



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular**

Dinámica estructural y consolidación de complejos proteicos funcionales involucrados en la biosíntesis de centros Fe-S

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Bioq. Karl Ellioth Sewell Araya

Director de tesis: Dr. Javier Santos

Codirectora: Dra. Luciana Capece

Consejero de Estudios: Dr. Matías Blaustein

Lugar de trabajo: IB3-UBA / FBMC-FCEN-UBA

Buenos Aires, 2024

Dinámica estructural y consolidación de complejos proteicos funcionales involucrados en la biosíntesis de centros Fe-S

Los centros Fe-S son cofactores comúnmente utilizados en múltiples sistemas proteicos de los seres vivos. Su aparición se remonta a los albores mismos de la historia de la vida, así como la aparición de los sistemas encargados de sintetizarlos. Buscamos desentrañar los mecanismos moleculares que determinan la síntesis de centros Fe-S para el complejo desulfurasa humano, compuesto por NFS1, ISD11, ACP, ISCU y FXN. Cada una de ellas lleva adelante un rol particular dentro del complejo y su disfunción se manifiesta específicamente en distintas enfermedades de origen genético. En el presente trabajo se estudió al heterodímero compuesto por ACP-ISD11 desde distintos puntos de vista. Se constató su estabilidad conformacional y termodinámica como una entidad con plegado y estructura independientes, así como su función como un inductor conformacional para NFS1. Por otro lado, se llevaron adelante simulaciones computacionales de dinámica molecular para el complejo entero en presencia y ausencia de FXN. Estas permitieron constatar que FXN modula la estabilidad conformacional del super complejo puntualmente en la movilidad interna de la ISCU y la porción C-terminal de NFS1. Se generaron variantes puntuales para evaluar la relevancia de esta zona de NFS1, así como la de otras posiciones en la porción del sitio activo cerca del PLP, y en el *loop* catalítico que contiene a la Cys 381. A la vez, se encontró una actividad desulfurasa exacerbada en la variante C158A, una posición cercana al PLP. En paralelo se puso a punto un nuevo método para el seguimiento en tiempo real de la reacción de desulfuración utilizando $1D^H$ -RMN y permitiendo la estimación de distintos parámetros cinéticos.

Palabras clave: Ataxia de Friedreich, centros Fe-S, mitocondria, Desulfurasa (NFS1), Frataxina (FXN), ISD11, ISCU, ACP, Ferredoxina (FDX2), maquinaria de síntesis de centros Fe-S, cofactores, respiración celular, oxidación, metaloenzimas, hierro.

Structural dynamics and consolidation of functional protein complexes involved in the biosynthesis of Fe-S centers

Fe-S clusters are co-factors commonly found in multiple protein systems of living organisms. Their appearance dates back to the very dawn of the history of life, as well as the appearance of the systems responsible for synthesizing them. We sought to unravel the molecular mechanisms that determine the synthesis of Fe-S centers for the human desulfurase complex, composed of NFS1, ISD11, ACP, ISCU and FXN. Each of them carries out a particular role within the complex and their dysfunction manifests specifically in different diseases of genetic origin. In the present work, the heterodimer composed of ACP-ISD11 was studied from different points of view. Its conformational and thermodynamic stability was confirmed as an independent entity with its own folding path and structure, as well as its function as a conformational inducer for NFS1. On the other hand, computational molecular dynamics simulations were carried out for the entire complex in the presence and absence of FXN. These allowed us to verify that FXN modulates the conformational stability of the supercomplex specifically in the internal mobility of the ISCU and the C-terminal portion of NFS1. By the generation of point variants we evaluated the relevance of this area of NFS1, as well as that of other positions in the portion of the active site near the PLP, and in the catalytic loop that contains Cys381. At the same time, an exacerbated desulfurase activity was found in the C158A variant, a position close to the PLP. In parallel, a new method was developed for real-time monitoring of the desulfurization reaction using 1DH-NMR and allowing the estimation of different kinetic parameters.

Keywords: Friedreich's ataxia, Fe-S clusters, mitochondria, Desufurase (NFS1), Frataxin (FXN), ISD11, ISCU, Ferredoxin (FDX2), ISC machinery, co-factors, cellular respiration, oxidation, metalloenzymes, iron.

Índice de abreviaturas

2Fe-2S: Dos hierro, dos azufres

4-PP: Fosfopantoteína

ACP: Proteína acarreadora de acilos

CIA: Enzima ensambladora de centros hierro-azufre citoplasmática

CTS: Sección carboxilo terminal

DMPD: N,N-Dimetil-p-fenilendiamina

DTT: Ditioneitol

Fe-S: Ferro Sulfurados

FRDA: Ataxia de Friedreich

FXD2: Ferredoxina 2

FXN: Frataxina

HPLC: Cromatografía de alta eficiencia

ISC: Centros hierro azufre

ISCU2: Enzima ensambladora de centros hierro-azufre

ISD11: Deficiente en centros hierro- azufre 11

NADPH: Nicotinamida-Adenina dinucleótido fosfato

NFS1: Cys desulfurasa

NIA: El complejo NFS1/ISD11/ACP

NIAU: El complejo NFS1/ISD11/ACP/ISCU2

NIAUF: El complejo NFS1/ISD11/ACP/ISCU2/FXN

PLP: Pirididoxal-5'-fosfato

Rg: Radio de giro

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMSD: Desviación cuadrática media

RMSF: Fluctuación Cuadrática media

SDS-PAGE: Elecetroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

SEC: Cromatografía de exclusion molecular

Índice

CAPÍTULO 1: Introducción a los centros Fe-S y su maquinaria de síntesis

1.1. Introducción	13
1.2. Los centros Fe-S y su rol en los seres vivos	13
1.3. La historia evolutiva de la maquinaria de síntesis de centros Fe-S	17
1.4. El complejo desulfurasa humano	22
1.5. Aspectos estructurales y funcionales relevantes	24
1.6. Relaciones estructura actividad en las maquinarias de síntesis de centros Fe-S	27
1.7. Desulfuración del sustrato L-Cys	28
1.8. Cambios conformacionales en el loop catalítico y transferencia de persulfuro	29
1.9. Ensamblado de centros Fe-S	30
1.10. Transferencia y maduración de centros Fe-S	31
1.11. La alteración funcional de las proteínas de la maquinaria deriva en enfermedades genéticas graves	32

CAPÍTULO 2: Materiales y métodos

2.1. Métodos Bioinformáticos.....	35
2.1.1. Búsqueda de ortólogos de las subunidades del complejo Desulfurasa en organismos modelo.....	35
2.1.2. Construcción del árbol taxonómico	36
2.1.3. Búsqueda de motivos estructurale	36

2.1.4. Búsqueda de motivos estructurales	37
2.2. Expresión y purificación de proteínas	38
2.2.1. Purificación del heterodímero ACP-ISD11	38
2.2.2. Expresión y Purificación de NFS1 humana	40
2.2.3. Expresión y Purificación del Supercomplejo Humano (NFS1/ACP-ISD11) ₂ y sus variantes.....	40
2.2.4. Expresión y purificación de la proteína ISCU2	41
2.2.5. Expresión y Purificación de Frataxina Humana.....	42
2.3. Medición de la actividad enzimática del complejo desulfurasa (NFS1/ACP-ISD11) ₂	43
2.3.1. Detección de L-alanina a punto fijo por ¹ H-RMN 1D	46
2.3.2. Límites de detección y cuantificación.....	48
2.4. Caracterización espectroscópica de variantes NFS1 en el subcomplejo (NFS1/ACP-ISD11) ₂	50
2.5. Simulaciones de dinámica molecular	51
2.5.1. El campo de fuerza y las herramientas utilizadas (AMBER)	51
2.5.2. Herramientas para el análisis de trayectorias.....	53
2.5.3. Simulación del Hetero dímero ISD11-ACP	55
2.5.4. Simulación del super complejo Desulfurasa en presencia y ausencia de FXN.....	56
2.6. Análisis HPLC de muestras de péptidos y proteínas	58
2.6.1. Análisis HPLC de fase inversa del contenido de PLP en variantes NFS1	58

CAPÍTULO 3: El rol estructural del heterodímero ACP-ISD11 en la solubilidad y estabilidad conformacional de NFS1

3.1. Contexto	60
3.1.2. ISD11 y su relación con ACP	60
3.1.2. El heterodímero ACP-ISD11 y sus posibles roles estructurales en el complejo desulfurasa.....	62
3.1.3. Cristalización y caracterización del heterodímero ACP-ISD11 humano.....	66
3.2. Objetivos	70
3.3. Resultados	70
3.3.1. Relación del heterodímero ACP-ISD11 con la actividad y estabilidad de NFS1 humana	70
3.3.2. Efecto de la expresión del heterodímero ACP-ISD11 en la estabilización de NFS1 en el proceso de purificación.....	72
3.3.4. Análisis por dinámica molecular del heterodímero ACP-ISD11	76
3.3.5. Análisis ampliado por dinámica molecular de las implicaciones estructurales y conformacionales del resto acilo en el core de ISD11	81
3.4. Discusión	85

CAPÍTULO 4 Estudio del super complejo de síntesis de centros Fe-S mediante simulaciones computacionales de la dinámica molecular.

4.1. Contexto	89
4.1.1. Dinámica conformacional, paisajes de energía y simulaciones	89
4.1.2. Simulaciones de la dinámica molecular como herramienta para ver más allá de la estructura	91
4.1.3. Dinámica molecular aplicada al estudio del super complejo desulfurasa	93
4.1.4. Estructuras disponibles para el estudio por dinámica molecular	96
4.1.5. La estructura elegida como punto de partida	99
4.2. Objetivos	105
4.3. Resultados	105
4.3.1. La Dinámica de la L-Cys desulfurasa NFS1 y su modulación por la FXN	105
4.3.2. Los movimientos moleculares de Trp155 controlan la arquitectura del sitio de ensamblaje de ISCU	112
4.4. Discusión	115

CAPÍTULO 5: Desentrañando las relaciones entre estructura y actividad del complejo L-Cys desulfurasa NFS1

5.1. Contexto	121
5.2. Objetivos	121
5.3. Resultados	121
5.3.1. Implementación de la detección de L-Ala mediante espectroscopía de RMN para evaluar la actividad de la L-Cys desulfurasa de NFS1 y su modulación alteraciones en la secuencia de NFS1 y/o por FXN	129
5.3.2. Expresión y caracterización biofísica de variantes de cisteína desulfurasa NFS1.....	133
5.3.3. La actividad de las Variantes de cisteína desulfurasa NFS1	140
5.4.Discusión.....	146

CAPÍTULO 6: Conclusiones y Discusión General.....156

Referencias.....	168
Dedicatoria	172
Agradecimientos	173



*Salomon saith. There is no new thing upon the earth.
So that as Plato had an imagination, that all knowledge was but remembrance; so
Salomon giveth his sentence, that all novelty is but oblivion.*

Francis Bacon: Essays LVIII.

CAPÍTULO 1: Introducción a los centros Fe-S y su maquinaria de síntesis

1.1. Introducción

Los centros ferrosulfurados (Fe-S) son complejos químicos de coordinación constituidos por átomos de hierro, azufre y cadenas laterales de aminoácidos. Estos cumplen funciones biológicas específicas como cofactores dentro de las estructuras proteicas. Si bien pueden generarse espontáneamente en soluciones que contengan hierro y sulfuros en un contexto reductor, el grupo Fe-S no es estable en solución acuosa y es casi siempre encontrado en el contexto de péptidos y proteínas, donde forma enlaces de coordinación adicionales con cadenas laterales de aminoácidos como histidina, cisteína o aminoácidos ácidos (Lill y Freibert 2020), a la vez que quedan protegidos del oxígeno.

Una de las metas principales de este trabajo de tesis fue lograr avanzar en el conocimiento respecto de las vías bioquímicas y moleculares que llevan a la síntesis de centros Fe-S. En este contexto, es de suma importancia tener presente algunas de las características químicas que tienen los complejos de hierro en general y los que llevan azufre como ligando en particular.

1.2. Los centros Fe-S y su rol en los seres vivos

En los sistemas vivos se puede considerar que los centros Fe-S se encuentran entre los catalizadores más antiguos y ampliamente distribuidos. De hecho, se especula con que hayan protagonizado las biocatálisis primordiales en el origen mismo de la vida (Fontecave 2006); dado que pueden formarse espontáneamente en

soluciones acuosas reductoras que contengan hierro ferroso y sulfuros. Una situación frecuente en los entornos deficientes en oxígeno de la tierra primigenia .

Los centros Fe-S encuentran en el centro del metabolismo energético de todos los organismos. Estos grupos son esenciales para múltiples funciones celulares entre las que se destacan: la respiración celular , la reparación del ADN (Shi et al. 2021; Fuss et al. 2015) y como cofactores para múltiples enzimas como ferredoxina, succinato deshidrogenasa y aconitasa (Adam et al. 2006). Su versatilidad funcional se explica por las características únicas que poseen, como la capacidad de transferencia de electrones, la formación de variedad de complejos de coordinación, o la sensibilidad a la oxidación (Daniel y Danson 1995).

Existen razones estructurales por las que los centros Fe-S son tan eficientes en la transferencia de electrones, y es que pueden oxidarse o reducirse sin sufrir grandes cambios de geometría, gracias a que en ellos aparecen fenómenos de acople antiferromagnético que estabilizan las uniones Fe-Fe haciendo que los centros de $[2\text{Fe-2S}]$ y de $[4\text{Fe-4S}]$ sean bastante rígidos. Por otro lado, la multivalencia y la deslocalización permiten cambios más suaves en la geometría cada vez que los electrones son agregados o extraídos.

Además, la formación de los complejos multi férricos permiten distintos estados de oxidación. Por ejemplo usando los estados Fe^{3+} y Fe^{2+} en un centro $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]$ se pueden tener por lo menos los estados globales $n= 1^-,2^-,3^-,4^-$. Los potenciales de los pares redox correspondientes están finamente determinados por el entorno de coordinación y las propiedades electrónicas del entorno proteico. Los potenciales redox para los centros Fe-S varían desde más de 500 mV hasta menos de -500 mV, un rango

mayor que para cualquier otro cofactor redox simple. (Cardenas-Rodriguez, Chatzi, y Tokatlidis 2018; Di Maio et al. 2017)

Los complejos de coordinación más frecuentes en configuración de centros Fe-S son los [2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S] (**Figura 1.1**). Una sola proteína puede anclar una gran cantidad de grupos en una disposición espacial definida, de modo que los electrones puedan circular a lo largo de una larga distancia dentro de una cadena peptídica, o de un complejo multiproteico formado por numerosas subunidades. Un excelente ejemplo de esto se ve en la dióxido de carbono reductasa dependiente de hidrógeno (HDCR)(Dietrich et al. 2022). En este caso un complejo multiproteico se organiza para formar una estructura de nanocable que transporta electrones desde el sustrato H_2 al CO_2 en extremos opuestos de un sistema anclado a la membrana plasmática en *T.kivui*. (**Figura 1.2**).

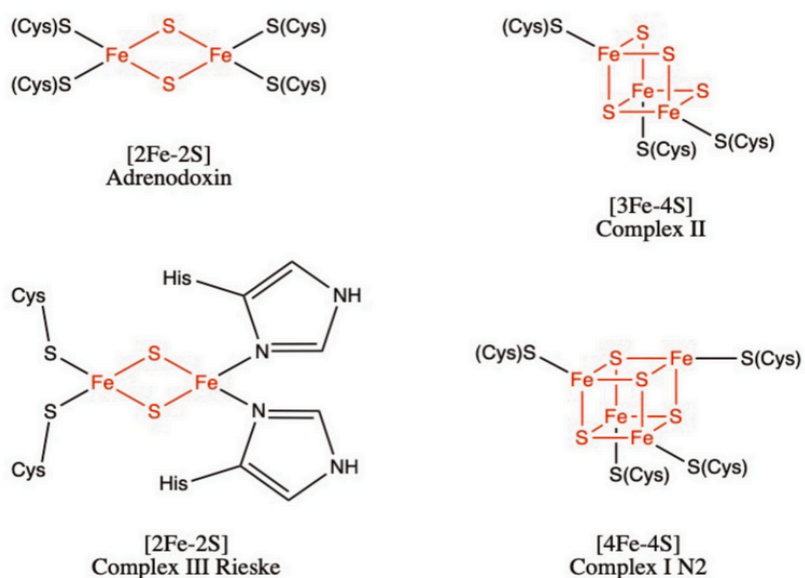


Figura 1.1. Ejemplos estructurales de centros Fe-S fisiológicos en distintos contextos proteicos. (figura adaptada de Read et al. 2021) Se muestran ejemplos de complejos Fe-S en configuración fisiológica para distintas proteínas.

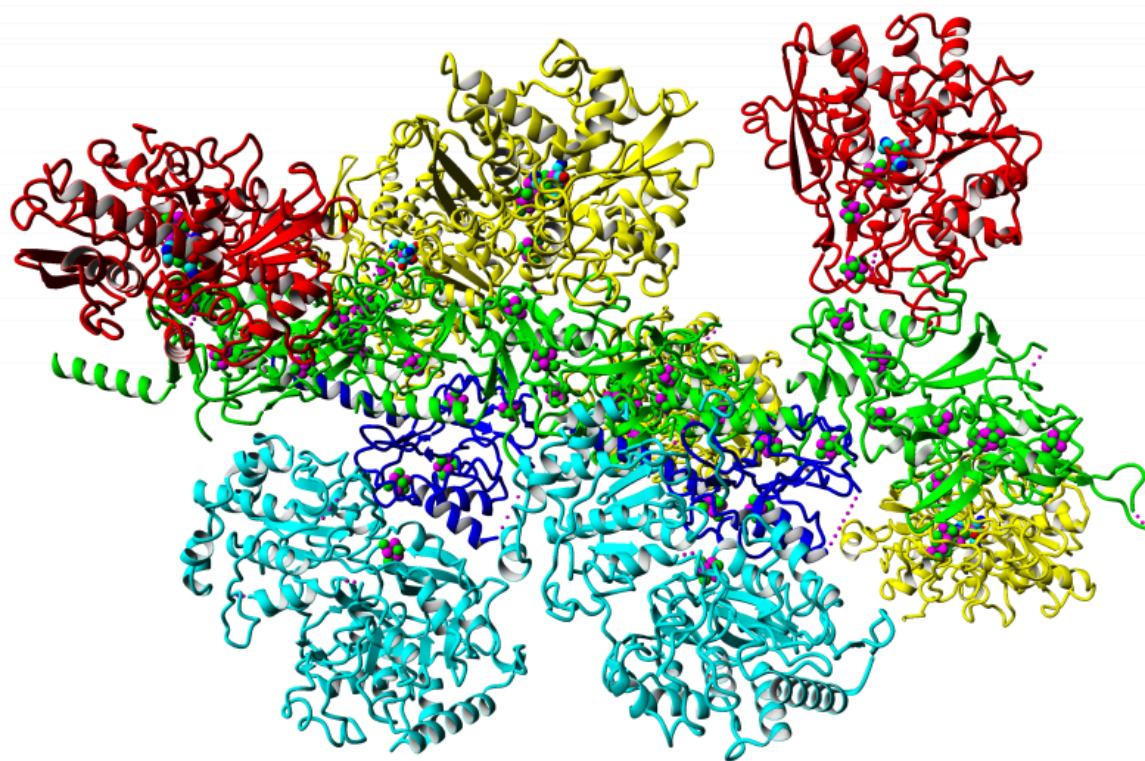


Figura 1.2. Representación estructural del complejo HDCCR. Bajo el código PDB: 7QV7 muestra una serie de centros Fe-S (representación de esferas: verdes para azufre y rosas para el hierro) organizados en cercanía a partir de múltiples cadenas polipeptídicas.

El conocimiento de las proteínas que utilizan centros Fe-S es un campo de investigación activo. Aproximaciones multidisciplinarias se llevan adelante en esta clase de proteínas impulsando el continuo descubrimiento de nuevas propiedades químicas y roles biológicos para estos cofactores.

1.3. La historia evolutiva de la maquinaria de síntesis de centros Fe-S

Dado el rol central que los centros Fe-S han encontrado en el metabolismo energético de los seres vivos, es razonable suponer que los mecanismos para sintetizarlos en la célula se encuentren ampliamente conservados entre los distintos dominios de la vida. De hecho existen fundamentalmente cuatro vías diferentes de generación de centros Fe-S. La de tipo ISC es a la que pertenece la NFS1 humana y el complejo descrito a lo largo de este trabajo de tesis. Luego existen dos adicionales; la vía de tipo SUF, los complejos llamados mínimos tipo MIS y SMS, y la vía NIF que son los que dan mantenimiento al complejo nitrogenasa de los organismos fijadores de N_2 . Cada vía cuenta con particularidades estructurales características, y aunque son homólogos entre sí, presentan distribuciones distintas. Por ejemplo, el sistema SUF es más frecuente en bacterias, mientras que los SMS son casi exclusivos de arqueas, y NIF e ISC están limitados a algunas especies bacterianas (Garcia et al. 2022).

La historia evolutiva de los mecanismos de síntesis de centros Fe-S, indica que esta se remonta hasta el último ancestro común universal (LUCA por sus siglas en inglés). Al parecer, aún en el contexto de una atmósfera primitiva deficiente en oxígeno, los genomas primitivos ya contaban con herramientas para sintetizar y proteger a los centros Fe-S en presencia de trazas de oxígeno. Desde entonces los distintos sistemas habrían aparecido mediante eventos de duplicación de genes y transferencia horizontal de genes entre bacterias y arqueas (Garcia et al. 2022).

Con el objetivo de indagar sobre esta idea, hemos realizado una búsqueda iterativa de ortólogos por modelos ocultos de Markov para estudiar la distribución de los distintas subunidades del complejo de síntesis de centros ferrosulfurados de la familia

ISC. Utilizamos como punto de partida las secuencias del complejo ISC humano y luego comparamos los principales hallazgos de ortólogos contra una lista de 329 organismos representativos del árbol de la vida (Capítulo 2.1).

