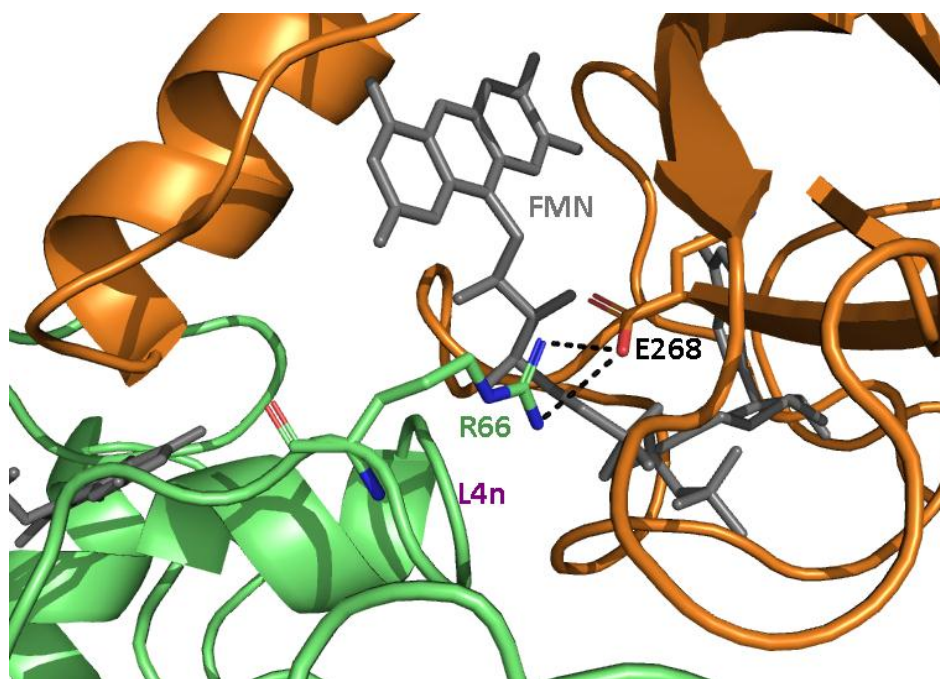


Figura 5.1. Detalle del entorno de R66 en la interfase entre dos módulos FMNAT (verde) y RFK (naranja) de dos protómeros adyacentes. Se muestra la interacción de R66 con la base catalítica E268.

Las mutaciones K202A y E203A tienen cierto efecto negativo, como todas las demás mutaciones estudiadas, en la actividad RFK, pero particularmente en el valor de k_{cat} para la actividad FMNAT. Además, en la variante E203A también se han detectado importantes cambios en los parámetros de unión de los ligandos, produciéndose la eliminación de uno de los sitios de unión de RF, y una importante reducción en la afinidad por el FAD. Esto sugiere que el residuo E203 es, por un lado, esencial para que la proteína adopte una conformación adecuada que permita la existencia de uno de los sitios de unión de RF, y por otro lado, es crítico para la interacción con el FAD. Además, aunque la afinidad de la unión del FMN al mutante E203A es similar a la WT, las contribuciones entálpica y entrópica para dicha unión disminuyen considerablemente. Esto sugiere que la carga negativa de la cadena lateral del residuo E203 podría establecer interacciones favorables que estabilicen la unión del FMN, favoreciendo al componente entálpico, pero liberar menos moléculas de agua de la superficie de la proteína durante la interacción debido a una conformación ligeramente distinta del sitio de unión. En cuanto al residuo K202, nuestros resultados sugieren que puede estar implicado en la unión de FAD y ATP, ya que el mutante K202A presenta una menor afinidad de unión por ambos ligandos, sobre todo por el ATP. Esta unión K202A:ATP presenta contribuciones entálpicas y entrópicas mayores que la WT, por lo que nuevamente la sustitución del residuo K202 afecta a las interacciones implicadas en la unión. Tanto el residuo K202 como el E203 se localizan en el bucle L1c (o Flap-I), que rodea el sitio catalítico del módulo RFK y está implicado en la unión de sus ligandos. Este bucle cambia su posición durante el proceso catalítico para permitir la apertura del sitio de unión y la entrada de los ligandos en el sitio RFK. Por ello, aunque los residuos no interactúen con los ligandos de forma directa, la sustitución por otros aminoácidos de distinta carga puede resultar en cambios conformacionales en el bucle, y que por tanto afectarían al sitio catalítico RFK y a la unión de los ligandos. La importante disminución en la actividad FMNAT ha de ser debida a una influencia de los residuos K202 y E203 en el módulo N-terminal del protómero adyacente. Esta influencia podría explicarse teniendo en cuenta que ambos residuos se encuentran muy cercanos en la estructura oligomérica a residuos como E130 y N131, pertenecientes al bucle L8n que configura la cavidad de unión de la flavina del módulo FMNAT. Concretamente el residuo K202 interactúa con la N131 mediante un puente de hidrógeno que no se mantiene en la variante mutada. Por ello, las mutaciones en los residuos K202 y E203 pueden afectar a la conformación del bucle L8n y por tanto al sitio de unión de la flavina en el dominio N-terminal.