El resultado de esta búsqueda se resume en la **Tabla 1.1**. Sobresale como resultado interesante que existe una diversidad notable entre la distribución de las distintas proteínas que conforman el complejo. Para empezar se observa una distribución de análogos muy desigual entre los reinos (**Figura 1.3**). Es llamativo cómo la inmensa mayoría de especies que contienen el complejo completo en todos sus subunidades funcionales corresponde a organismos eucariotas, mientras que entre arqueas no se encontró ni una sola especie, entre el grupo de especies representativas, que tuviera análogos de todas las subunidades funcionales, e inclusive, muchas no presentan ninguna. Es probable que para estos casos se hayan seleccionado sistemas muy divergentes y que nuestra búsqueda no llegue a detectarlas, sistemas probablemente más parecidos a los MIS o SMS. En este contexto, en el futuro va a ser necesario realizar búsquedas dirigidas a estos grupos de organismos para entender cuáles son las relaciones estructurales/funcionales en los procesos de síntesis de centros Fe-S en esas especies. De todos modos, la **Figura 1.4** muestra un árbol compuesto por los organismos arqueas representativos, donde se puede apreciar que la mayoría de las divisiones en las ramas sucedieron en momentos históricos anteriores al incremento de la presión parcial de oxígeno atmosférico. Esto es un Indicador de que estos organismos son herederos evolutivos de nichos ecológicos donde la baja concentración de oxígeno y sus características bioquímicas les permitían subsistir con una maquinaria de síntesis de centros Fe-S minimalista o

incluso muy distinta a la existente en organismos eucariotas.

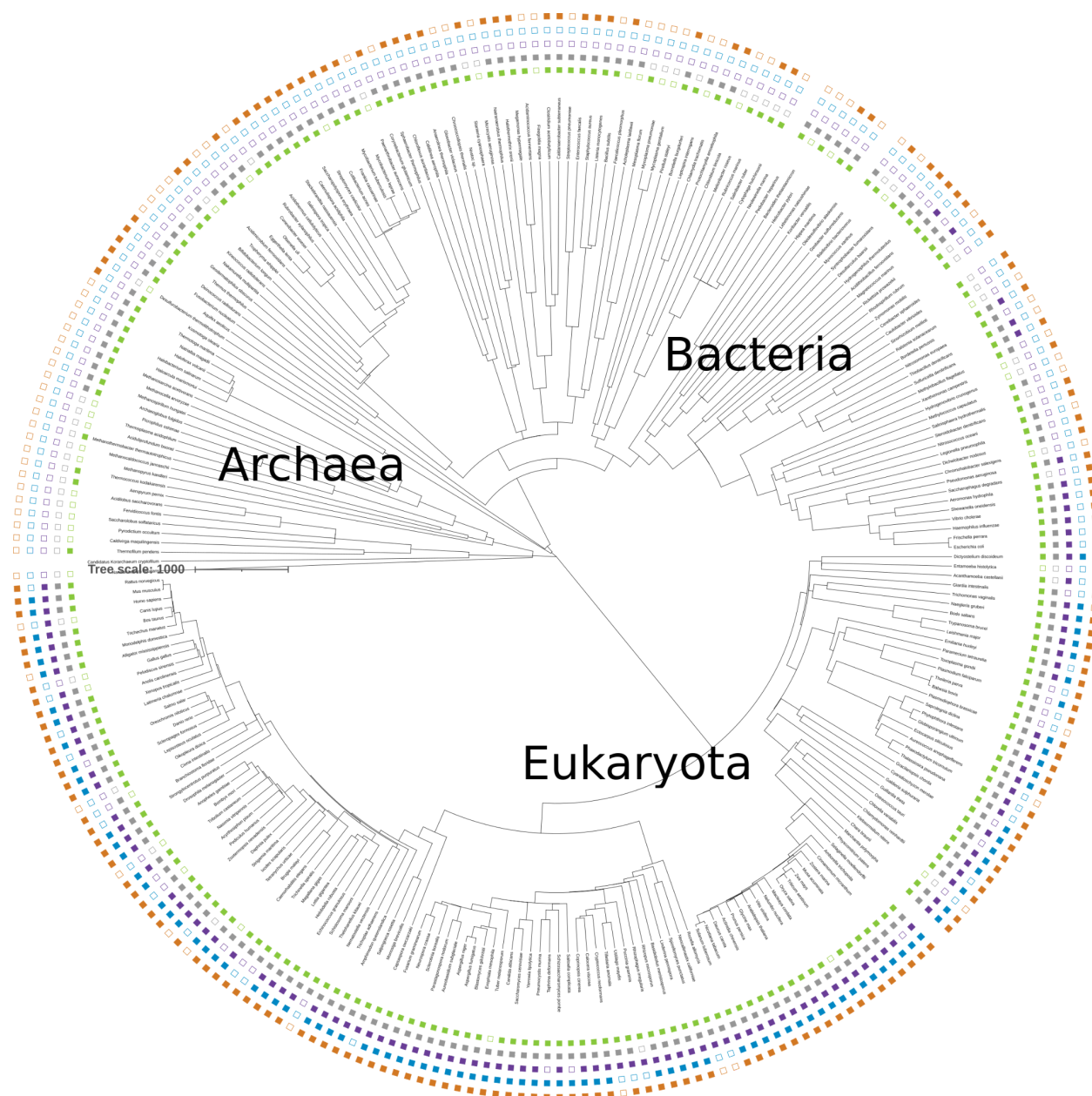


Figura 1.3. Distribución de las proteínas del super complejo de síntesis de centros Fe-S en un árbol de especies representativas. Se representan los hallazgos positivos con cuadrados llenos y los negativos con puntos vacíos. Cada color codifica para una proteína miembro del super complejo NFS1; con verde NFS1, con gris ISCU, con púrpura FXN, con azul ISD11 y con naranja ACP.

También sobresale la distribución de la FXN, ya que se hallaron homologos en apenas el 44 % de los organismos representativos (se obtuvieron los mismos resultados al realizar la búsqueda partiendo del homólogo de frataxina de *Escherichia coli*) (**Tabla 1.1**) y se concentraron casi todas entre los organismos eucariotas con apenas algunas especies de bacterias. Estos hallazgos abren una serie de preguntas con respecto a cómo fue consolidándose la aparición de FXN y su rol en el complejo de síntesis de centros Fe-S a lo largo de la evolución.

En definitiva, esta búsqueda de ortólogos no solo confirmó una vez más que ISD11 es una proteína exclusivamente eucariota. Aunque ACP tiene homólogos bastante distribuidos entre todos los reinos. Lo más probable es que sus relaciones con ISD11 sean relativamente recientes en términos históricos evolutivos.

Por último la distribución de homólogos de ISCU y NFS1, parece indicar que son los ingredientes mínimos y necesarios para la síntesis de centros Fe-S. Estos dos grupos de proteínas no solo reportaron distribuciones similares en un sentido general, sino que además, se encuentran ampliamente distribuidos entre dominios, salvo algunas excepciones ya mencionadas en arqueas. Se muestra que el sistema de síntesis de centros Fe-S está ampliamente conservado desde un punto de vista evolutivo y es, en un sentido general, central para el metabolismo.

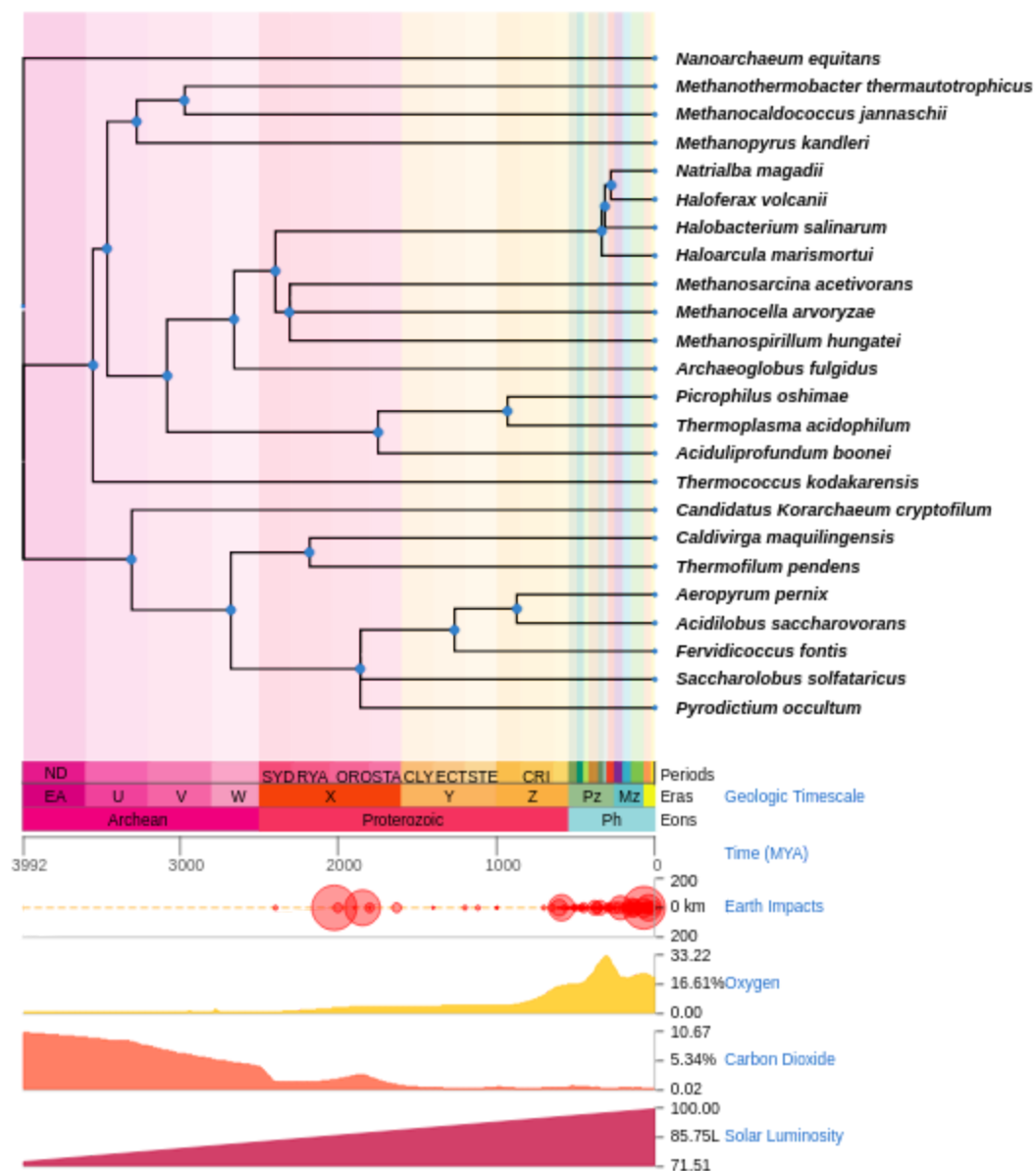


Figura 1.4. Recorte de la rama Archaea del árbol de especies representativas con referencias en tiempo. Se presenta la ramificación Archaea del árbol de especies representativas y se adjuntan abajo referencias relacionadas con el tiempo que transcurre en la edad de la tierra. La escala de tiempo geológico, la cantidad de impactos en la tierra, la concentración atmosférica de oxígeno, la concentración de dióxido de carbono y la luminosidad solar a lo largo del tiempo.

Tabla 1.1

Proteína	Hallazgos (%)
-----------------	----------------------

ACP	65
-----	----

ISD11	32
-------	----

ISCU	80
------	----

FXN	44
-----	----

NFS1	84
------	----

1.4. El complejo desulfurasa humano

En este trabajo de tesis nos enfocamos en el complejo desulfurasa humano, por su importancia en una serie de enfermedades poco frecuentes entre las que se halla la Ataxia de Friedreich y la miopatía ISCU (Mochel et al. 2008; Kollberg et al. 2009; Tsai, Bridwell-Rabb, y Barondeau 2011). Por esta razón se describirán las distintas relaciones estructura-actividad utilizando las numeraciones e identificadores de estructuras obtenidas de las proteínas humanas.

Para adentrarnos en las particularidades estructurales que determinan el funcionamiento de la maquinaria de síntesis de centros Fe-S humana, es importante señalar que su actividad se da en el contexto de un super complejo multiproteico en la matriz mitocondrial (**Figura 1.5**).

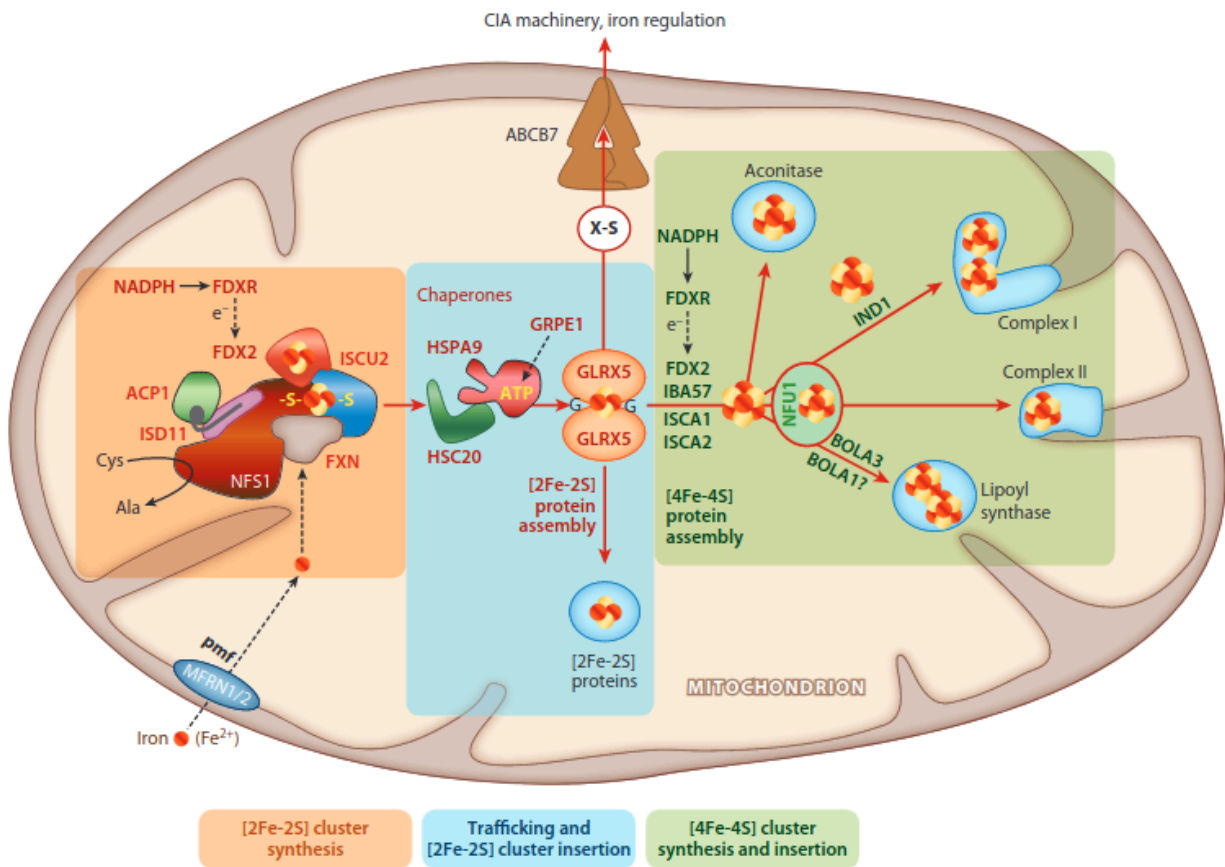


Figura 1.5. Descripción de los procesos de transferencia de centros Fe-S a sus proteínas receptoras. Un complejo de chaperona/cochaperona se une al motivo LPPVK de ISCU y facilita la transferencia directa de grupos de Fe-S a las proteínas receptoras o media la transferencia a portadores secundarios (p. ej., NFU1, GLRX5, ISCA1, ISCA2, BOLA3, que luego donan grupos de Fe-S a receptores específicos (por ejemplo, ácido lipoico sintasa y subunidades de los complejos de la cadena respiratoria). Figura tomada de Lill y Freibert 2020.

Este super complejo incluye a la enzima desulfurasa (NFS1), una proteína tipo LYR (ISD11), la proteína transportadora de acilos (ACP), la proteína plataforma para la síntesis de centros Fe-S (ISCU2) y la frataxina (FXN). Cada una de estas proteínas se encuentra representada por duplicado en un arreglo heterodecamérico (**Figura 1.6**).

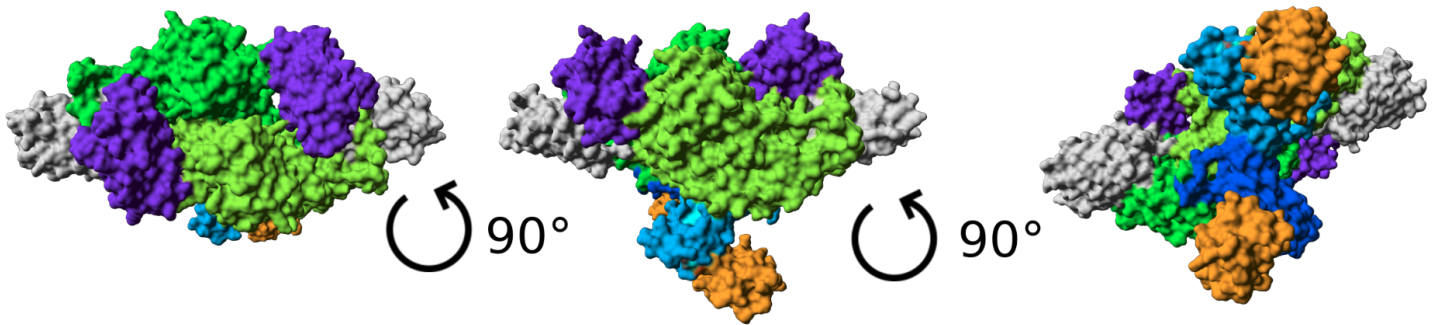


Figura 1.6. Visualización del super complejo de síntesis de centros Fe-S en tres perspectivas diferentes (PDB: 6NZU). En verde se representan las dos subunidades de NFS1. En gris se representan las dos subunidades de ISCU2, en púrpura se representan las dos subunidades de FXN, en azul y celeste se representan las dos subunidades de ISD11 y en naranja la dos subunidades de ACP (*E. coli*).

A estas cinco proteínas se les suman dos proteínas más de matriz mitocondrial: la ferredoxina (FDX2) como facilitadora de equivalentes de electrones y la FdxR (ferredoxina reductasa), una enzima que reduce a la FDX2 oxidada a costa de NADPH. Las interacciones exactas que estas enzimas tienen con el sistema se están estudiando y algunas hipótesis sugieren que FDX2 estaría turnándose con FXN en su sitio de unión.

1.5. Aspectos estructurales y funcionales relevantes

Según la evidencia acumulada hasta hoy, a continuación se describen algunas de las características estructurales y funcionales más relevantes de a cada subunidad:

La **NFS1** lleva adelante la reacción enzimática de desulfuración de la cisteína sustrato, que aporta los átomos de azufre requeridos para el ensamblaje de los centros

Fe-S. Esta reacción usa como cofactor en el sitio activo al piridoxal 5'-fosfato (PLP) (**Figuras 1.7 y 1.8**), el cual está unido mediante un enlace de tipo base de Schiff a la Lys258, un residuo extremadamente conservado entre las desulfurasas. Ahí tienen lugar un complejo juego de reacciones que describiremos con más detalle más adelante, y se obtiene como producto L-Ala libre y NFS1 persulfurada en la Cys381 (NFS1-S-SH) ubicada en el *loop* catalítico de la enzima. En un paso posterior, este sulfuro es transportado a un segundo sitio activo (sitio de ensamblado ISCU2) donde el sulfuro es incorporado a un centro Fe-S en formación.

Las proteínas **ACP e ISD11** están vinculadas estructuralmente de manera que forman entre ellas una entidad estructural en sí misma. Sus funciones fundamentales son, aparentemente, la de estabilizar al dímero NFS1 e inducir su conformación activa. Esta y otras particularidades estructurales de este dímero serán discutidas en profundidad en el Capítulo 3 de este trabajo de tesis.

Es de destacar la presencia de la proteína ACP. Tanto para la formación del heterodímero ACP-ISD11 como en el super complejo en sí. De hecho, su participación dentro de la maquinaria de centros Fe-S se constató por casualidad, cuando se intentaba co-purificar a la NFS1 humana con ISD11 en el sistema de expresión bacteriano *E. coli* BL-21. Al cristalizar el complejo resultante se constató que la ACP de *E. coli* (ACPec) estaba efectivamente conformando el complejo en una forma específica y estable (Cory 2017). Por su parte, ISD11 es una proteína que sólo se encuentra en eucariotas (**Figura 1.3**) y no es necesaria para la estructura de los complejos desulfurasa análogos en bacterias y arqueas. Dicho de otra manera, en algún lugar de la historia evolutiva de las desulfurasas eucariotas, estas seleccionaron variantes que

dependen estructuralmente de interacciones con el heterodímero ACP- ISD11. A partir de estos hallazgos distintos grupos han explorado el significado fisiológico o evolutivo de esta asociación NFS1/ACP-ISD11.

En particular se ha postulado que la presencia de la ACP podría acarrear un rol funcional el *crosstalk* entre síntesis de centros Fe-S y biosíntesis de ácidos grasos, e incluso de ácido lipoico en las mitocondrias (Lill y Freibert 2020) . En este trabajo de tesis se han realizado algunos avances relevantes desde el punto de vista de la función y la estructura que se expondrán con más detalle en el **Capítulo 3**.

Es importante agregar que la desulfurasa NFS1 humana se produce con cierta dificultad de manera aislada en sistemas procariotas de expresión como *E. coli* BL-21. No se reportaron estructuras eucariotas que no contengan conjuntamente al heterodímero ACP-ISD11. Dicho de otra forma, parecería existir una dependencia estructural entre las NFS1 eucariotas y el heterodímero ACP-ISD11 que consolida una unidad estructural estable: (NFS1/ACP-ID11)₂ (también definido como “NIA” en la literatura por NFS1(N), ISD11(I), ACP (A)).

La **FXN**, por su parte, tiene un rol modulador de la actividad (Bridwell-Rabb et al. 2014; Cai et al. 2017). Su presencia acelera la reacción de formación de centros Fe-S desde al menos dos puntos: (i) acelerando las reacciones de NFS1 en el sitio activo PLP, y (ii) facilitando la transferencia de sulfuros al sitio activo de ensamblado de centro Fe-S en ISCU2 (Parent et al. 2015; Gervason et al. 2019).

ISCU2 es la proteína crítica de andamiaje donde los centros Fe-S son ensamblados en un sitio específico para la coordinación de metales. Ahí el hierro puede ser incorporado a los centros Fe-S. El sitio de ensamblado está constituido por

la interfase proteica entre NFS1, ISCU2 y FXN (**Figura 1.10**).

1.6. Relaciones estructura actividad en las maquinarias de síntesis de centros Fe-S

En términos generales, el mecanismo de reacción involucra fundamentalmente cuatro pasos. (1) La reacción de desulfuración en el sitio activo PLP para generar una enzima desulfurasa (NFS1) persulfurada en la Cys 381 (Nakamura et al. 2020); (2) un cambio conformacional del loop catalítico, que mueva al persulfuro desde una posición cercana al PLP a una posición cercana al sitio activo de la proteína de andamiaje para el ensamblado de centros Fe-S (ISCU) (Fox et al. 2019); (3) la transferencia del persulfuro a cisteínas disponibles en ISCU (Gervason et al. 2019); (4) el ensamblado del centro Fe-S propiamente dicho en el sitio activo ISCU mediado por la entrega de al menos un electrón proveniente de la FDX2.

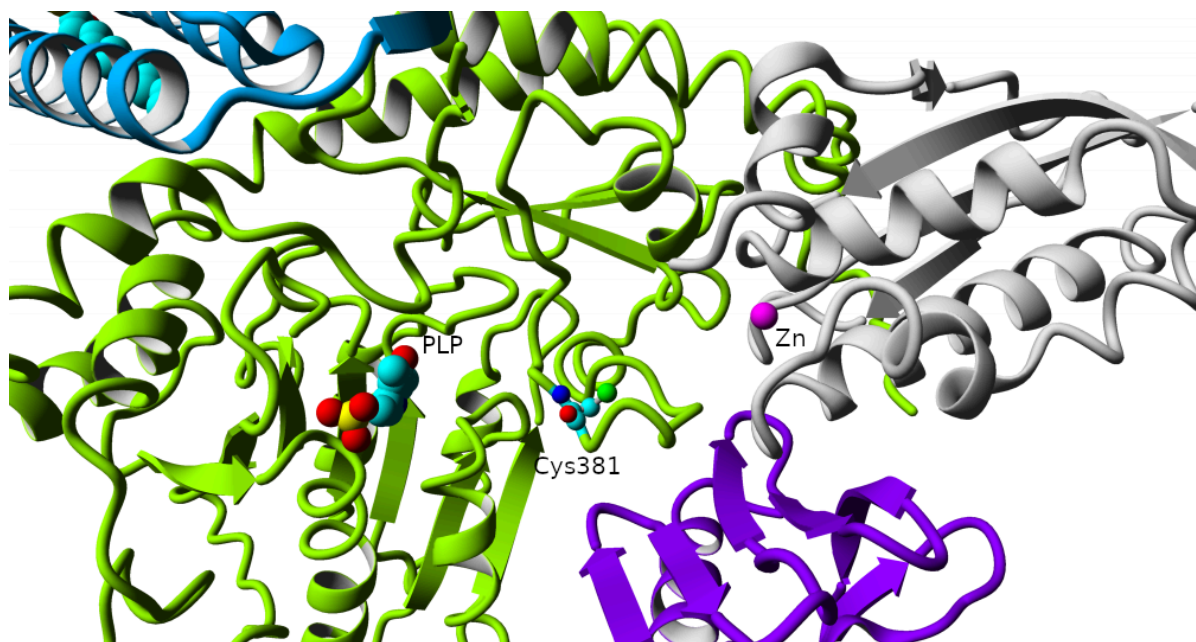


Figura 1.7. Vista ampliada de los sitios activos en NFS1 (PDB:6NZU). En verde se representa la NFS1. Se visualiza al PLP en representación de esferas para marcar la ubicación relativa del sitio activo PLP y la cisteína catalítica 381. En gris se representa

a la ISCU2 que en este caso se encuentra coordinando un ion metálico de Zn^{2+} a través de residuos propios del sitio de ensamblado ISCU2.

1.7. Desulfuración del sustrato L-Cys

La reacción de desulfuración de cisteína libre ha sido ampliamente estudiada y existe un mecanismo consensuado de cómo es llevada adelante. La reacción se inicia desde el estado de reposo donde el PLP-Lys existe en su forma de aldimina interna inicial. A partir de aquí, la L-cisteína (L-Cys) sustrato se une covalentemente al PLP a través de una reacción de intercambio de base de Schiff, produciendo la aldimina externa PLP-L-Cys. Esta se estabiliza mediante interacciones polares con residuos conservados en el sitio activo. Sobresalen entre ellas interacciones de puente de hidrógeno con un residuo arginina que interactúa con el grupo carbonilo del resto cisteína de la aldimina externa PLP-L-Cys, y una histidina que interactúa con el grupo -SH de la PLP-L-Cys que ejerce su función como catalizadora ácido-base durante la reacción de desulfuración.

La aldimina externa PLP-L-Cys (**Figura 1.11.2**) sufre una reorganización a través del quininoide (**Figura 1.11.3**) hacia la cetimina correspondiente (**Figura 1.11.4**). Entonces, el residuo Cys381 catalítico puede atacar al grupo SH del PLP-L-Cys-cetimina, generando el residuo Cys381 persulfurado (Cys381-SSH) y PLP-L-Ala-enamina (**Figura 1.11.5**). Esta enamina se convierte posteriormente en PLP-L-Ala cetimina (**Figura 1.11.6**), y una vez más pero en el sentido opuesto transiciona a través del quininoide (**Figura 1.11.7**) a la aldimina externa que puede reaccionar con la Lys original para liberar la L-Ala producto y la aldimina interna original (**Figura 1.11.8**).

Finalmente, la Cys381-S-SH transfiere el azufre a la proteína o sistema destinatario. Para el enfoque de este trabajo de tesis será la ISCU2 en su Cys del sitio activo de ensamblaje de centros Fe-S. Muchos de estos intermediarios fueron capturados por Nakamura y colaboradores (Hikita et al. 2020) usando estrategias de análisis de cristales de distintas desulfurasas análogas bacterianas, elaboradas en distintas concentraciones y tiempos de exposición al sustrato L-Cys .

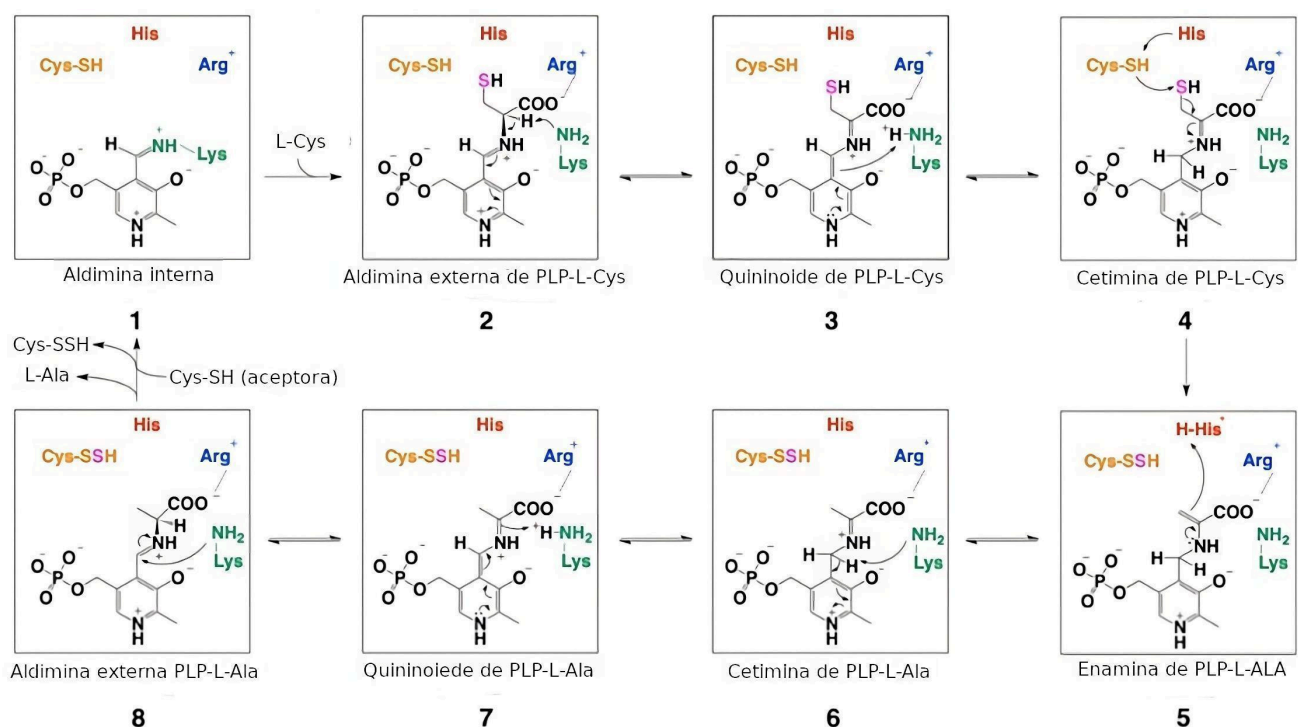


Figura 1.8. Secuencia de intermediarios en la reacción de desfiguración de L-Cys en el sitio activo PLP. Figura adaptada de (Nakamura et al. 2020). Se muestra la secuencia de reacciones químicas necesaria para la reacción de desulfuración de L-Cys en el sitio activo PLP.

1.8. Cambios conformacionales en el *loop* catalítico y transferencia del persulfuro

Aún no se conocen en su totalidad los detalles moleculares asociados con el cambio conformacional del *loop*. Existen estructuras cristalizadas de proteínas

análogas de distintas especies que presentan al *loop* catalítico en una conformación extendida hacia el sitio activo PLP y formando un complejo de coordinación con un átomo de Zn en la ISCU. Otras, lo presentan en un estado intermedio un poco alejado de ambos sitios activos y muchas otras no consiguen resolverlo. Esta combinación de conformaciones indica que esta sección es inherentemente móvil y presenta una importante variedad de conformaciones posibles. Sin embargo se ha llegado a comprobar la relevancia de la Cys381 en la transición de persulfuros en la ISCU. Usando reacciones de alquilación sensibles a intermediarios persulfurados, Gervason y colaboradores demostraron que la Cys381 (Gervason et al. 2019) transfiere un persulfuro a la ISCU2 en el contexto del sitio activo de ensamblado. Se deduce de este compilado de experimentos que el cambio conformacional es necesario para que la reacción pueda llevarse adelante.

1.9. Ensamblado de centros Fe-S

El ensamblado del centro ferro sulfurado propiamente dicho, es la etapa de la reacción menos comprendida. Se sabe que en este paso es importante el aporte de electrones por parte de FDX2 (Cai et al. 2017) , y que al menos uno de los átomos de hierro protagonistas estaría coordinado en la ISCU2 de antemano (Gervason et al. 2019). Estructuras con centros ferrosulfurados en el sitio propuesto como de ensamblaje han podido ser resueltas en proteínas análogas de otras especies, lo que en parte guía una línea de razonamiento donde los centros Fe-S se ensamblan en el sitio de encuentro entre las superficies de FXN, ISCU2 y NFS1. Algunas de las preguntas que surgen es si el ensamblado del centro Fe-S sucede en dos pasos

independientes, donde dos moléculas de ISCU2 reaccionan por separado para incorporar dos ligandos sulfuro que posteriormente completan un centro Fe-S al encontrarse (Gervason et al. 2019). O, por el contrario, que las reacciones se suceden sobre una misma molécula de ISCU a través de múltiples ciclos de NFS1 tal y como ya fueron descritos; donde finalmente se obtenga el centro Fe-S totalmente ensamblado. En cualquier caso estas propuestas son meras hipótesis y múltiples aproximaciones experimentales se están utilizando para intentar dilucidar el verdadero mecanismo.

1.10. Transferencia y maduración de centros Fe-S

Una vez que ISCU posee al centro Fe-S ensamblado, este debe ser transferido a su destino final mediante un sistema específico de chaperonas. El mismo está protagonizado en primera instancia por las proteínas HSC20 y HSPA9, que gracias a sus dominios de unión a ISCU constituyen un complejo de transferencia de centros Fe-S al primer intermediario común la GLRX5. Esta puede entregar el centro Fe-S en su forma 2Fe-2S a los sistemas responsables de la maduración a estructuras más complejas como pueden ser las 4Fe-4S. La **Figura 1.5** (Lill y Freibert 2020) ilustra el esquema de flujo de centros Fe-S desde su síntesis, sus proteínas de traslado específicas y sus etapas de maduración.

El camino que recorre el centro 2Fe-2S para su maduración y final entrega en la apo-proteína mitocondrial correspondiente incluye al menos 9 proteínas adicionales. Entre ellas se incluyen a ISCA1, ISCA2, IBA57, NFS1, IND1 y BOLA3. Todas estas han sido confirmadas a partir de estudios bioquímicos, biológicos, y por su aparición en enfermedades genéticas. De todos modos, una gran parte de los mecanismos

moleculares subyacentes quedan por ser descifrados (Lill y Freibert 2020).

Los centros Fe-S tienen variadas funciones extra mitocondriales tanto nucleares como citosólicas. En particular funciones relacionadas con la tiolación de ARNt, la reparación del ADN (Pandey et al. 2019), la síntesis de ácido lipoico (Önder et al. 2006) y el cofactor de molibdeno (Black y Dos Santos 2015). La forma en la que estos cofactores son sintetizados para su funciones extra mitocondriales es a través de un mecanismo que depende del sistema mitocondrial desulfurasa, pero que en lugar de generar al centro 2Fe-2S, produce un factor azufrado que contiene Fe^{2+} y que vamos a llamar X-S, el cual puede ser exportado a través de un transportador de tipo ABC específico. Este factor X-S es utilizado por la maquinaria homóloga del ensamblaje de centros Fe-S citosólica (CIA) que comprende 11 proteínas conocidas. Entre ellas sobresale la proteína andamio Cfd1-Nbp35, para el ensamblaje del grupo [4Fe-4S] para generar proteínas con centros Fe-S tanto citosólicas como nucleares (Marquez et al. 2023).

1.11 La alteración funcional de las proteínas involucradas en el super complejo derivan en enfermedades genéticas graves.

Las mutaciones en las proteínas que forman el super complejo desulfurasa conducen a una variedad de enfermedades poco frecuentes y graves. Entre ellas, la Ataxia de Friedreich (AF) es causada por una deficiencia en la expresión y/o función de la frataxina (FXN), genera neurodegeneración que en general se inicia en la adolescencia y se acompaña de una cardiomiopatía característica. La miopatía ISCU es causada por una deficiencia en la función ISCU2 y cursa con una grave intolerancia

al ejercicio y deficiencias de enzimas clave como succinato deshidrogenasa o aconitasa en el tejido muscular esquelético (Mochel et al. 2008; Kollberg et al. 2009; Nordin et al. 2011). En la desulfurasa NFS1 se encontró que la mutación R72Q da como resultado una enfermedad mitocondrial infantil autosómica recesiva, extremadamente rara y caracterizada por acidemia láctica, deficiencia de los complejos II y III mitocondriales, insuficiencia orgánica multisistémica y mitocondrias anormales (Farhan et al. 2014). La ausencia total de NFS1 es incompatible con la vida humana.

Finalmente, la mutación de la proteína ISD11 en la posición 68 (R68L) resulta en una deficiencia de transferencia de electrones en la fosforilación oxidativa mitocondrial (complejos respiratorios I, II, III y IV), como en una deficiencia de varias proteínas con centros Fe-S, incluidas la aconitasa y la ferroquelatasa (Lim et al. 2013).

Así, resulta notable observar que las mutaciones que aparecen en cada miembro del super complejo desulfurasa determinan enfermedades asociadas pero con diferencias significativas desde un punto de vista fenotípico. Cada una tiene su juego particular de signos, síntomas y evolución temporal. Esta observación plantearía una complejidad fisiopatológica subyacente, donde probablemente estas proteínas podrían cumplir otras funciones en interacción con otros sistemas proteicos a la vez.

El criterio para definir a las enfermedades poco frecuentes varía de país en país, dado a que la definición formal tiene implicaciones legales en cada uno. En líneas generales se usan criterios de prevalencia que definen como enfermedades poco frecuentes aquellas con prevalencias menores a 1 en cada 2000 habitantes y se incluyen criterios clínicos como si amenazan la vida o el desarrollo (Kariampuzha et al. 2023).



*"We are building in sorrow or joy
A temple the world may not see,
Which time cannot mar nor destroy:
We build for eternity."
N. B. Sargent*

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Métodos Bioinformáticos

2.1.1. Búsqueda de ortólogos de las subunidades del complejo Desulfurasa en organismos modelo

Se hicieron búsquedas mediante HMM (Hidden Markov Models) usando el programa Jackhmmer, que se encuentra como herramienta en el servidor web del EBI (Finn et al. 2015), usando las secuencias de las variantes humanas de las 5 subunidades del complejo Desulfurasa recuperadas de Uniprot. La base de datos empleada fue Uniprot Reference Proteomes. La búsqueda se hizo usando los parámetros predeterminados por default y el número de iteraciones necesarias para llegar a convergencia (NFS1 permitió una sola, ACP permitió 2, ISCU y FXN convergieron en 7 mientras que ISD11 en 34). Luego, mediante un script de Python, se retuvieron aquellas secuencias correspondientes a un conjunto de 239 organismos modelo representativos de los tres reinos de la vida, listados en la base de datos OrthoInspector (<https://lbgi.fr/orthoinspectorv3/database/Eukaryota/2019>). En aquellos casos donde se obtuvo más de una secuencia por organismo, se retuvo la de mayor similitud con la variante humana.

La ortología de las secuencias se confirmó mediante *Reciprocal Best Hits*: se usó cada secuencia recuperada para realizar una búsqueda en Blast usando los genomas de referencia de *Homo sapiens* y *Escherichia coli*, considerándose un auténtico ortólogo cuando el mejor hit de esta búsqueda es la proteína que se usó como *query* para recuperar la secuencia en cuestión.

2.1.2. Construcción del árbol taxonómico

El árbol taxonómico se construyó usando el portal Open Tree of Life (OTL) mediante el paquete `rotl` implementado en R. Este programa permite realizar la síntesis de un árbol a partir de distintos estudios filogenéticos. En primer lugar, se recuperaron los identificadores taxonómicos que usa OTL, llamados `ott_id`, usando la página *Taxonomic Name Resolution Service* (TNRS), para los organismos modelo de OrthoInspector. Las asociaciones se “curaron” manualmente, de modo de encontrar aquellas que no se recuperaron inicialmente, considerando nombres sinónimos. Con la lista de identificadores, se procedió a la síntesis del árbol en `rotl`.

Algunos organismos no fueron incluidos en el árbol debido a que no hay un consenso en la ubicación de los mismos relativo a los otros organismos investigados (*incertae sedis*). Debido a que esto ocurrió con muy pocos organismos, no se modificó el árbol para incluirlos a posteriori. Las tareas de edición del árbol (conversiones de formato y edición de etiquetas) se realizaron en TreeGraph2 (<http://treegraph.bioinfweb.info>) y la visualización final se armó en Interactive Tree of Life (iTOL, <https://itol.embl.de>).

2.1.3 Elaboración del LOGO de conservación para NFS1

Las secuencias de ortólogos eucariotas de NFS1 se descargaron de la base de datos de proteomas no redundantes del NCBI utilizando BlastP a través de un script de python. La búsqueda se restringió a una lista de 145 organismos modelo de Eukarya tal como se usa en OrthoInspector 3 (Nevers et al. 2019) (la lista completa está disponible en <https://lbgi.fr/orthoinspectorv3/database/Eukaryota/2019>). Después de la curaduría para la duración adecuada y la calidad de la secuencia, resultó en un conjunto de 133 secuencias. Se construyó un MSA usando MAFFT en línea (Katoh, John Rozewicki, y

Kazunori D Yamada 2019) y el logotipo de la secuencia se representó usando Weblogo (Crooks et al., s. f.) .

2.1.4. Búsqueda de motivos estructurales

La búsqueda de motivos en el Protein Data Bank (PDB) se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda de motivos de estructura integrado en el sitio web de RCSB PDB. Con este fin, los residuos His y Cys del motivo HXCXXXXC se seleccionaron en la estructura de NFS1 humano en complejo con ISCU2 humano, ISD11 humano y *E. coli* ACP (PDB ID: 5WKP) y los resultados se inspeccionaron a ojo.

El MSA fue construido automáticamente por Consurf Server (Ashkenazy et al. 2016) utilizando MAFFT y los homólogos fueron recolectados de UNIREF90. El algoritmo de búsqueda de homólogos: HMMER y el valor E de HMMER fue 0,0001. El número de iteraciones HMMER: 1. El porcentaje de identidad máximo y mínimo entre secuencias para homólogos fue 95 y 35%, respectivamente. El análisis se realizó utilizando un total de 150 secuencias que muestran la lista de homólogos. El análisis del logotipo se llevó a cabo utilizando Weblogo (Crooks et al., s. f.) .

Para el análisis de secuencias de ISD11, se obtuvieron un total de 500 secuencias no redundantes de ISD11 utilizando Consurf (Armon, Graur, y Ben-Tal 2001; Ashkenazy et al. 2016). A continuación, se recortaron las secuencias considerando la longitud de la secuencia humana de ISD11 para simplificar el análisis sin pérdida de información. Después de eso, se realizó una nueva alineación.

2.2. Expresión y purificación de proteínas.

2.2.1. Purificación del heterodímero ACP-ISD11

Las secuencias de ADN corresponden a la ACP mitocondrial humana (forma madura) e ISD11 (longitud completa) se optimizaron para la expresión de proteínas en *E. coli* BL21 (DE3) de BIO BASIC Inc. (Markham, ON). Las **Figuras 2.1 y 2.2** muestran la numeración de los residuos de aminoácidos utilizados en este trabajo, correspondientes a la ACP recombinante y proteínas ISD11, respectivamente. El complejo ACP-ISD11 se indujo con 1% (p/v) lactosa (concentración final), y las células fueron lisadas por sonicación manteniendo la muestra en hielo y agua durante la ruptura. La ISD11 incluía una etiqueta His N-terminal y un sitio de proteasa TEV [MHHHHHHENLYFQGAASSRAQ (la secuencia corresponde a ISD11 está subrayado, y el sitio TEV está en cursiva)]. El complejo se purificó a 4 °C a partir de la fracción soluble por cromatografía NTA-Ni²⁺-agarosa. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis con dodecilsulfato de sodio en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La mayoría de la proteína se eluyó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM (pH 8,0). Después de la purificación con NTA-Ni²⁺, se realizó un paso de diálisis para eliminar lentamente el imidazol.