Los datos obtenidos sugieren un papel menos relevante en los procesos de interacción con los ligandos para el residuo D298. Los mutantes en esta posición mantienen una estequiometría de unión igual a la de la forma WT. La única diferencia relevante en cuanto a los parámetros de interacción con los ligandos se observa en el aumento de la afinidad por RF que exhibe la variante D298A. Esto puede sugerir que la conformación del sitio de unión a RF en esta variante sea ligeramente distinta y quede más accesible al ligando. En cuanto al efecto en las actividades RFK y FMNAT se observa que el mutante D298E apenas presenta actividad RFK, con una alta inhibición por sustrato en la reacción a saturación de ATP, y tampoco es eficiente catalizando la reacción FMNAT, a pesar del bajo valor de K_m^{ATP} . Su baja eficiencia en ambas actividades sugiere que el aminoácido D298 es crítico tanto para la actividad RFK como para la FMNAT. Observando la estructura tridimensional, el residuo D298 se encuentra en el bucle L6c del dominio RFK. El aumento en la afinidad por la RF y la disminución de la actividad RFK de los mutantes de esta posición puede explicarse teniendo en cuenta que los bucles L6c y L4c (o Flap-II) se mueven, cerrando la cavidad de la RF tras su unión. Además, el bucle L6c influye también en el sitio activo del módulo FMNAT. Concretamente, el residuo D298 mantiene una interacción de puente de hidrógeno con la T165, localizada en la hélice α_6 n del módulo FMNAT del protómero adyacente, que flanquea la cavidad de este módulo. Además, el residuo D298, apunta con su cadena lateral cargada negativamente hacia el lugar de unión de los fosfatos del módulo FMNAT, por lo que su sustitución por un glutamato, con la cadena lateral de mayor longitud, podría situarse a una distancia más corta y producir una mayor repulsión de carga que hiciese menos favorable la localización de los ligandos. Esta hipótesis podría explicar la disminución de la actividad FMNAT y apoyaría nuevamente la hipótesis de la relevancia de la forma oligomérica en la catálisis.

Finalmente, los datos cinéticos sugieren que el residuo E301 no interviene en las etapas catalíticas RFK y FMNAT, ya que los mutantes de esta posición no ven afectadas sus actividades de forma significativa. Lo que sí cabe destacar es la disminución en el valor de K_m^{FMN} y en mayor medida de K_m^{RF} para el mutante E301A, lo que se traduce en una alta eficiencia catalítica. Por otra parte, la afinidad por RF disminuye al sustituir E301 por alanina, y en mayor medida al reemplazarlo por lisina. Estas observaciones pueden deberse a que el residuo E301, cargado negativamente, juega un papel importante en la estabilización de la RF en el sitio de unión RFK, y su sustitución hace menos favorable esta unión. El análisis de las contribuciones entrálpica y entrópica implicadas en la interacción con la RF muestra para los mutantes