Después de eso, el complejo ACP-ISD11 fue purificado aún más. Las fracciones de proteína se cargaron en una Sephadex G100 preparativa (SEC, 93 cm × 2,7 cm), previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM y NaCl 200 mM (pH 8,0). Este paso de purificación separa la proteína de interés de otras de mayor peso molecular y de ADN. La identidad de las subunidades de ACP-ISD11 purificadas se estableció por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (C18), seguida por

secuenciación de Edman N-terminal y espectrometría de masas por electrospray. Sorprendentemente, no se encontró ACP de *E. coli* como parte del complejo ACP-ISD11 (Herrera et al. 2018).

```

      1      11      21      31      41
      MAASSRAQVL SLYRAMLRES KRFSAYNYRT YAVRRIRDAF RENKNVKDPV
MHHHHHHHENLYFQGAASRAQVL SLYRAMLRES KRFSAYNYRT YAVRRIRDAF RENKNVKDPV
1      18      24      34      44      54

51      61      71      81      91
EIQTLVNKAK RDLGVIRRVQV HIGQLYSTDK LIIENRDMPR T
EIQTLVNKAK RDLGVIRRVQV HIGQLYSTDK LIIENRDMPR T
64      74      84      94      104

```

Figura 2.1 La secuencia del ISD11 humano. La secuencia y la numeración NCBI correspondientes a la variante humana de ISD11 se muestran en azul, mientras que la secuencia y numeración correspondiente a la variante recombinante expresada en este trabajo se muestra en negro. Se resaltan el primer y último residuo observado en la estructura de rayos X en amarillo y gris, respectivamente. El motivo LYR está resaltado en fucsia. Su etiqueta y el sitio de la proteasa TEV están subrayados en negro. Es digno de mención que el primer residuo Met de ISD11 humano se mutó a Gly en el caso de la variante recombinante.

```

1      11      21      31      41      51
MASRVLSAYV SRLPAAFAPL PRVRMLAVAR PLSTALCSAG TQTRLGTLQP ALVLAQVPGR

61      71      81      91      101      111
VTQLCRQYSD MPPLTLEGIQ DRVLYVLKLY DKIDPEKLSV NSHFMKDLGL DSLDQVEIIM
MSD M PLTLEGIQ DRVLYVLKLY DKIDPEKLSV NSHFMKDLGL DSLDQVEIIM
1  4      14      24      34      44

121      131      141
AMEDEFGFEI PDIDAEKLMC PQEIVDYIAD
AMEDEFGFEI PDIDAEKLMC PQEIVDYIAD
54      64      74

151
KKDVYE
KKDVYE
84

```

Figura 2.2. La secuencia del ACP humano. La secuencia y la numeración NCBI correspondientes al precursor de la proteína portadora de acilo humana (ACP) se muestran en rojo, la secuencia y numeración correspondientes a la forma recombinante de la variante madura expresada en este trabajo se muestra en negro. Los primeros y últimos residuos observados en la estructura de rayos X se resaltan en amarillo y gris, respectivamente. El residuo de serina modificado por el 4PP está resaltado en cian.

2.2.2. Expresión y Purificación de NFS1 humana

Se utilizó la secuencia optimizada para expresión en *E. coli* insertada en el vector de expresión PET-DUET. Se clonó en la cepa BL-21 de *E. coli*. El extremo N de NFS1 incluyó la etiqueta RSGHHHHHH para la purificación por columna de afinidad Ni²⁺-NTA y el reconocimiento por anticuerpos. La expresión NFS1 humana se llevó a cabo durante la noche a 18 °C (a 250 rpm) en ausencia de la subunidad ISD11. En el momento de la inducción con lactosa 1% se suplementó con piridoxal fosfato (PLP) concentración final 3uM.

Se lisaron las células por sonicación manteniendo la muestra en hielo con agua. A partir de la fracción soluble, utilizando una columna Ni²⁺-NTA-agarosa (primer paso), la proteína se eluyó con 20 Tris-HCl mM, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM (pH 8.0). Después de eso, se añadió DTT 2 mM y NFS1 fue concentrado y congelado en presencia de imidazol 500 mM (pH 8,0). Este protocolo minimizó la agregación y la oxidación de la proteína. Antes de ser utilizado, NFS1 fue descongelado en hielo y centrifugado. Finalmente, la fracción soluble, que contiene la mayor parte de la proteína, se cargó en una columna de cromatografía de exclusión molecular G25 para cambiar el buffer y eliminar el imidazol.

2.2.3. Expresión y Purificación del Supercomplejo Humano (NFS1/ACP-ISD11)₂ y sus variantes NFS1

Las secuencias de ADN de la forma madura humana de la enzima cisteína desulfurasa humana NFS1 (NFS1Δ55), el ISD11 y la proteína portadora de acilo

mitocondrial humana (ACP, la forma madura) se optimizaron para la expresión de proteínas en *E. coli* BL21 (DE3) por BIO BASIC Inc (Markham ON, Canadá).

NFS1 Δ 55 e ISD11 se clonaron en un plásmido pETduet con cassette de resistencia a ampicilina, mientras que ACP se clonó en un pACYCDuet-1 con cassette de resistencia a cloranfenicol para la expresión. La secuencia de aminoácidos de NFS1 incluía la etiqueta RSGHHHHHH en el N-terminal, para la purificación y el reconocimiento de anticuerpos. La inducción de las proteínas se llevó a cabo mediante la adición de IPTG 1 mM cuando el cultivo bacteriano alcanzó una $DO_{600\text{ nm}} = 0.7$. En el momento de la inducción se suplementó con piridoxal fosfato (PLP) concentración final 3 μ M. La co-expresión se llevó a cabo durante la noche a 30°C (a 250 rpm). La purificación del complejo (NFS1/ACP-ISD11)₂ se realizó a partir de la fracción soluble de cultivos de *E. coli* BL21 DE3 utilizando una columna de Ni²⁺-NTA-agarosa (primer paso). La proteína se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8,0. Después de eso, se añadió DTT 1 mM y se dializó NFS1 frente al mismo tampón sin imidazol y se congeló. Este protocolo minimizó la agregación y oxidación de la proteína.

Las distintas variantes de NFS1 fueron producidas en co-expresión con el heterodímero ISD11-ACP siguiendo los mismos procedimientos anteriormente descritos. Para la generación de las mismas se aplicó mutagénesis dirigida por PCR, utilizando el kit comercial de New England Biolabs (Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit*) sobre el plásmido pET duet que contiene a NFS1 y que fue descrito en el párrafo anterior.

2.2.4. Expresión y purificación de la proteína ISCU2

La secuencia de ADN de ISCU2 correspondiente a la forma madura fue optimizada para la sobreexpresión de *E. coli* por Explora Biotech (Roma, Italia) y subclonada en un plásmido pE22b, con una etiqueta His6 C-terminal. La inducción de proteínas se llevó a cabo mediante la adición de una concentración final de IPTG 1 mM (3 h, 37 °C y 250 rpm). ISCU2 se purificó utilizando una columna de Ni²⁺-NTA-agarosa equilibrada en un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8. La elución se realizó con un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8. Después de eso, se añadió DTT 1 mM y se dializó NFS1 frente al mismo tampón sin imidazol y se congeló.

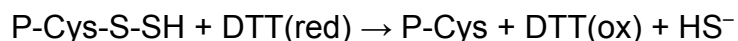
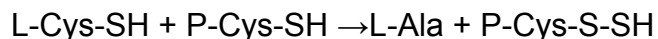
2.2.5. Expresión y Purificación de Frataxina Humana

La frataxina humana (residuos 90-210 correspondientes a la proteína madura) se sobre expresó y purificó utilizando una columna de intercambio aniónico DEAE a pH 7 y se eluyó con gradiente de concentración creciente de NaCl. Luego las fracciones de proteína se cargaron en una columna de exclusión molecular Sephadex G100 preparativa (SEC, 93 cm × 2,7 cm), previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM y NaCl 200 mM (pH 7,0). La pureza fue > 98 % según se evaluó en SDS-PAGE. La identidad se verificó mediante secuenciación de ADN utilizando la instalación MacroGen y mediante análisis de espectrometría de masas. Este último se realizó en el Laboratorio Nacional de Investigaciones y Servicios en Péptidos y Proteínas utilizando un espectrómetro LCQ DUO ESI ion trap (Thermo Finnigan) o Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific).

En todos los casos la pureza de las proteínas se estimó mediante análisis SDS-PAGE. Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro JASCO V-730 BIO (Tokio, Japón). La concentración de proteína se determinó mediante el coeficiente de extinción calculado a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

2.3. Medición de la actividad enzimática del complejo desulfurasa NFS1/ACP-ISD11.

La reacción a evaluar se puede resumir en términos generales con las siguientes ecuaciones:



Para darle seguimiento a esta reacción, en este trabajo de tesis se utilizan fundamentalmente dos métodos: el método de azul de metileno y la detección de L-alanina por RMN en tiempo real. A continuación se detallan ambos métodos.

i) El método azul de metileno

Este método se basa en la reacción que se da entre dimetil piridina y ácido sulfhídrico en presencia de hierro (III), y culmina en la generación de azul de metileno. La medida de absorbancia a 670 nm (máximo de absorción del azul de metileno), será proporcional al ácido sulfhídrico generado por la reacción de desulfuración catalizada por el complejo desulfurasa.

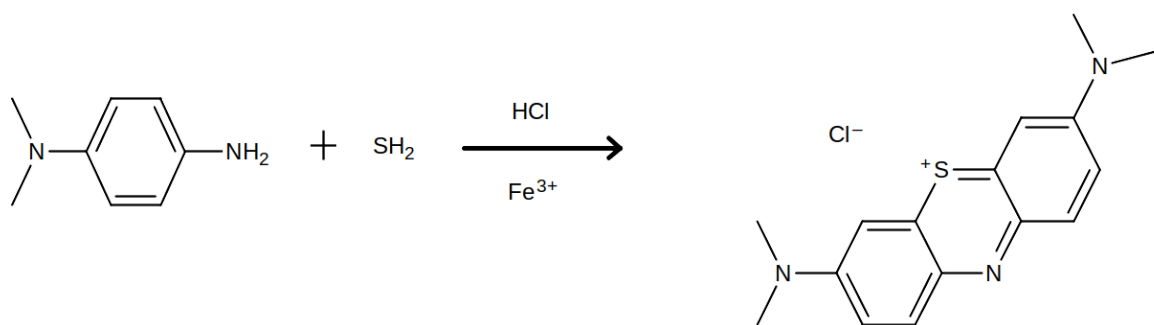


Figura 2.3.1. Descripción de la reacción de DMPD (N,N-Dimetil-p-fenilendiamina) con ácido sulfhídrico en medio ácido y presencia de Fe^{3+} .

Se evaluó por el método del azul de metileno (Moest 1975). Las concentraciones de proteínas, el sustrato y la reducción agente DTT se pusieron a punto de acuerdo con un trabajo previo de Tsai y Barondeau (Tsai y Barondeau 2010). Las mezclas de reacción contenían NFS1 1,0 μM , 1,0 μM ACP-ISD11, 3,0 μM ISCU y 3,0 μM FXN, y muestras se complementaron con PLP 10 μM , DTT 2 mM y 1,0 μM FeSO_4 4 (concentraciones finales). El buffer de reacción estaba compuesto por Tris-HCl 50 mM y NaCl 200 mM (pH 8,0), y las reacciones se iniciaron mediante la adición de cisteína 1 mM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La producción de H_2S se detuvo mediante la adición de 50 μL de N,N-dimetil 20 mM p-fenilendiamina en HCl 7,2 M y 50 μL de FeCl_3 30 mM (preparado en HCl 1,2 M). En estas condiciones, la producción de azul de metileno tardó 30 minutos. Después de eso, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 g, y se separó el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 670 nm. Una de las preocupaciones más importantes con respecto al uso del método de azul de metileno para medir las concentraciones de H_2S es el hecho

de que el bajo pH del *buffer* de reacción libera altas concentraciones de sulfuro del grupo de sulfuro unido a proteínas lábiles a los ácidos (en este trabajo, de los grupos hierro-sulfuro). Por esta razón, los resultados deben considerarse como una medición cualitativa de H_2S libre más parte del sulfuro unido.

ii) Detección de L-alanina por RMN en tiempo real

Este método se fundamenta en encontrar la señal específica que tiene la alanina en el espectro de protones de una dimensión en RMN. En principio la alanina cuenta con dos señales de hidrógeno en su espectro (**Figura 2.3.1**). Se sigue puntualmente la señal de tres protones pertenecientes al grupo metilo de la alanina.

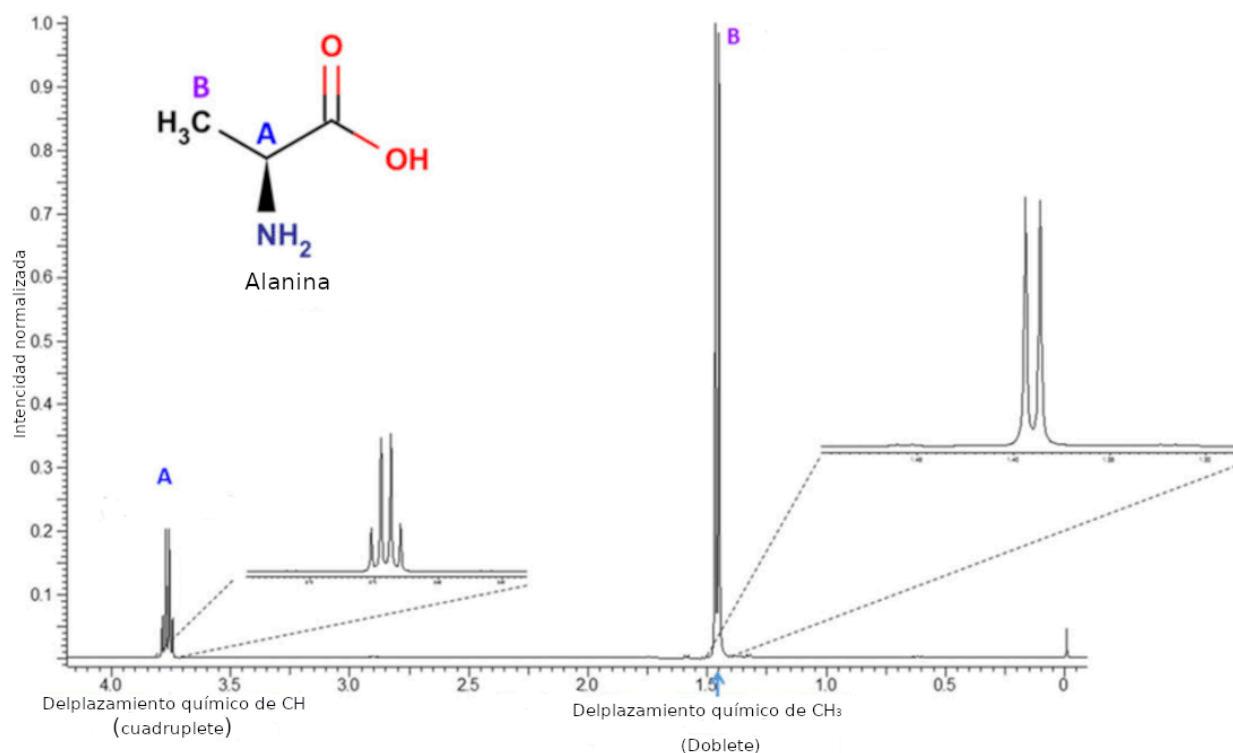


Figura 2.3.2. Espectro RMN de L-Ala, producto de reacción de desulfuración de L-Cys. Se muestran las dos señales de protones que aparecen para L-Ala. En el capítulo 5 de esta tesis ponemos el énfasis en la aparición del doblete que integra para tres protones en el espectro (B) (flecha celeste).

La producción de L-Ala en tiempo real se controló mediante espectroscopia de RMN en dos instrumentos. La mezcla de reacción fue la misma que la mencionada anteriormente. Previo a la medición se agregaron 50 μL de óxido de deuterio (D_2O) en un tubo de ensayo para obtener una concentración de óxido de deuterio en agua del 10%.

Inicialmente se siguieron estudios cinéticos a 25°C en un Bruker 600 MHz Avance III, logrando la supresión de la señal de agua mediante el uso de una secuencia 1D NOESY. Los datos de RMN se procesaron con NMR Pipe y se analizaron con NMR ViewJ.

Los estudios de las reacciones a tiempo fijo se midieron a 25°C en un espectrómetro Fourier Bruker de 300 MHz (ver más abajo). El curso de la reacción fue seguido por $1\text{D}^1\text{H}$ con supresión de agua por presaturación. Los datos de RMN se procesaron y analizaron utilizando MestReNova. En todas las muestras se añadió ácido maleico como patrón interno a una concentración final de 200 μM .

Antes de cada experimento, la sonda se sintonizó y emparejó con una muestra de composición similar. El retraso entre el inicio de la reacción y el inicio de la adquisición se midió con precisión para cada una de las reacciones. También se consideró la duración del programa de pulsos para obtener un valor de tiempo preciso. Los parámetros clave se ajustaron para obtener la máxima sensibilidad (relación señal/ruido) en un tiempo razonable para un estudio cinético. El pulso de RMN aplicado nos permitió adquirir un espectro $1\text{D}^1\text{H}$ cada 7 min. Los picos correspondientes de L-Ala (doblete de protones del metilo en δ 1,47 ppm) se integraron y representaron en función del tiempo.

2.3.1. Detección de L-alanina a punto fijo por ^1H -RMN 1D

Para experimentos de punto fijo, utilizamos un espectrómetro de 300 o 500 MHz. Cada muestra de reacción de desulfurasa se detuvo a los 120 min calentándola a 98°C durante 5 min (se evitó un cambio a valores de pH ácidos debido al cambio en los desplazamientos químicos) y se centrifugó a 10000 rpm en una centrifuga Eppendorf para separar los agregados proteicos y almacenarlos a -20°C . Los picos de protones correspondientes a DTT, PLP, L-Ala, L-Cys y Tris se identificaron mediante espectros específicos para cada compuesto.

Las muestras se prepararon mediante la adición de 50 μL de óxido de deuterio (D_2O) para obtener una concentración de óxido de deuterio del 10%. En todas las muestras se añadió ácido maleico como patrón interno a una concentración final de 200 μM .

La adquisición se realizó con un espectrómetro Bruker FOURIER de 300 MHz equipado con una sonda de 5 mm DUL 13C-1H/ D Z-GRD Z111650/0010) ajustada a 25°C . Los parámetros clave se ajustaron para obtener la máxima sensibilidad (relación señal/ruido). Para aumentar la sensibilidad, utilizamos un espectrómetro Bruker Avance Neo de 500 MHz (sonda ATM de gradiente Z BBI (inverso) de 5 mm para ^1H y núcleos en el rango de ^{31}P a ^{109}Ag), ajustado a 25°C . El pulso de RMN aplicado fue un $1\text{D}^1\text{H}$ con supresión de agua por presaturación. Los datos de RMN se procesaron y analizaron usando MestReNova.

Se integraron la región correspondiente al pico del doblete de protones de metilo (a δ 1,47 ppm) de L-Ala y la región correspondiente al pico del singlete de protones olefínicos del ácido maleico (a δ 5,99 ppm). El uso del patrón interno tiene la doble

ventaja de permitir normalizar el área de las señales y así poder comparar entre los espectros correspondientes a los diferentes mutantes, pero también permite obtener la concentración de Ala en cada una de las muestras de forma sencilla y directa.

2.3.2. Límites de detección y cuantificación

La literatura sugiere que los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se pueden estimar bien en función de la curva de calibración como:

$$LOQ = \frac{10 \times}{S}(1)$$

$$LOD = \frac{3 \times}{S}(2)$$

Donde s es la desviación estándar de las intersecciones y de las líneas de regresión, y S es la pendiente. Se construyó la curva de calibración, para ambos instrumentos de RMN (300 o 500 MHz), usando las muestras estándar de una serie de diluciones de L-Ala (en el rango de 10–350 μM), manteniendo la misma matriz de proteína y *buffer* que será utilizados en las muestras a analizar. Se calcularon la desviación estándar de las intersecciones y la pendiente y los resultados actuales para LOQ y LOD se resumen en la **Figura 2.3**. Con este enfoque, el LOD y el LOQ se calcularon como 20 μM y 65 μM respectivamente para RMN de 300 MHz, y 12 μM y 41 μM para RMN de 500 MHz (**Tabla 2.2**, información de apoyo en línea). Estos valores estaban de acuerdo con el análisis visual de la serie de dilución de las muestras de calibración cuando se usaron para determinar el LOD.

Table 2.2. Cálculos estadísticos para la cuantificación de límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ).

Análisis	Instrumento 300 MHz	Instrumento 500 MHz
Pendiente (S)	0.00840	0.00942
Error estándar de S	0.00015	0.00010
intersección (b)	-0.03992	-0.11521
Error estándar de b	0.02837	0.017977
Coeficiente de determinación (R^2)	0.99742	0.099897
Error estándar de Y	0.05463	0.03866
n	8	9
²LOQ (M)	65.0	41.1
¹LOD (M)	19.5	12.3

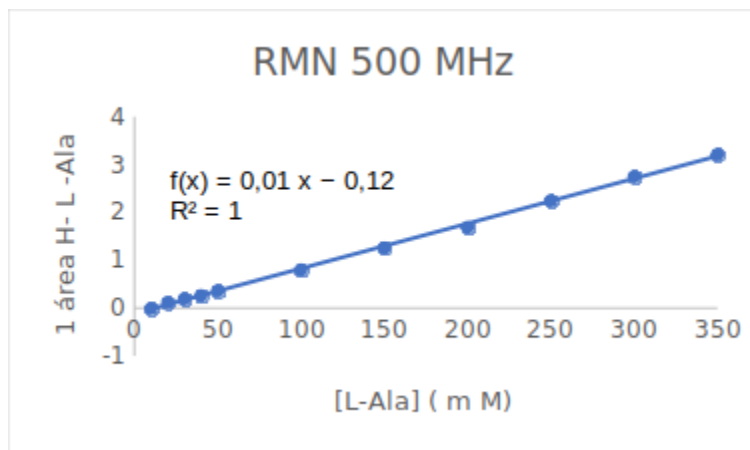


Figura 2.3.4 Curva de Calibraciones para Cuantificación de L-Ala por RMN usando Instrumentos de 300 o 500 MHz.

2.4. Caracterización espectroscópica de variantes NFS1 en el subcomplejo (NFS1/ACP-ISD11)₂.

Las mediciones de espectros de fluorescencia de triptófano se realizaron a 20°C. La excitación se realizó a 295 nm y los espectros se adquirieron entre 305 y 500 nm, utilizando una celda de 2 mL de volumen y un camino de 1 cm. Los anchos de banda espectral se establecieron en 4 nm para ambos monocromadores. Además, los espectros se adquirieron en presencia o ausencia de desnaturante (urea 8,0 M).

Las mediciones de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J-815. Los espectros de CD de ultravioleta lejano se recopilaron utilizando una celda de longitud de trayectoria de 0,1 termostatzada a 20°C. Las concentraciones de proteína estaban entre 5 µM y el tampón era Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. Los datos se adquirieron a una velocidad de exploración de

20 nm min⁻¹, con un ancho de banda de 1 nm y un paso de datos de 0,1 nm. Se promediaron cinco barridos para cada muestra y se restó el espectro en blanco.

2.5. Simulaciones de dinámica molecular

2.5.1. El campo de fuerza y las herramientas utilizadas (AMBER)

AMBER es el nombre de un paquete de programas que permiten a los usuarios realizar simulaciones de dinámica molecular particularmente en biomoléculas. Asimismo, existe el campo de fuerzas de AMBER (Maier et al. 2015), el cual puede utilizarse en el contexto de este paquete de programas o con otros programas de dinámica molecular.

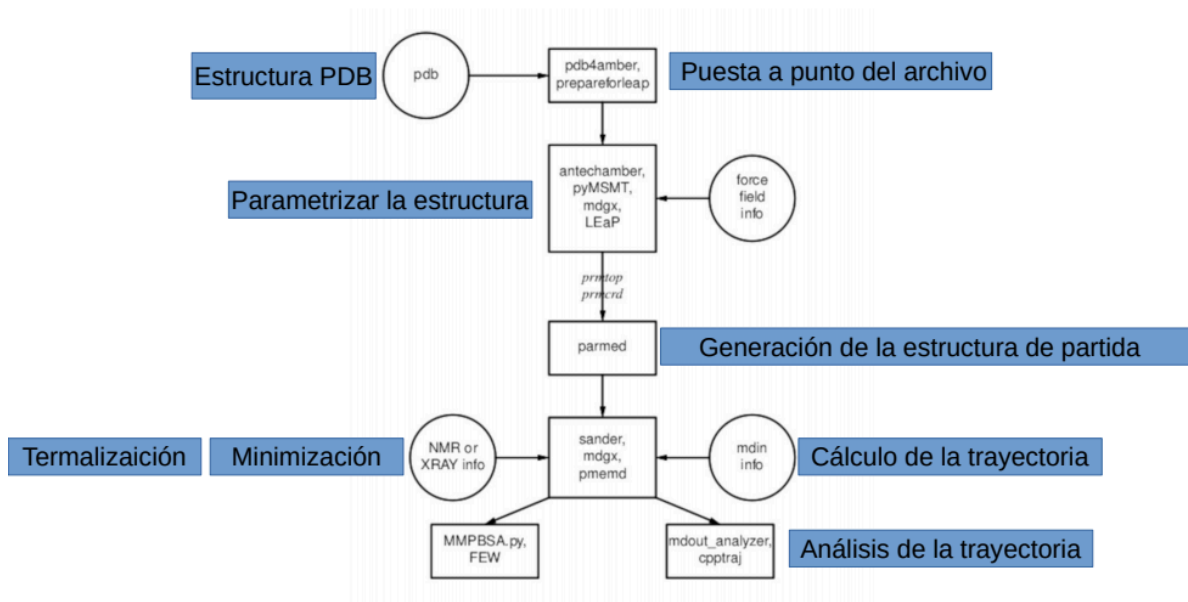


Figura 2.5.1 Esquema de flujo de trabajo tomado del manual de AMBER22 para la elaboración del cálculo de dinámicas moleculares. Los distintos programas que componen AMBER están en cuadros mientras que datos adicionales que necesitan para trabajar están en círculos. Los cuadros azules fueron agregados a la figura original para explicar el objetivo o tarea de cada programa en cada paso.

El inicio del proceso, tal como indica la **Figura 4.2**, requiere un juego de coordenadas cartesianas para cada átomo en el sistema. Estos generalmente provienen de cristalografía de rayos X, RMN, CME o incluso de la construcción de modelos predictivos netamente computacionales. Por lo general, deben estar en formato de *Protein Data Bank* (PDB) y por lo general es necesario editar estos archivos. Algunos programas dentro de AMBER como `pdp4 amber` pueden hacer algunas de estas tareas iniciales.

Una vez que el archivo de coordenadas está puesto a punto, se prepara lo que se denomina el archivo de topología del sistema. Esto implica definir, la conectividad entre los átomos, y asignar todos los parámetros correspondientes, extraídos del campo de fuerzas. En este momento también se genera la caja de solvente. La topología para los aminoácidos estándar, así como aminoácidos cargados N- y C-terminal, ADN, ARN y azúcares y lípidos, u otros ligandos comunes están incluidas en la base de datos de AMBER y se asignan automáticamente usando el programa Leap. La información de topología para otras moléculas (no encontradas en la base de datos) debe calcularse en particular y guardarse en "archivos residuales" generados por el usuario para que el programa pueda incorporarlos a la topología de la estructura de partida. Para la creación de estos parámetros adicionales suele usarse el programa Antechamber.

Queda introducir el campo de fuerza. Este incluye los parámetros para todos los enlaces, ángulos, diedros, interacciones electrostáticas, y tipos de átomos en el sistema (**Ecuación 1**). El estándar de los parámetros para varios campos de fuerza se encuentran guardados dentro de AMBER y se pueden usar "tal cual" para proteínas y

ácidos nucleicos, o los usuarios pueden preparar sus propios archivos que contienen modificaciones a los campos de fuerza estandarizados.

$$V_{\text{AMBER}} = \sum_i^{n_{\text{bonds}}} b_i (r_i - r_{i,\text{eq}})^2 + \sum_i^{n_{\text{angles}}} a_i (\theta_i - \theta_{i,\text{eq}})^2 + \sum_i^{n_{\text{dihedrals}}} \sum_n^{n_{i,\text{max}}} (V_{i,n}/2) [1 + \cos(n\phi_i - \gamma_{i,n})] \\ + \sum_{i<j}^{n_{\text{atoms}}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{i<j}^{n_{\text{atoms}}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}},$$

Ecuación 2.1. Ecuación básica de la energía potencial (campo de fuerza) usado por AMBER.

Luego de este preprocesamiento del sistema, se procede a realizar la simulación de dinámica molecular. Existe un protocolo establecido, con algunas variaciones posibles, antes de obtener la trayectoria con la que se va a extraer la información. En general, lo primero que se realiza es una minimización de la energía de la estructura de partida para evitar colisiones que disparen la energía inicialmente y conseguir que los impedimentos estéricos y torsionales se respeten. Las velocidades iniciales se asignan aleatoriamente a cada átomo y se les permiten evolucionar desde ese punto. A continuación, las moléculas deben ir acelerándose para llegar a la velocidad que se corresponde con la temperatura a la que se quiere evaluar la macromolécula. Para ello se utiliza una rampa de temperatura, la cual se va subiendo lentamente hasta llegar al valor deseado. Luego de alcanzada la temperatura deseada, se realiza la dinámica de producción.

2.5.2. Herramientas para el análisis de trayectorias

Una vez obtenida una trayectoria de dinámica molecular, se acude a una serie de estrategias para el análisis de los resultados obtenidos. Es necesario en primer lugar verificar la estabilidad de los sistemas simulados, y posteriormente extraer información

estructural y dinámica. A continuación se describen algunas medidas ampliamente utilizadas en general al realizar simulaciones.

- 1) RMSD: La raíz cuadrada del desvío cuadrático medio (root of the mean squared deviations o RMSD). El mismo es una medida de similitud global entre dos estructuras, donde una se elige como referencia. La expresión mediante la cual se estima el RMSD es la siguiente **Ecuación 2.2**:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n ||\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_i^{\text{ref}}||^2}$$

Ecuación 2.2. Fórmula para el cálculo de RMSD

donde x_i es la posición de la i -ésima partícula y x_i^{ref} es la posición de la misma partícula en la estructura de referencia. Usualmente se calcula el RMSD para cada cuadro de una trayectoria y se lo grafica como función del tiempo. Esta medida suele ser utilizada como criterio de estabilidad en la dinámica molecular. Valores muy altos (en general mayores a 2.5-3Å) indican que el sistema se alejó significativamente de la posición de referencia (frecuentemente la estructura inicial). Por otra parte, un RMSD que no está estabilizado (es decir que aumenta con el tiempo o presenta grandes picos) muestra que el sistema está explorando algún cambio conformacional importante o que es muy fluctuante.

Es frecuente calcular estas magnitudes en proteínas utilizando únicamente los átomos del esqueleto proteico, para no tener en cuenta la variabilidad conformacional propia de las cadenas laterales.

- 2) RMSF: La raíz cuadrada de las fluctuaciones cuadráticas medias otorga una noción de la similitud local entre un conjunto de estructuras, usualmente

provenientes de una trayectoria generada mediante dinámica molecular. La expresión utilizada para su cálculo es la siguiente: **Ecuación 2.3.**

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{j=1}^T ||\mathbf{x}_i(t_j) - \mathbf{x}_i(t_1)||^2}$$

Ecuación 2.3. Fórmula para el cálculo de RMSF

Esta medida informa acerca de la distancia media de cada átomo (o conjunto de átomos) respecto de una referencia (t_1) promediada en el tiempo, luego de buscar una superposición óptima de cuerpos rígidos. Es frecuente calcular esta magnitud en dinámicas moleculares para cada residuo, de forma tal de obtener una noción acerca de las fluctuaciones de la proteína en cada tramo de su secuencia aminoacídica y de esta forma poder tener una descripción de las regiones más flexibles y las más rígidas.

2.5.3. Simulación del Hetero dímero ISD11-ACP

Se realizaron cinco réplicas de dinámica molecular para cada complejo, extendidas a 50 ns. El alineamiento estructural del carbono alfa se realizó utilizando la primera instantánea de la respectiva simulación de producción como referencia. Además, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular más larga de 300 ns para ACP- ISD11 (con 4PP-cadena acilo C12) para evaluar la persistencia de las interacciones entre subunidades. Los puentes salinos se midieron a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular como la distancia entre el carbono carbonilo (CG o CD para las cadenas laterales de ácido aspártico o glutámico, respectivamente) y CZ de arginina. Las coordenadas iniciales en todos los casos se tomaron del complejo ACP- ISD11 humano (PDB ID: 6ODD) se solvataron con el modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al. 1983), editando para el archivo para quedarse con la estructura

a simular en cada caso (ISD11 sola o ISD11-S12). En nuestros modelos, los estados de protonación de los residuos de aminoácidos se establecieron para corresponder a los de un pH neutro. En el caso de los residuos de histidina, se estableció la protonación para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno. El fosfato de serina, 4PP y la cadena acilo (12 y 16 átomos de carbono) se parametrizan utilizando el paquete de software Antechamber, y se calcularon las cargas atómicas de Mulliken con el software QM-MM LIO (Marcolongo et al. 2018). Se aplicó un protocolo de minimización estándar a las estructuras resultantes para eliminar especialmente los choques de hidrógeno. Los sistemas se calentaron de 100 a 300 K utilizando el termostato de Berendsen y posteriormente se cambiaron a una presión isotrópica constante para permitir que la densidad se equilibrara. Se aplicó el algoritmo SHAKE. Se estableció un paso de tiempo de 2fs. Se realizaron simulaciones de MD sin restricciones con Amber16 (Maier et al. 2015).

Se realizaron cálculos de estabilidad y efectos mutacionales utilizando FOLDX implementado en YASARA (Krieger y Vriend 2014). Para estos cálculos, se dejó de lado 4PP-acilo. Esto debe considerarse una aproximación.

2.5.4. Simulación del super complejo Desulfurasa en presencia y ausencia de FXN

Las coordenadas iniciales son las correspondientes al super complejo wild-type (NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN)₂ (PDB ID: 6NZU). Se solvató con las moléculas del modelo de agua TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar y Madura 2015). Los estados de protonación de los residuos de aminoácidos se establecieron para corresponder a los de pH 7,0. Al igual que en trabajos anteriores, en el caso de los residuos de His, se

estableció la protonación δ o ϵ para favorecer la formación de puentes de hidrógeno (Capece et al. 2006). Se implementó un protocolo de minimización estándar a las estructuras resultantes para eliminar específicamente los choques estéricos. Los sistemas se calentaron desde 100K hasta la temperatura deseada de 298K usando el termostato Berendsen y condiciones de volumen constante. Se utilizó un paso de tiempo de 2 fs y se aplicó el algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti y Berendsen 1977). Se realizaron simulaciones MD de producción de 500 ns sin restricciones con Amber 18 (Case et al. 2018), utilizando el campo de fuerza ff14SB (Maier et al. 2015). El análisis de las corridas de producción se realizó utilizando el software CPPTRAJ de AmberTools.

Las estructuras correspondientes al super complejo humano (PDB ID: 6NZU, (Fox et al. 2019))(NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN)₂, o (NFS1/ACP-ISD11/ISCU)₂ se insertaron en una caja octaédrica de agua TIP3P. Los estados de protonación de los residuos de aminoácidos se establecieron para corresponder a los de pH 7,0. Como en trabajos anteriores, en el caso de los residuos de His, δ o ϵ la protonación se estableció para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno (Capece et al. 2006). Se aplicó un protocolo de minimización estándar a las estructuras resultantes para eliminar específicamente los choques estéricos. Los sistemas se calentaron desde 100K hasta las temperaturas deseadas (300 o 340 K) utilizando el termostato Berendsen. Se utilizó un paso de tiempo de 2 fs y se aplicó el algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti, y Berendsen 1977). Se realizaron simulaciones MD de producción de 600 ns sin restricciones con Amber 18, utilizando el campo de fuerza ff14SB (Maier et al. 2015). El

análisis de las corridas de producción se realizó utilizando el software CPPTRAJ de AmberTools .

2.6. Análisis HPLC de muestras de péptidos y proteínas

El análisis de HPLC de fase inversa se realizó utilizando un sistema JASCO, equipado con un autoinyector, detector de UV y un horno termostatzado a 25°C. Se realizaron gradientes de 0 a 100 % de acetonitrilo y se agregó 0,05 % de TFA (v/v) a los solventes y muestras. Las columnas utilizadas fueron analíticas C4 y C18 (Higgins Analytical, Inc. USA) y el flujo fue de 1,0 mL min⁻¹. Las proteínas se monitorearon a 220 nm. Todas las muestras fueron centrifugadas antes de la inyección.

2.6.1. Análisis HPLC de fase inversa del contenido de PLP en variantes NFS1

Para la cuantificación de PLP, el cofactor se liberó de una preparación de proteína NFS1/ACP-ISD11 7,0 µM mediante la adición de ácido (concentración final de HCl 50 mM) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, la muestra se centrifugó y luego se cargó en un sistema JASCO HPLC. Se utilizó una columna C18 de fase inversa y los componentes de la muestra se eluyeron mediante un gradiente de acetonitrilo (0 a 100% en 40 min). Todo el disolvente de HPLC contenía TFA al 0,05%. Se cargaron muestras de PLP a una concentración similar (7,0 µM) como estándar. Las muestras se inyectaron con un autoinyector y la detección se realizó a 220 nm para seguir el PLP y las proteínas. El PLP prácticamente no fue retenido por la matriz C18 y se eluyó justo después del cloruro y las sales. Adicionalmente, para estimar el

contenido de PLP, se adquirieron espectros de absorción UV-VIS para las variantes (complejos NFS1/ACP-ISD11) y se analizaron los ratios 420 nm / 280 nm.



Les Grecs avaient compris la mystérieuse puissance de ce dessous de choses. Ce sont eux qui nous ont légué un des plus beaux mots de notre langue, le mot enthousiasme. -en théo- Un Dieu intérieur.

Louis Pasteur

Capítulo 3: El rol estructural del heterodímero ACP-ISD11 en la solubilidad y estabilidad conformacional de NFS1

3.1. Contexto

En los mamíferos, el complejo proteico mitocondrial para el ensamblaje centros ferrosulfurados [2Fe-2S] está conformado por varias proteínas. NFS1, ISD11, ACP, FXN e ISCU forman este complejo enzimático en un arreglo decamérico compuesto por dos subunidades de cada una de estas proteínas.

Cada una de ellas cumple un rol dentro del complejo y mutaciones en las distintas subunidades desencadenan diferentes enfermedades de origen genético, tal y como se detalla en el Capítulo 1. Puntualmente, en este capítulo se profundiza sobre distintos aspectos vinculados al heterodímero ACP-ISD11 y, especialmente, al rol que este cumple en cuanto a la estabilidad conformacional y solubilidad de NFS1, así como sus implicaciones fisiopatológicas, como por ejemplo, indagar las posibles causas patogénicas de variantes de ISD11.

3.1.2. ISD11 y su relación con ACP

La subunidad ISD11 también conocida como proteína 4, tiene un contenido extraordinariamente alto de residuos de lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R), que da como resultado un muy elevado punto isoeléctrico de 10,7, así como una fuerte tendencia a la agregación durante su sobreexpresión en bacterias *E. coli* BL21. Varios intentos de replegado de esta proteína fracasaron, (Herrera et al. 2018) aunque la presencia de detergentes como N-dodecil β -D-maltósido (DDM) o SDS favorecieron un aumento

significativo en la solubilidad, fue imposible obtenerla con estructura en altas concentraciones y la proteína exhibió una fuerte tendencia a precipitar y una elevada sensibilidad a la proteólisis. Estudios posteriores mostraron que ISD11 requiere de ACP como proteína estabilizadora para lograr su correcto plegado y solubilidad (Herrera et al. 2018).

Por otro lado, contiene el motivo LYR23 y una señal de direccionamiento mitocondrial en su sección N-terminal (Adam et al. 2006) que no es clivada una vez dentro de la matriz de la organela. Esta es una proteína esencial y ampliamente conservada en los organismos eucariotas, tal como se aprecia en el logo de la **Figura 3.1**, (Wiedemann et al. 2006). Sin embargo, está completamente ausente en bacterias y arqueas. Este detalle resulta interesante a la hora de reflexionar sobre las posibles implicaciones estructurales y evolutivas del super complejo, puntualmente aquellas relacionadas con ACP, una proteína clave que forma parte del metabolismo de prácticamente todos los organismos vivos conocidos.

Los primeros indicios de interacciones entre ACP y proteínas que contienen motivos tipo LYR surgieron en el contexto de estudios proteómicos, (Huttlín et al. 2015; Angerer 2015) a los que posteriormente se sumó evidencia experimental de la interacción entre ellas; así como su relevancia en la función y estabilización de las proteínas. Por ejemplo, la interacción entre los módulos ACP y LYR es esencial para la actividad y el ensamblaje y/o la estabilidad del complejo mitocondrial respiratorio I (Angerer et al. 2014). Además, la forma acilada de ACP es un activador alostérico de la familia de proteínas LYR involucrada en la activación de la biogénesis de proteínas de matriz mitocondrial.

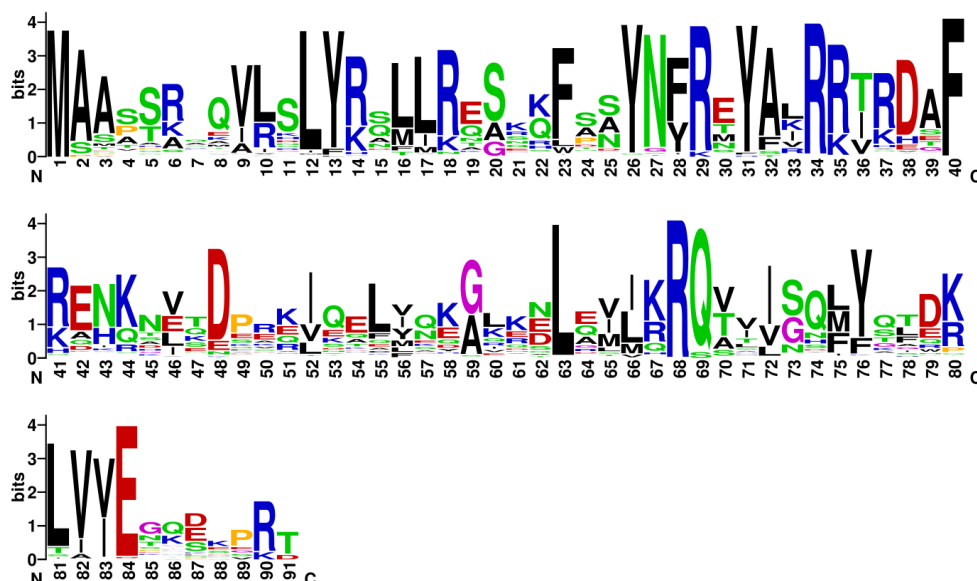


Figura 3.1. Conservación entre secuencias de proteínas ISD11. Elaborado según descripción del capítulo 2.1.4. (Ashkenazy et al. 2016; Armon, Graur, y Ben-Tal 2001). La numeración se realizó de acuerdo con el ISD11 humano. El LOGO se preparó usando WEBLOGO3 (Crooks et al., s. f.).

3.1.2. El heterodímero ACP-ISD11 y sus posibles roles estructurales en el complejo desulfurasa

En el contexto del complejo de biosíntesis de centros ferrosulfurados, ISD11 tiene una serie de particularidades estructurales. Con el surgimiento de las primeras estructuras del complejo completo logradas por difracción de rayos X y posteriormente por criomicroscopía electrónica, quedaron en evidencia sus interacciones con ACP de *E. coli* (ACPC)(Cai et al. 2018; Fox et al. 2019). Al intentar co-cristalizar el complejo ISD11-NFS1, la estructura resultante contenía a la ACP de *E. coli* (ACPC), de una manera tal que la cadena de acilo de la proteína holo ACP complementa el núcleo o core hidrofóbico de ISD11 al mismo tiempo que las cargas negativas de ACP interactúan con la superficie cargada positivamente de ISD11, consolidando así la

estructura cuaternaria. Dado el alto nivel de identidad entre la ACP de *E. coli* y la ACP humana (ACPh) se especuló de inmediato que existiría un rol para ACPh en la función del super complejo desulfurasa y así fue (**Figura 3.2**).

Adicionalmente, las interacciones sobre la superficie hidrofóbica de NFS1, hacen pensar que existe un rol por parte de esta en prevenir la agregación del homodímero NFS1-NFS1. Varios estudios muestran a ACPc siendo parte del complejo ternario NFS1/ACP-ISD11 (Boniecki et al. 2017; Gakh et al. 2017; Fox et al. 2019). Más importante aún, la estructura resultante de la cristalización de NFS1, ACPc e ISD11 humanas muestra que ISD11 forma un ancla entre ambas subunidades de NFS1, estabilizando así a la forma dimérica.