de esta posición un cambio muy significativo. En el mutante E301A, y en muchísima mayor medida en el E301K, la unión de RF está dirigida por una contribución entálpica mucho más favorable, a la que se opone un factor entrópico desfavorable de gran magnitud. Esta diferencia tan relevante en las contribuciones sugiere que la carga positiva del residuo K301 de la forma mutante presenta favorece la unión de la RF, incrementando de forma significativa la entalpía de unión, y que al mismo tiempo, produce un cambio en la conformación del sitio de unión de tal forma que al producirse la interacción E301K:RF son liberadas de la superficie un menor número de moléculas de agua o bien quedan expuestas al solvente un mayor número de residuos hidrofóbicos, lo que resulta en un componente entrópico muy desfavorable. El residuo E301 se localiza en el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 1c$ del módulo RFK, y esta hélice se orienta con su N-terminal hacia el lugar de unión de los ligandos en el módulo FMNAT. Así, la sustitución del residuo E301, con carga negativa, por un residuo neutro o cargado positivamente produciría cambios en el entorno del sitio de unión del módulo FMNAT. Esto permite explicar el comportamiento de los mutantes, tanto en la afinidad de unión de la RF como en los factores entálpicos y entrópicos que participan en dicha interacción. Ello justificaría también el hecho de que la sustitución del E301 por un aminoácido cargado positivamente tenga un efecto aún más drástico en la conformación del sitio de unión, influyendo tanto en la afinidad como en la entalpía y entropía de unión.

CAPÍTULO 6:

Conclusiones

- Se han analizado los parámetros de unión de los ligandos y las actividades RFK y FMNAT de variantes mutadas de CaFADS en los residuos R66, K202, E203, D298 y E301, que están localizados en la interfase entre los dominios N- y C-terminal de cada dos monómeros que forman cada uno de los dos trímeros que se ha propuesto que pueden participar en la formación del oligómero de CaFADS. Concretamente se han caracterizado las variantes R66A, R66E, K202A, E203A, D298A, D298E, E301A, E301K.

- Todos los mutantes se pliegan, en una estructura tridimensional similar a la de la proteína WT, y mantienen la capacidad de unión de los ligandos, al menos en un sitio de unión.

- El residuo R66 es crítico para la actividad RFK y la unión de los ligandos. Además podría colaborar junto con E268 como base catalítica en la actividad RFK.

- Los residuos K202 y E203 juegan un papel fundamental en la unión de los ligandos y en la actividad FMNAT, lo que indica que influyen en la conformación del bucle L8n del módulo FMNAT.

- El residuo D298 es relevante para las actividades tanto RFK como FMNAT, y es menos crítico para la interacción de la proteína con sus ligandos.

- El residuo E301 juega un papel fundamental en la unión de los ligandos en el sitio FMNAT de CaFADS.

- La influencia de la sustitución de residuos de un módulo en la actividad del otro módulo apoya la hipótesis de que la forma oligomérica de CaFADS, en la que cada sitio activo estaría formado por residuos de su propio módulo y por residuos del otro módulo del protómero contiguo, juega un papel relevante durante la catálisis.

CAPÍTULO 7:

Bibliografía

- Efimov, I., Kuusk, V., Zhang, X. and McIntire, W. S.** (1998). "Proposed steady-state kinetic mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase produced by *Escherichia coli*." *Biochemistry* 37(27): 9716-23.
- Fieschi, F., Niviere, V., Frier, C., Decout, J. L. and Fontecave, M.** (1995). "The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 270(51): 30392-400.
- Frago, S., Martínez-Júlvez, M., Serrano, A. and Medina, M.** (2008). "Structural analysis of FAD synthetase from *Corynebacterium ammoniagenes*." *BMC Microbiol* 8: 160.
- Frago, S., Velázquez-Campoy, A. and Medina, M.** (2009). "The puzzle of ligand binding to *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase." *J Biol Chem* 284(11): 6610-9.
- Grill, S., Busenbender, S., Pfeiffer, M., Kohler, U. and Mack, M.** (2008). "The bifunctional flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase from *Streptomyces davawensis* produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin." *J Bacteriol* 190(5): 1546-53.
- Hagihara, T., Fujio, T. and Aisaka, K.** (1995). "Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 724-729.
- Herguedas, B.** (2011). Proteínas con dominios de unión a flavina: Bases estructurales de la biosíntesis de cofactores flavínicos en procariotas y de la interacción y transferencia de electrones entre flavoproteínas. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.
- Herguedas, B., Martínez-Júlvez, M., Frago, S., Medina, M. and Hermoso, J. A.** (2010). "Oligomeric state in the crystal structure of modular FAD synthetase provides insights into its sequential catalysis in prokaryotes." *J Mol Biol* 400(2): 218-30.
- Ishikawa, T., Matsumoto, A., Kato, T. J., Togashi, S., Ryo, H., Ikenaga, M., Todo, T., Ueda, R. and Tanimura, T.** (1999). "DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm." *Genes Cells* 4(1): 57-65.
- Jorns, M. S., Wang, B. and Jordan, S. P.** (1987). "DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride." *Biochemistry* 26(21): 6810-6.
- Kearney, E. B., Goldenberg, J., Lipsick, J. and Perl, M.** (1979). "Flavokinase and FAD synthetase from *Bacillus subtilis* specific for reduced flavins." *J Biol Chem* 254(19): 9551-7.
- Krupa, A., Sandhya, K., Srinivasan, N. and Jonnalagadda, S.** (2003). "A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer." *Trends Biochem Sci* 28(1): 9-12.
- Ladbury, J. E. and Chowdhry, B. Z.** (1996). "Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions." *Chem Biol* 3(10): 791-801.
- Mack, M., van Loon, A. P. and Hohmann, H. P.** (1998). "Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*." *J Bacteriol* 180(4): 950-5.
- Manstein, D. J. and Pai, E. F.** (1986). "Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*." *J Biol Chem* 261(34): 16169-73.

- Mayhew, S. G. and Wassink, J. H.** (1980). "Continuous fluorescence assay, partial purification and properties of flavokinase from *Megasphaera elsdenii*." *Methods Enzymol* 66: 323-27.
- Müller, F.** (1991). Free Flavins: Syntheses, Chemical and Physical Properties. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Müller, F., Ed. Boca Raton, FL, CRC Press, Inc. 1: 1-71.
- Murty, C. V. and Adiga, P. R.** (1982). "Pregnancy suppression by active immunization against gestation-specific riboflavin carrier protein." *Science* 216(4542): 191-3.
- Rossmann, M. G., Moras, D. and Olsen, K. W.** (1974). "Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein." *Nature* 250(463): 194-9.
- Serrano, A.** (2011). Proteínas dependientes de flavina: biosíntesis de cofactores flavínicos y procesos de interacción y transferencia de electrones. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.
- Serrano, A., Ferreira, P., Martínez-Júlvez, M. and Medina, M.** (2012a). "The prokaryotic FADS synthetase family: a potential drug target."
- Serrano, A., Frago, S., Herguedas, B., Martínez-Júlvez, M., Velázquez-Campoy, A. and Medina, M.** (2012b). "The riboflavin kinase catalytic site of bifunctional FAD synthetase from *Corynebacterium ammoniagenes*."
- Sun, M., Moore, T. A. and Song, P. S.** (1972). "Molecular luminescence studies of flavins. I. The excited states of flavins." *J. Am. Chem. Soc.* 94: 1730-1740.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. and Kroemer, G.** (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* 397(6718): 441-6.
- van den Berg, P. A. W., Feenstra, K. A., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. and Visser, A. J. W. G.** (2002). "Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics." *J. Phys. Chem. B* 106: 8858-8869.
- Wang, W., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H. and Kim, S. H.** (2003). "Crystal structure of a flavin-binding protein from *Thermotoga maritima*." *Proteins* 52(4): 633-5.
- Wang, W., Kim, R., Yokota, H. and Kim, S. H.** (2005). "Crystal structure of flavin binding to FAD synthetase of *Thermotoga maritima*." *Proteins* 58(1): 246-8.
- Weber, G.** (1950). "Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide." *Biochem J* 47(1): 114-21.
- Zanetti, G. and Aliverti, A.** (1991). Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, Ed. Boca Raton, CRC Press. 2: 305-351.