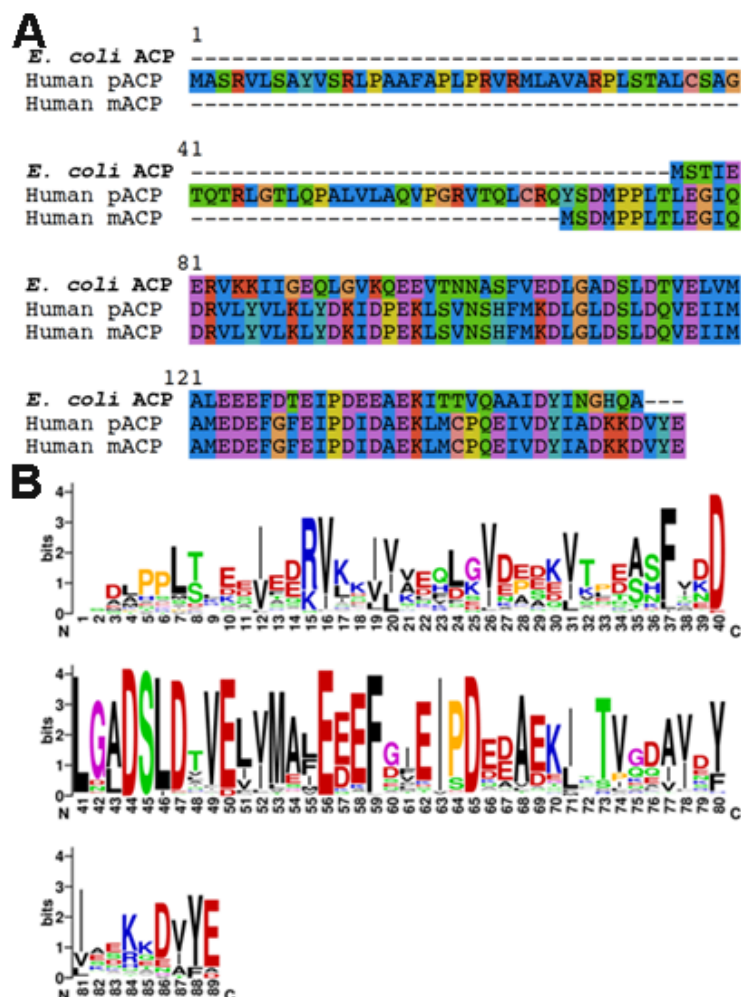


Figura 3.2. Conservación entre proteínas transportadoras de acilo. (A) Se muestra la alineación de secuencias de ACP de mitocondrias humanas y de *E. coli*. La alineación se llevó a cabo utilizando *Seaview* (Gouy, Guindon, y Gascuel 2010) y el algoritmo MUSCLE. pACP y mACP indican el precursor mitocondrial humano de ACP y la forma recombinante madura de la variante producida en este trabajo. La numeración corresponde a la del precursor ACP humano. (B) El LOGO para las proteínas ACP se preparó utilizando 135 secuencias recuperadas de CONSURF 1, <http://consurf.tau.ac.il/2016/>. La numeración se realizó de acuerdo con mACP, donde Met 1 se tomó como el primer residuo. LOGO se preparó utilizando WEBLOGO 2 (Crooks et al., s. f.).

En un trabajo previo, nuestro grupo decidió explorar el efecto que tiene la coexpresión de la forma mitocondrial humana de ACP (ACPh) sobre la solubilidad y conformación de ISD11 (Herrera et al. 2018). Descubrimos que ambas proteínas forman un heterodímero estable, altamente soluble y estructurado, observándose en solución tanto una forma dimérica como un tetrámero. Además, ACP-ISD11 recombinante pudo interactuar con NFS1, formando un complejo de mayor tamaño confiriéndole actividad y estabilidad a la enzima desulfurasa.

Curiosamente, el análisis de espectrometría de masa de ACP-ISD11 humano recombinante mostró que ACP incluye a 4PP y una cadena de acilo que presenta cierta heterogeneidad en su estructura covalente (**Figura 3.3**), incluyendo formas oxidadas de cadenas acilo C14 y C16, que pueden observarse en un perfil de HPLC de fase reversa (C18) como varios picos (inserto, **Figura 3.3B**) Resultados similares han sido reportados por otros grupos (Majmudar et al. 2019).

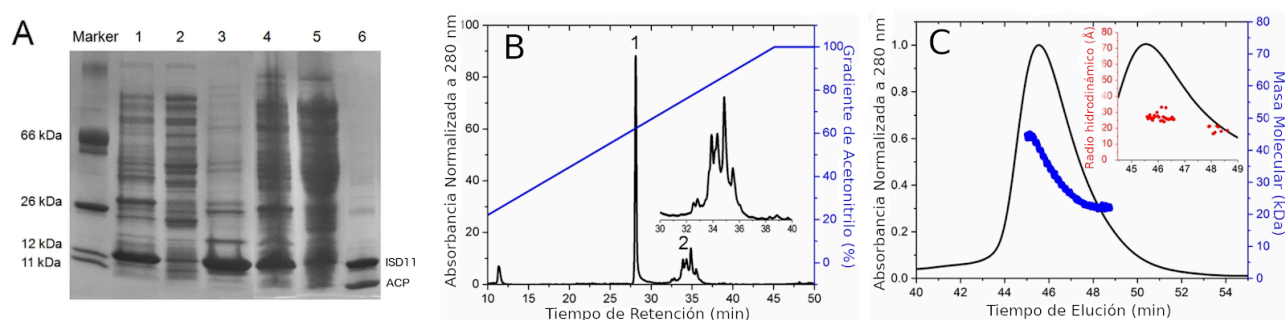


Figura 3.3. Expresión en bacterias y purificación de ACP-ISD11. (A) Se muestra un SDS-PAGE correspondiente a la expresión del heterodímero en *E. coli* BL21 (calle 6 corresponde a la fracción correctamente purificada). (B) Se muestra un HPLC de fase reversa (C18) en que se visualiza un pico correspondiente a ISD11 mientras que ACP se particiona en numerosos picos debido a la heterogeneidad en la longitud de la cadena de ácido graso. (C) Se muestra el perfil de elución del heterodímero en una cromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC) conectada a un detector de dispersión luminosa que posibilita evaluar el estado de agregación de la proteína en solución.

3.1.3. Cristalización y caracterización del heterodímero ACP-ISD11 humano

En cuanto a la consolidación del complejo para el montaje de centros Fe-S, una pregunta importante es si el complejo ACP-ISD11 humano requiere a la desulfurasa NFS1 para adquirir su estructura. En ese sentido un último antecedente relevante se llevó adelante en nuestro laboratorio en un trabajo liderado por Herrera y colaboradores (Herrera et al. 2019). Para contestar esta pregunta, llevamos a cabo la determinación estructural de ACP-ISD11 en ausencia de cualquier otro miembro del super complejo. El heterodímero se purificó a partir de la coexpresión de ISD11 y ACP_h tal y como se especifica en el Capítulo 2.3.

La estructura del complejo humano ACP-ISD11 muestra algunas características relevantes. Lo más importante es que puede ser superpuesta a la estructura previamente determinada para la heterodímero formado por *E. coli* ACP e ISD11 humano en el contexto de la enzima NFS1 (**Figura 3.4**). Nuestra estructura incluye varias cadenas laterales que antes no se podían situar.

Cabe destacar que los aminoácidos de las proteínas *E. coli* y ACP humana son 43% idénticas y 68% similares. En este sentido, la ACP humana y la ACP de *E. coli* establecen casi las mismas interacciones hidrofóbicas proteína-proteína, red de enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas con ISD11, un hecho que explica por qué ACP_c se obtuvo como una “proteína pasajera” cuando NFS1 e ISD11 se expresaron conjuntamente en células *E. coli* BL21 (Boniecki et al. 2017; Cory et al. 2017; Cai et al. 2018).

La ACP humana exhibe hélices α -terminales N y C más largas, en comparación con las observadas en ACP de *E. coli* (entrada PDB: 5WGB7); sin embargo, también se observan hélices más largas en el apo forma de *E. coli* ACP (entrada PDB 1T8K).

Por estas razones, se pueden esperar cambios conformacionales para estas regiones de las ACP. Además, ni los aminoácidos N-terminal ni los residuos C-terminal de ACP humano tienen estructura secundaria; aunque, partes de estos tramos interactúan entre sí (por ejemplo cadenas de la Leu9 y la Val87 o la cadena principal de la Leu9 y con la cadena principal del Glu89).

La estructura tridimensional del complejo se estabiliza por numerosas interacciones iónicas establecidas entre cadenas laterales ácidas de ACP y residuos ISD11 cargados positivamente: Glu56/Arg31, Asp44/Arg54, Asp57/Lys34, Asp65/Arg27, y Glu50/Arg50. El software de predicción estructural FOLDx predice que las mutaciones R27A, R31A, R50A y R54A sean altamente desestabilizantes: valores de $\Delta\Delta G^\circ_{\text{NU}}$ de 1.5, 1.2, 1.6 y 1.5 kcal mol⁻¹, respectivamente. Estos cuatro residuos de Arg de ISD11 son extremadamente conservados (**Figura 3.4**) y la mutación a Ala de los residuos menos conservados Lys34 y Lys57 podría tener efectos más débiles sobre la estabilidad (0.7 kcal mol⁻¹). De la misma forma, Majmudar y colaboradores observaron que la co-expresión de ACP adicionada con una cola de histidinas e ISD11 sin marcar, en una serie de experimentos de desplegamiento mostraron que la mutación de Arg50 o Arg54 a Ala afecta drásticamente la unión de ISD11 a ACP humana, mientras que el reemplazo de Lys57 por Ala produce un efecto menor (Majmudar et al. 2019).

Las densidades electrónicas bien definidas correspondientes a la 4PP y la cadena de acilo sugieren que no hay múltiples conformaciones para estos restos

(Figura 3.5A), y también es indicativo de una estructura sustancialmente rígida. La densidad electrónica correspondiente al ligando pudo ser satisfactoriamente modelada por una cadena de acilo de 12 carbonos unida a 4PP. El 4PP-acil está involucrado en múltiples interacciones con ISD11. El complejo formado por la cadena 4PP-acilo e ISD11 implica un área de interfaz de $\sim 570 \text{ \AA}^2$. Este último comprende $\sim 80\%$ de la superficie total del ligando 4PP-acilo. El grupo fosfato del resto 4PP interactúa con el residuo Arg19 altamente conservado y con la Lys57. Tres enlaces de hidrógeno estabilizan la interacción entre ISD11 y el ligando 4PP-acilo, como se muestra en la **Figura 3.4B**: (i) el carbonilo de la Asn56 con el átomo de oxígeno-4PP, el átomo de nitrógeno amida, (ii) el átomo de nitrógeno de la Asn56 con el átomo de oxígeno de la cadena de acilo, y (iii) el carbonilo de la Lys57 con el átomo de oxígeno-4PP. Además, se establece un enlace de hidrógeno entre el grupo amida de la cadena principal de la Ser45 de ACP y un átomo de oxígeno del grupo fosfato. Por su parte, se establecen múltiples interacciones apolares entre átomos de carbono del 4PP, Val22 e Ile65. Finalmente, la Phe53 interactúa con los átomos de carbono de la cadena de acilo (**Figura 3.5**) (Herrera et al. 2018).

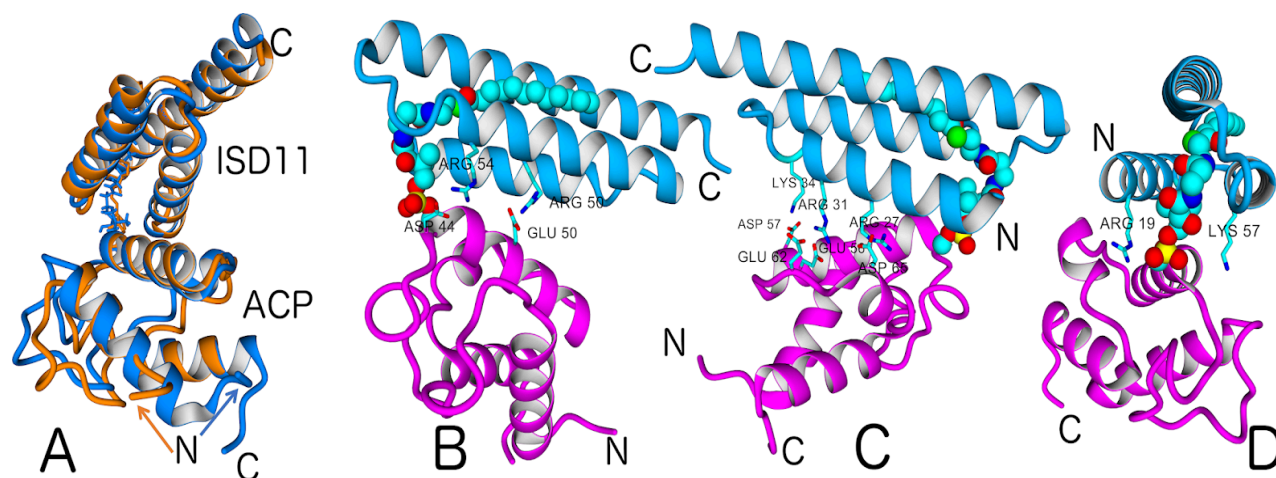


Figura 3.4. Estructura del complejo ACP-ISD11 humano. (A) Superposición de ACP-*ISD11h* (cian) y ACP-*ISD11h* (naranja) (PDB 5WGB), en representaciones de cinta). El alineamiento estructural se realizó mediante el algoritmo MUSTANG. Además, la Ser45 y la cadena de 4PP-ácido se muestra como barras. (B y C) Interacciones iónicas establecidas entre residuos ácidos de ACP (Glu y Asp) y residuos cargados positivamente de ISD11 (Arg y Lys). (D) Interacción entre Arg19 y Lys57 con el grupo fosfato de 4PP.

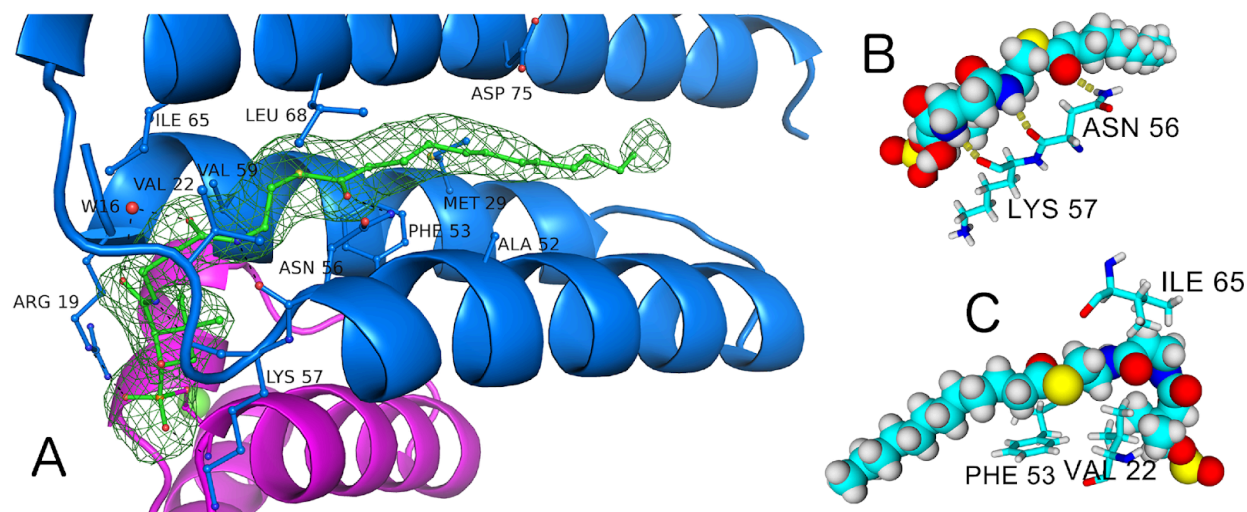


Figura 3.5. Interacciones entre el acilo de fosfopanteteína e ISD11. (A) Mapa OMIT de Polder (malla verde 49) contorneado en el nivel 3σ , mostrado dentro de 2Å del ligando 4PP unido a acilo. Los residuos en ISD11 que interactúan con el 4PP unido a acilo también se muestran como barras. ISD11 es de color azul, y ACP magenta. (B) tres enlaces de hidrógeno (mostrados como líneas discontinuas amarillas) y (C) se establecen varias interacciones apolares entre ISD11 y el resto de fosfopanteteína.

3.2. Objetivos

En este contexto nos hemos propuesto tres objetivos específicos para este capítulo:

1. Estudiar las claves en la relación estructural existente entre ISD11 y ACP humanas. Así como el papel estructural de la cadena de acilo en la estabilización estructural de ISD11.
2. Explorar la dependencia estructural y funcional entre NFS1 y ACP-ISD11 para la constitución de una nueva entidad estructural (NFS1/ACP-ISD11)₂ (NIA).
3. Proponer un mecanismo para la consolidación estructural del complejo núcleo NIA.

3.3. Resultados

3.3.1. Relación del heterodímero ACP-ISD11 con la actividad y estabilidad de NFS1 humana

Con el objetivo de investigar posibles relaciones que puedan haber entre el heterodímero ACP-ISD11 y la actividad, solubilidad o estabilidad de NFS1; realizamos dos experimentos. El primero propone evaluar la estabilidad de la enzima en función del tiempo de incubación (a lo largo de una semana) en presencia o ausencia del heterodímero ACP-ISD11, usando como parámetro de seguimiento la actividad específica de la enzima. El segundo, evalúa la importancia del heterodímero ACP-ISD11 para la reacción de desulfuración de cisteína. Se evalúa la posibilidad de que ACP-ISD11 tenga un rol de inductor conformacional de NFS1, tal que resulte una

conformación dimérica de un complejo soluble y enzimáticamente activo compuesto por un arreglo hexamérico, en contraposición con una conformación de NFS1 en ausencia de ACP-ISD11 que sería monomérica, inactiva e inestable. Es decir, se propone que la interacción de ACP-ISD11 con NFS1 podría funcionar como un switch conformacional/funcional.

Los resultados indicaron que NFS1 en presencia de ACP-ISD11 tiene un efecto sobre su estabilidad (**Figura 3.6**). Luego de incubar la enzima cuatro días a 4°C se observó una pronunciada diferencia en la actividad específica (proporcional a la absorbancia a 670 nm) de la misma, y en particular, se observó una significativa disminución adicional para la muestra que fue incubada en ausencia de ACP-ISD11, sugiriendo que ACP-ISD11 podría contribuir con la estabilidad de la forma funcional soluble.

Por su parte, cuando se evaluó la actividad de NFS1 en distintas concentraciones del heterodímero ACP-ISD11 se pudo observar que en ausencia del mismo, NFS1 prácticamente no tiene actividad enzimática alguna y que la actividad máxima es alcanzada a una relación estequiométrica de 1:1 (NFS1:ACP-ISD11), indicando que el complejo está totalmente activo en tanto y cuanto cada molécula de NFS1 se encuentra interaccionando con su respectivo acompañante de heterodímero, y que esa unión está fuertemente favorecida desde un punto de vista termodinámico.

Una de las preocupaciones más importantes con respecto al uso del método del azul de metileno es que para medir las concentraciones de H₂S se incubaba el sistema a un pH ácido y que entonces se podría liberar sulfuro que se pudiera encontrar unido a la proteína. Por esta razón, los resultados deben ser tomados como una evaluación

cualitativa que mide parte de H_2S libre generado en la reacción enzimática, más parte del sulfuro ligado.

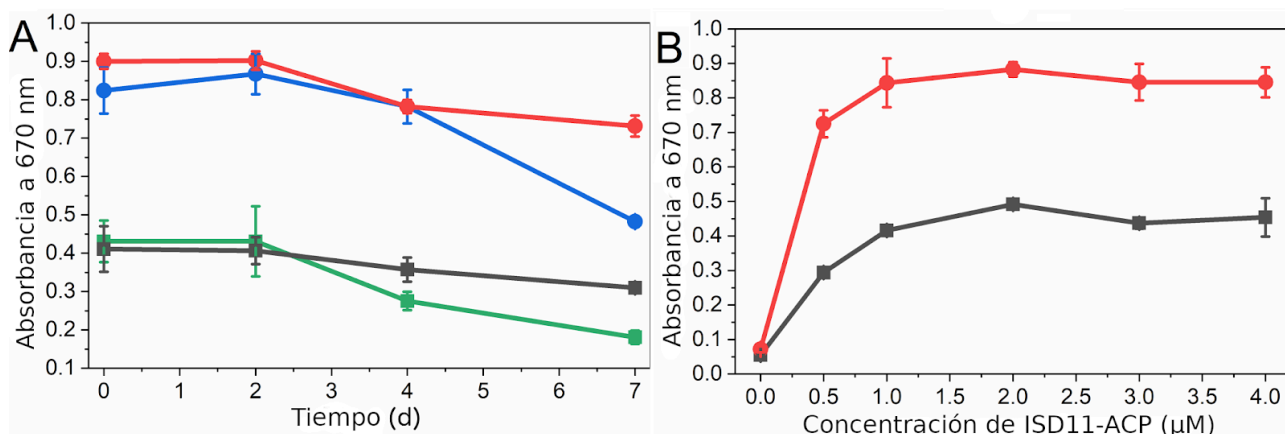


Figura 3.6. ACP-ISD11 estabiliza la forma funcional de la Cys desulfurasa NFS1.

(A) NFS1 se incubó con (rojo y gris) o sin (azul y verde) ACP-ISD11. Antes de las mediciones, se agregó ACP-ISD11 a la muestra NFS1 en este último caso. La activación de NFS1 (rojo y círculos azules) se realizó mediante la adición de ISCU y FXN. Los cuadrados grises y verdes corresponden al ensayo en ausencia de ISCU y FXN en la reacción. En muestras NFS1 no activadas, las concentraciones de proteína fueron NFS1 1.0 μM y ACP-ISD11 1.0 μM , mientras que para muestras NFS1 activadas, las concentraciones de proteína fueron NFS1 1,0 μM , ACP-ISD11 1,0 μM , ISCU 3,0 μM y FXN 3,0 μM . (B) Efecto de la concentración de ACP-ISD11 sobre la actividad de NFS1. Un experimento similar al realizado para el panel A se llevó a cabo a diferentes concentraciones de ACP-ISD11 humano. En ambos paneles, las muestras se complementaron con PLP 10 μM , DTT 2 mM y Fe^{2+} 1,0 μM . El *buffer* consistía en Tris-HCl 50 mM y NaCl 200 mM (pH 8,0). Las reacciones se iniciaron con la adición de cisteína 1,0 mM, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La producción de H_2S se evaluó mediante el método del azul de metileno.

3.3.2. Efecto de la expresión del heterodímero ACP-ISD11 en la estabilización de NFS1 en el proceso de purificación.

A la luz de la evidencia que señala a ISD11 como incapaz de plegarse correctamente por su cuenta, así como el rol estabilizante de ACP sobre ella y del efecto que tiene el heterodímero ACP-Ph-ISD11 sobre la actividad, solubilidad, y

estabilidad del dímero NFS1; hemos propuesto un camino alternativo para la producción y purificación de la desulfurasa NFS1.

Cuando la subunidad NFS1 se purifica partiendo de un cultivo de *E.coli* BL21 mediante una columna de afinidad de *His-Tag*, se obtiene una banda pura en las fracciones que eluyen con alta concentración de imidazol. Al dializar por una noche las fracciones seleccionadas, con el fin de cambiar el *buffer* y aproximar la concentración de imidazol a cero, la proteína muestra una severa tendencia a precipitar.

A raíz de estas circunstancias se exploraron múltiples estrategias de estabilización para NFS1, siendo la mejor opción la de congelar a -70 °C en presencia de imidazol a la concentración de elución (500 mM). Como consecuencia, para los experimentos descritos en el apartado anterior fue necesario pasar la muestra por una columna de exclusión molecular (G25) para contar con una muestra de NFS1 soluble libre de imidazol (**Figura 3.7A**).

El proceso es ineficiente y resulta en la pérdida de parte de la proteína purificada. Adicionalmente, el buffer incluyó ciertos aditivos para intentar evitar, o al menos retrasar el agregado proteico, como el agregado de 20% v/v de glicerol, lo que agregó múltiples dificultades en la manipulación de la proteína.

A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos descritos anteriormente, se optó por transformar bacterias *E. coli* BL21 con dos plásmidos. Uno pETDuet vector que contiene la secuencia de la enzima NFS1 con el agregado de *His-tag* en su porción N-terminal en una dirección, para su purificación en columna de afinidad NTA, una resistencia a Ampicilina como marcador de selección, y un segundo gen para la expresión de ISD11. El segundo plásmido contiene el gen de ACP humana junto con un

cassette de resistencia al cloranfenicol como marcador de selección. Como consecuencia, al inducir la expresión con IPTG 1mM el cultivo produce las tres proteínas en forma simultánea, y se purifican las tres al quedar retenidas en la columna de níquel gracias a la cola de histidina presente en NFS1, emulando el fenómeno que ocurrió a los grupos que obtuvieron de forma similar (aunque accidental) al complejo con ACPc (Boniecki et al. 2017).

Así, como resultado de esta co-transformación, se obtuvo al complejo (NFS1/ACP-ISD11)₂ de manera mucho más estable y soluble, permitiendo retirar por diálisis extensiva el imidazol empleado en la elución (**Figura 3.8**). Tras una diálisis de una noche contra un *buffer* tal y como se lo detalla en el capítulo 2.2.3, se procedió a alicuotar la muestra para almacenarla a -70 °C lista para posteriores experimentos, tanto cinéticos como estructurales.

Mediante este protocolo de coexpresión se logra obtener una enzima funcional, estable y a una concentración adecuada para su estudio. El complejo *core* NFS1/ACP-ISD11 además puede ser concentrado sin dificultades mediante concentradores de corte 10 kDa por centrifugación a 4000-5000 RPM. Este protocolo permitió obtener cerca de 200 mg/L de cultivo.

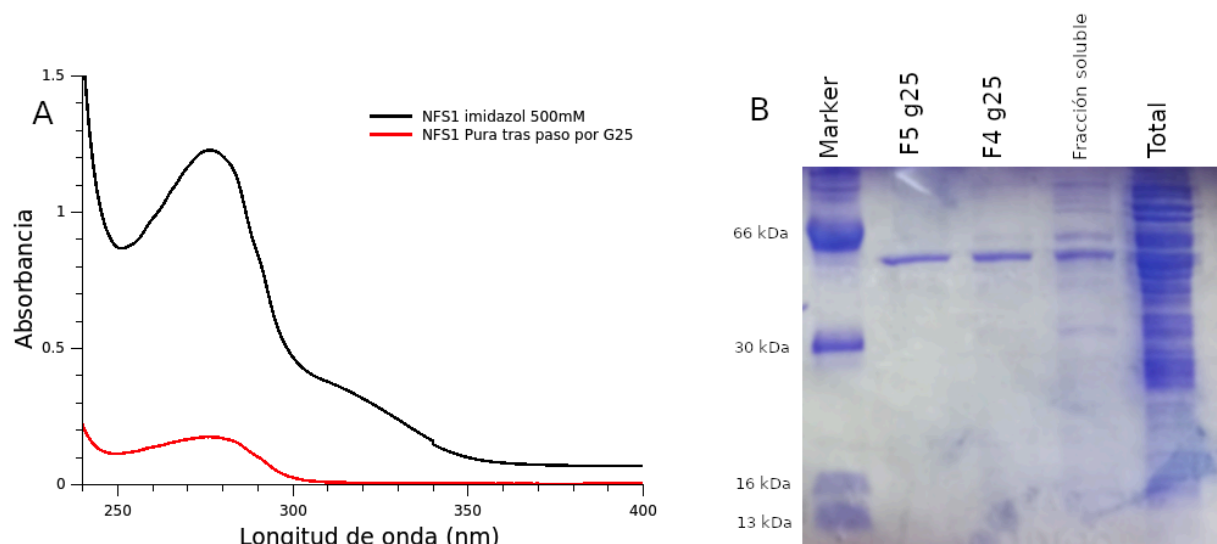


Figura 3.7. Purificación de NFS1. En A se muestran espectros de absorbancia del *pool* de fracciones eluidas de la columna NTA-Ni^{2+} en presencia de imidazol 500 mM y el espectro resultante tras el cambio de buffer por G25. En B se muestra un *SDS-PAGE* que resume el proceso de purificación de NFS1 cuando se la expresa sola en bacterias *E. coli* BL21.

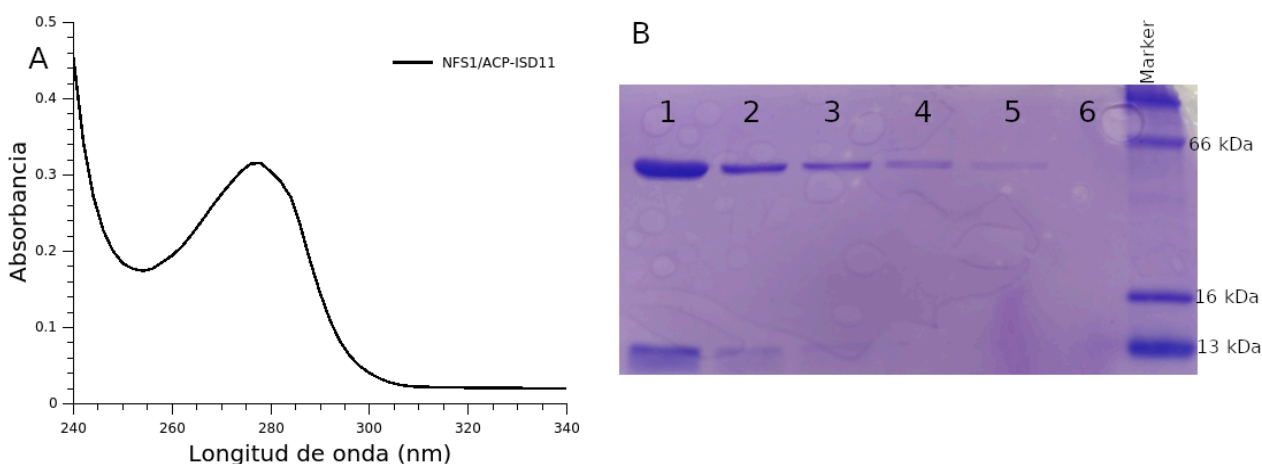


Figura 3.8. Purificación del complejo $(\text{NFS1/ACP-ISD11})_2$. En A se presenta un espectro de absorbancia obtenido después de todo el proceso de purificación para el complejo coexpresado NFS1, ACP_h e ISD11. En B se muestra el resultado de un *SDS-PAGE* en el que se corrieron muestras de las fracciones de elución de la columna NTA-Ni^{2+} para el complejo co-expresado en *E. coli* BL21. Se aprecian claramente la banda principal de NFS1 y la banda acompañante correspondiente a ISD11. Se presume la presencia de ACP_h por su interdependencia estructural con ISD11, aunque no se revela en los geles de *SDS-PAGE* su presencia se ha constatado por HPLC en el pasado.

3.3.4. Análisis por dinámica molecular del heterodímero ACP-ISD11.

La adquisición de la estructura de ACP-ISD11 en alta resolución, facilitó el estudio del papel que podrían estar jugando los diferentes bloques de construcción del complejo en cuanto a su dinámica estructural.

Una pregunta importante al respecto es si en el heterodímero ACP-ISD11 las interacciones se preservan a lo largo de la dinámica del complejo, o por el contrario, estas se pierden y el complejo se desestabiliza. Además, y dado que se observó cierta variabilidad en las longitudes de las cadenas de acilo que forman parte del complejo ACP-ISD11, es importante evaluar si la longitud de la cadena 4PP-acilo es o no un determinante para los movimientos moleculares de ACP- ISD11.

Para explorar estos temas a nivel atómico, primero llevamos a cabo cinco breves simulaciones (50 ns) de dinámica molecular (MD) atomística para cada uno de los tres diferentes sistemas macromoleculares (**Figura 3.10A**):

Los sistemas **(a)** y **(b)** comprenden dos diferentes longitudes de la cadena de acilo, ACP (4PP-acyl_{C12})-ISD11 y ACP(4PP-acil_{C16})-ISD11, con grupos acilos de 12 y 16 átomos de carbono, respectivamente. Mientras que el sistema **(c)**, también llamado ACP(4PP-SH)-ISD11, incluyó al complejo ACP-ISD11 con fosfopanteteína pero sin la cadena de acilo. Estas simulaciones tienen un objetivo exploratorio para tener una idea inicial sobre los sistemas.

El análisis de las simulaciones mostró perfiles de fluctuaciones de las posiciones atómicas (RMSF) similares para los sistemas a y b, y no se manifestaron diferencias significativas ni para ACP ni para ISD11, lo que sugiere que, al menos en esta escala

de tiempo, la longitud de la cadena de acilo (en el rango de C12–C16) puede no producir grandes cambios en la dinámica y conformación de ACP-ISD11.

Con la excepción de la hélice α C-terminal de ISD11 que mostró la mayor movilidad para sus últimos cinco residuos y las regiones N- y C-terminal de ACP, el análisis de las fluctuaciones de las posiciones atómicas (carbono α) sugieren que el heterodímero es relativamente rígido.

Por el contrario, cuando no se incluyó al resto acilo (sistema (c), con 4PP –SH en la forma de tiol), se observó un ligero aumento en los valores de RMSF para los residuos de ISD11 Glu55-Asn70 (**Figura 3.9A**). La subunidad correspondiente a la ACP humana en el sistema (c) no muestra diferencias significativas por comparación con los sistemas (a) y (b) (**Figura 3.9**). Además, para los tres sistemas evaluamos los valores RMSF correspondientes al resto 4PP-acilo o 4PP-SH (**Figura 3.9C**). El primer átomo, incluyendo serina, fosfato y los dos primeros átomos de carbono del segmento pantoténico, exhibieron valores muy similares de RMSF en comparación con los de ISD11-ACP en la presencia o ausencia de la cadena acilo. Las cadenas de acilo C12 y C16 mostraron valores similares; sin embargo, los dos últimos átomos de carbono de C16 resultaron ser altamente dinámicos, mostrando el más alto RMSF (**Figura 3.9**). Por otro lado, los últimos nueve átomos del resto 4PP exhibieron un RMSF más alto cuando no se incluyó el grupo acilo.

Para el sistema (b) ACP(4PP-acilo_{C12})-ISD11, realizamos una simulación más extensa, de 500 ns, para evaluar la persistencia de las interacciones clave entre subunidades: Arg27–Asp65, Arg31–Glu56, Lys34–Asp57, Arg50–Glu50, Arg54–Asp44 y Lys57–Asp44 (**Figura 3.6.D**). El análisis de esta simulación por MD mostró perfiles

RMSD similares a los observados previamente para simulaciones más cortas (**Figura 3.10**). Todas las interacciones calculadas mostraron una marcada persistencia a lo largo del tiempo de simulación, a juzgar por la variación de las distancias entre residuos (**Figura 3.10**).

Además, los movimientos de la cadena de 4PP-acilo parecen estar restringidos por un enlace de hidrógeno establecido entre la amina de cadena lateral grupo de Asn56 de ISD11 y el oxígeno carbonilo del cadena del grupo acilo (**Figura 3.9**). Este enlace de hidrógeno persiste durante toda la simulación de MD (la distancia media entre el donante y el aceptor, D-A , es $3,14 \pm 0,34$ Å (**Figura 3.10**)). De la misma manera, el grupo amino de la cadena lateral de la Lys57 interactúa con el grupo hidroxilo de la 4PP durante aproximadamente el 40% del tiempo de simulación, con una distancia D-A inferior a 3.2 Å (**Figura 3.10**).

Por otro lado, los otros dos enlaces de hidrógeno observados en la estructura de rayos X, que involucran átomos de oxígeno carbonílico en la cadena principal de los residuos Asn56 y Lys57 con átomos de nitrógeno de la 4PP, se interrumpieron durante los primeros nanosegundos de la simulación de dinámica molecular, llevando las distancias medias entre oxígeno y átomos de nitrógeno de $4,03 \pm 0,49$ y $4,16 \pm 0,54$ Å, respectivamente. Esto sugiere interacciones más débiles y transitorias en comparación con otras que son más permanentes. Además, los átomos de oxígeno del carbonilo de Asn56 y Lys57 se involucran completamente en la interacción del enlace de hidrógeno intra helicoidal.

En conjunto, estos resultados sugieren que ACP-ISD11 se comporta como una unidad relativamente rígida, estabilizada por una compleja red de interacciones.

Además, estos resultados sugieren que incluso en ausencia de la cadena de acilo, el complejo ACP-ISD11 podría permanecer estructurado.

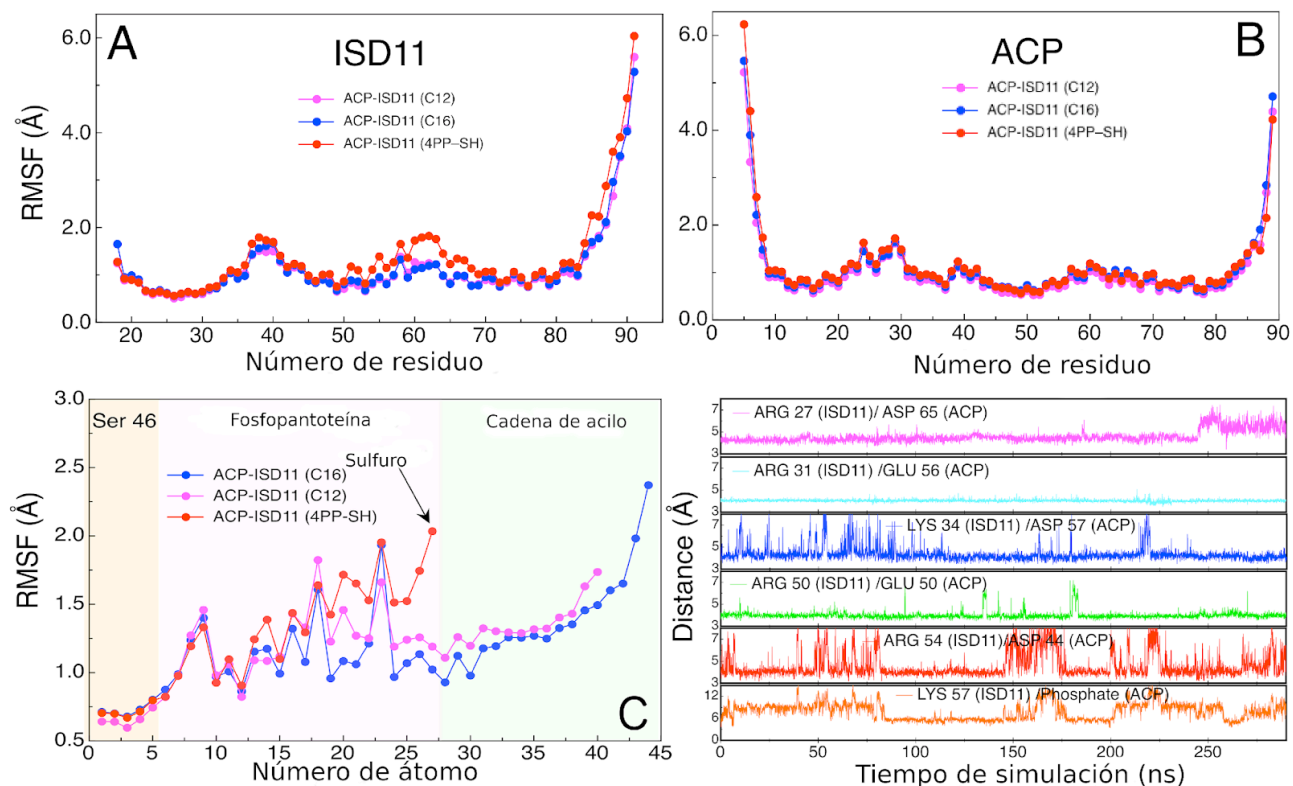


Figura 3.9. Movimientos moleculares de ACP-ISD11. (A–C) valores RMSF de carbono α para la cadena ISD11, ACP y 4PP–SH (o cadena 4PP–acilo), respectivamente. Se llevaron a cabo simulaciones MD atómicas breves para tres sistemas ACP-ISD11, incluida una cadena de acilo de (a) 16 (azul) o (b) 12 átomos de carbono (magenta) o (c) sin cadena de acilo (rojo). (D) Análisis de distancias correspondientes a las interacciones iónicas (puentes salinos) entre ISD11y ACP: Arg27-Asp65, Arg31-Glu56, Lys34-Asp57, Arg50-Glu50, Arg54-Asp44 y Lys57-fosfato de 4PP.

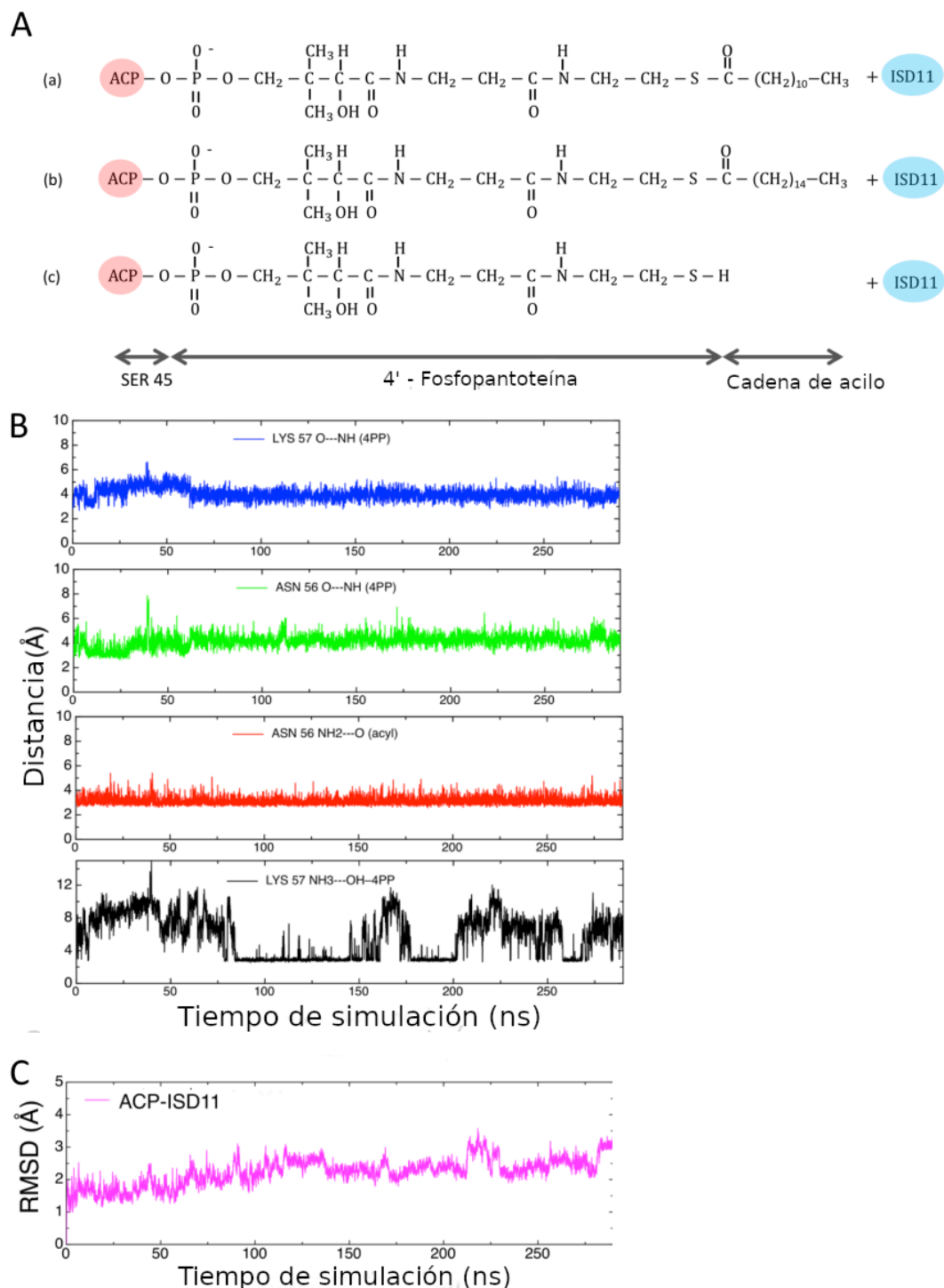


Figura 3.10 Dinámica molecular de los complejos ISD11-ACP. (A) Se muestra una representación esquemática de las distintas estructuras que se elaboraron para simular distintas alternativas de largo en la estructura de ácido graso unido a la fosfopanteteína. (B) Se representan las distancias en función del tiempo de simulación para una serie de pares de aminoácidos que se ubican en la interfaz entre ISD11 y ACP estableciendo contactos estabilizantes.

3.3.5. Análisis ampliado por dinámica molecular de las implicaciones estructurales y conformacionales del resto acilo en el core de ISD11

Para profundizar en la indagación de la estabilidad conformacional de ISD11, hicimos una serie de dinámicas moleculares adicionales con el fin de evaluar puntualmente el efecto que podrían tener, por un lado la ACP, y por el otro, la 4-PP acilada con un ácido graso de 12 carbonos complementando su núcleo.

Comparamos tres simulaciones. Por un lado, 500 ns del dímero completo humano partiendo de la estructura cristalográfica PDB ID:6ODD a la que se hace referencia en la introducción de este capítulo (Herrera et al. 2019) Por otro lado, dos simulaciones partiendo de las coordenadas PDB ID: 5WLW, en ambos casos simulando en ausencia de ACP. En un caso conservando al ácido graso de 12 carbonos unido a la 4-PP con un fosfato terminal (ISD11-S12); mientras que en el otro se simuló únicamente a la ISD11. El objetivo, en este último caso, fue evaluar si la interacción del núcleo hidrofóbico proteico con el ácido graso tiene un efecto por sí solo sobre la estabilidad conformacional de ISD11.

Lo que observamos en primera instancia fue que la variabilidad conformacional de ISD11 estaría determinada en gran medida por la modulación de ACP_h y en mucha menor medida por la presencia o ausencia del ácido graso en el core de la proteína (residuos 20-35, **Figura 3.11B**). En particular, las interacciones de tipo puente salino y enlace de hidrógeno que estabilizan a las cargas positivas de ISD11 en la interfaz con ACP_h, parecen determinar gran parte de la variación conformacional contemplada dentro del promedio del RMSD de ISD11 en estas simulaciones (**Figura 3.11**); donde

sobresalen la Leu10 y la Arg14, así como una breve secuencia positiva que incluye a la Leu31, la Arg33 y la Arg34.

Por otro lado, si bien la ISD11 simulada aisladamente presenta zonas de movilidad elevada, en especial en zonas de los bucles entre hélices y la porción carboxilo terminal, lo cierto es que globalmente presenta cierta estabilidad conformacional. La ausencia del lípido en su centro no generó ni choques estéricos ni cambios conformacionales grandes que impliquen la pérdida de estructura secundaria en forma duradera, a lo largo de la simulación.

Al simular a ISD11 en presencia de la 4-PP y su correspondiente cadena de ácido graso de 12 carbonos (ISD11-S12), se observa que, si bien la dinámica conformacional presenta puntos de coincidencia con la simulación que incluye a la ACP y al lípido de 12 carbonos, la movilidad global de la proteína está determinada por algunos segmentos de alta movilidad coincidentes con aquellos de mayor movilidad en la trayectoria de la ISD11 sola. Por otro lado, la 4-PP acilada no permaneció en el *core* de la proteína. Observamos que alrededor de los 320 ns de la simulación, la molécula es expulsada del *core* hidrofóbico de ISD11 (**Figura 3.12**).

Estos resultados parecen indicar que las interacciones proteína-proteína entre ISD11 y ACP aseguran una unidad conformacional que incluye la correcta localización de la cadena lipídica dentro de la estructura de ISD11 y su consecuente modulación de contactos internos dentro del núcleo hidrofóbico. También, estos resultados parecen sugerir que interacciones específicas entre ISD11, ACP y su correspondiente lípido podrían tener una función más relacionada al direccionamiento del plegado que a la estabilización de la forma plegada final.

Finalmente, al comparar el radio de giro de ISD11 en las tres trayectorias simuladas, encontramos que la estructura que tiene ISD11-ACPh es menos compacta que la que se encuentra sin grupo acilo (**Figura 3.13**). Se observa una tendencia de ISD11 a compactarse y ocupar el espacio que en la otra estructura ocupa la porción lipídica del resto 4PP-acilo. Mientras que en la simulación que posee solo al ácido graso unido a fosfopanteteína, ISD11 parece tener una compactación más inestable, propia de la inestabilidad que tiene la cadena lipídica en la cavidad.

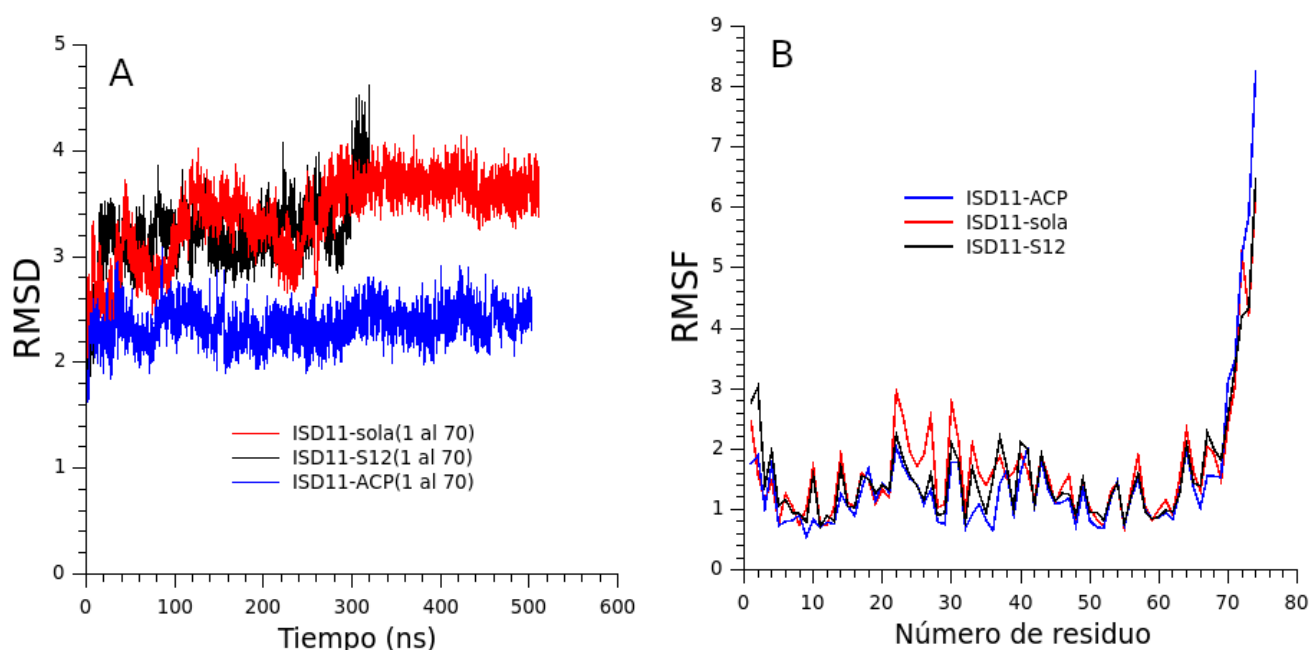


Figura 3.11. Comparación de la movilidad interna de las distintas estructuras de ISD11. En A se muestra la comparación del comportamiento del RMSD de ISD11 en cada condición de simulación; se calcula hasta el aminoácido 70 para evitar el peso que tendría la porción C-terminal que es extremadamente móvil en todos los casos. En B se muestra una comparación de los RMSF de ISD11. Se percibe una gran importancia de ACP a la integridad conformacional de ISD11 a lo largo de las simulaciones.

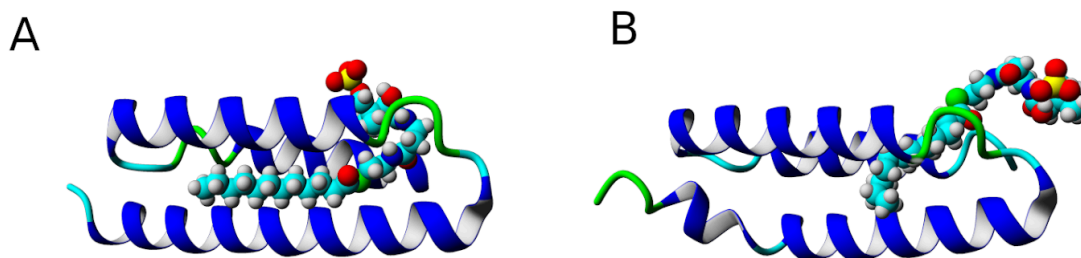


Figura 3.12. Comparación de estructuras iniciales y finales en la trayectoria de simulación de ISD11-S12. (A) se muestra la conformación inicial (0 ns). (B) se muestra la conformación final (320 ns). Se aprecia como la cadena lipídica que interactúa con el núcleo hidrofóbico escapa su lugar de interacción, es decir, no cuenta con interacciones lo suficientemente estabilizantes que la anclen conformacionalmente al interior de la estructura.

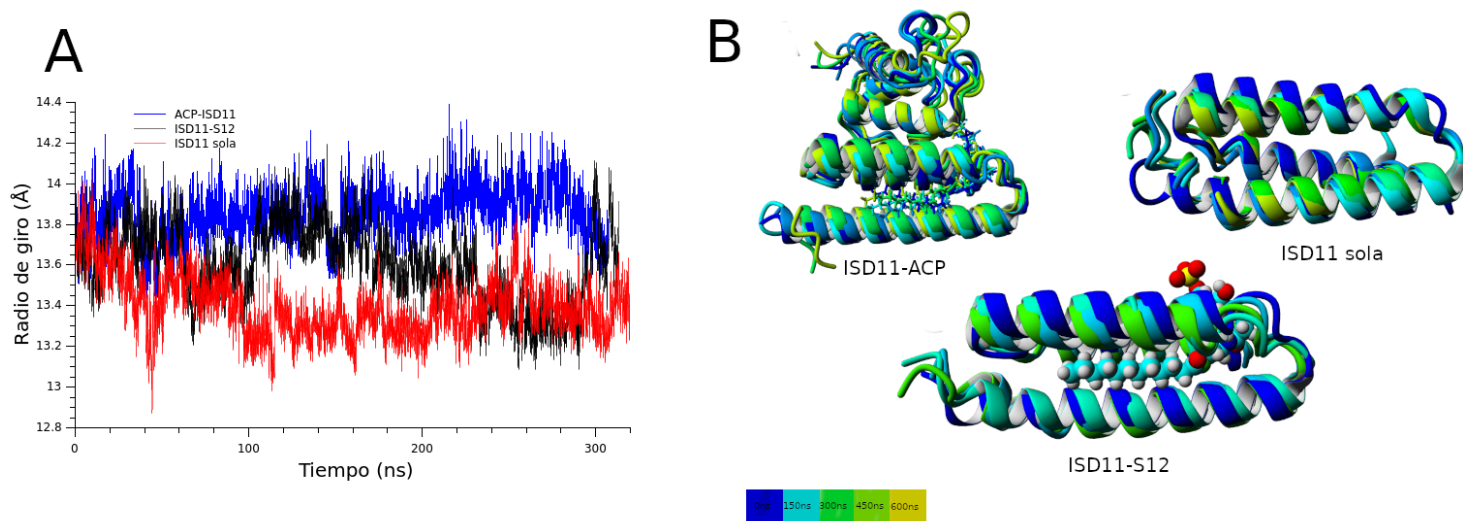


Figura 3.13. ISD11 tiende a compactarse si su núcleo hidrofóbico no es ocupado por el ácido graso de la fosfo pantoteína. En (A) se muestra el cálculo del Rg en función del tiempo de simulación, se observa que en el caso de ISD11 en el contexto del complejo con ACP (azul) ($R_g=13,85\pm0,13\text{\AA}$) el radio de giro es establemente mayor que en el caso de ISD11 si nunca tiene el lípido en su núcleo (rojo) ($R_g=13,39\pm0,15\text{\AA}$) y para la estructura simulada solo con el lípido (negro) se observa una compactación que oscila entre los dos dada la inestabilidad propia del lípido dentro del bolsillo en este contexto ($R_{promedio}=13,59\pm0,19\text{\AA}$). En (B) se muestran conformaciones representativas obtenidas en las simulaciones para ACP-ISD11 (incluyendo al ácido graso), ISD11 solamente o ISD11 incluyendo al ácido graso. Se muestra un cuadro cada 150ns de la simulación.

3.4. Discusión

El complejo ACP-ISD11 se comporta como una unidad estructural estable. El heterodímero se estabiliza por una serie de interacciones iónicas, apolares y de puentes de hidrógeno. El resto acilo-4PP establece interacciones con varios residuos de ISD11, modulando junto con ACP su plegabilidad y su dinámica conformacional. Todas estas interacciones contribuyen a la consolidación estructural del dímero. La conformación del dímero es similar a la que se encuentra en el contexto del núcleo del súper complejo (NFS1/ACP-ISD11)₂. Este hecho sugiere un mecanismo secuencial para la consolidación del super complejo, donde ACP-ISD11 se pliega independientemente y entonces induce la conformación activa de NFS1.

La conformación de ISD11 no está determinada por NFS1. La ausencia de diferencias estructurales significativas entre ACP-ISD11 cuando cristaliza solo o en complejo con la enzima NFS1 es notable. Es claro que se necesitan más estudios para dilucidar cómo se pliega ISD11 *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, la presencia de ACP es de suma importancia para el correcto plegado de ISD11. De hecho la dinámica conformacional de ISD11 no parece mostrar factores desestabilizantes por sí sola, aunque se ve un marcado efecto de ACP en estabilizar sus conformaciones (**Figura 3.11**). En ese sentido, otro efecto que salta a la vista de las simulaciones por dinámica molecular realizadas, es que ACP asegura y ancla al lípido dentro del núcleo hidrofóbico de ISD11 (**Figura 3.12**). Este hecho se alinea perfectamente con experimentos de replegado que fracasaron aun en presencia de detergentes iónicos análogos al acilo-4PP.

Cuando sumamos el análisis del Radio de giro encontramos que partiendo de la estructura plegada, ISD11 es capaz de encontrar una nueva conformación, muy similar y ligeramente más compacta; osea, cambia los contactos lípido-proteína por contactos proteína-proteína. Esto podría sugerir que ACP cumple su rol al encaminar a ISD11 hacia su conformación final, que una vez constituida ayuda a mantener a través de contactos en la interfase y el aseguramiento de la cadena lipídica en su lugar. (**Figura 3.11**).

La evidencia estructural presentada en esta tesis muestra que ISD11 adquiere su característica estructura nativa independientemente de la presencia de la desulfurasa NFS1, lo que indica que no hay un plegado inducido sustancial de la conformación de ISD11 por la estructura NFS1 durante la configuración del complejo ACP-ISD11-NFS1. Este hecho lleva a postular un modelo secuencial de ensamblaje central para la maquinaria de biosíntesis de centros ferrosulfurados (**Figura 3.14**), donde el plegado de ISD11 se adquiere primero en la matriz mitocondrial (muy probablemente al interactuar con la forma de ACP acilada con 4PP). El núcleo se consolida después, cuando se pliega correctamente ACP-ISD11 y se une al dímero NFS1 inestable (la **Figura 3.6** muestra a ACP-ISD11 interactuar favorablemente con NFS1, produciendo una enzima activa). Además, diméricas o tetraméricas; las formas ACP-ISD11 podrían interactuar con la cisteína desulfurasa NFS1 dimérica. Finalmente, las proteínas ISCU y FXN pueden interactuar con el complejo enzimáticamente activo $(\text{NFS1/ACP-ISD11})_2$, produciendo un super complejo activado $(\text{NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN})_2$.

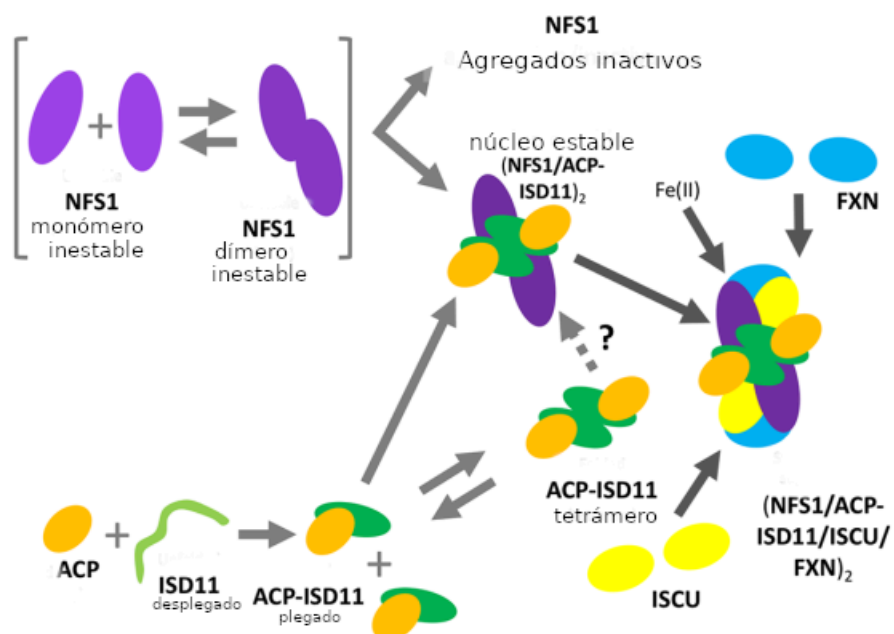


Figura 3.14. Esquema del mecanismo de ensamblaje para el complejo de síntesis de centros ferrosulfurados (NFS1/ACP-ISC11/ISCU/FXN)₂



“A mi se me hace cuento que empezó Buenos Aires, la juzgo tan eterna como el agua y como el aire”

Jorge Luis Borges

Capítulo 4: Estudio del super complejo de síntesis de centros Fe-S mediante simulaciones computacionales de la dinámica molecular.

4.1. Contexto

4.1.1. Dinámica conformacional, paisajes de energía y simulaciones

Las moléculas son sistemas dinámicos. Sus átomos pueden moverse dentro de una serie de microestados permitidos por las restricciones geométricas, torsionales y electrónicas que dicha molécula presenta. Por ejemplo, átomos unidos por dobles enlaces o dentro de estructuras cíclicas, pierden la posibilidad de moverse en determinadas direcciones en comparación con aquellos unidos a enlaces simples que se encuentran permanentemente girando en torno al mismo.

En este sentido las moléculas complejas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, presentan una topología compleja, con un amplio espacio conformacional, alcanzando la conformación plegada en la medida que se consolidan interacciones de tipo intermolecular entre las distintas porciones de la cadena principal. El conjunto de todas las conformaciones posibles para el sistema determinan su paisaje energético (**Figura 4.1**). Donde las configuraciones estructuralmente cercanas al estado plegado, son también cercanas al mismo desde un punto de vista de la energía libre (Frauenfelder, Sligar, y Wolynes 1991).

La relevancia de esto queda manifiesta porque en la inmensa mayoría de las aproximaciones a la simulación computacional de macromoléculas, se parte de una

estructura correspondiente un mínimo energético local en el que se encontraba cuando fue obtenida experimentalmente. Al realizar la simulación, nos vamos a encontrar que la macromolécula visita una serie de conformaciones relativamente cercanas al mínimo energético del cual partió. Por lo que este tipo de simulaciones son útiles para encontrar movimientos que no requieran sobrepasar barreras energéticas y que sean muy cercanos al estado conformacional de equilibrio. Es importante tener esto en cuenta porque da cuenta del alcance que tienen los hallazgos observados en este capítulo (Becker y Karplus 1997).

Cuando determinado cambio conformacional requiere superar una barrera energética alta respecto de la energía térmica disponible, es posible incorporar fuerzas externas para poder explorarlos. Este tipo de técnicas podrían aplicarse en el futuro a este sistema para poder entender algunos cambios conformacionales que sabemos necesarios para la reacción pero no fueron hallados en esta primera exploración.

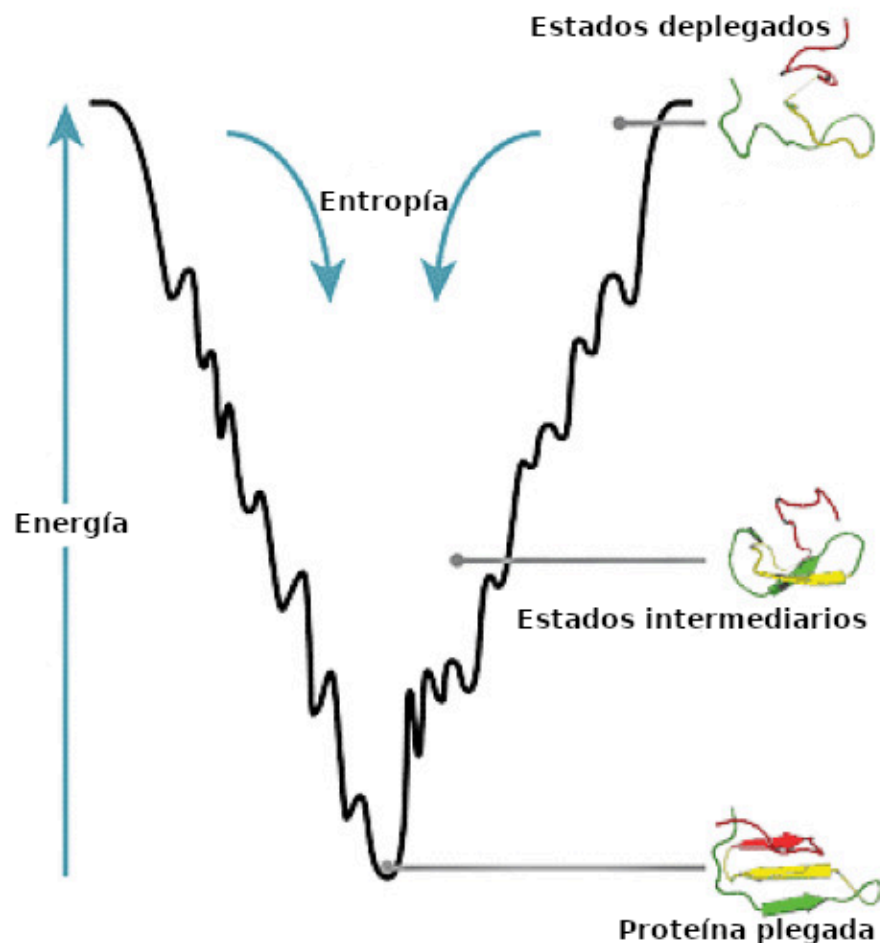


Figura 4.1. Representación esquemática de la distribución de la energía de un sistema en función del espacio conformacional de proteínas. La estructura de partida se encontrará probablemente en el mínimo global energético de ese paisaje. En la medida que se desciende en el paisaje se encuentran estados que por estar atrapados entre barreras energéticas consolidan estructuras intermeditarias en el plegado y presentan cierta estabilidad. Estos estados incluyen por ejemplo a los glóbulos fundidos. Al establecerse las interacciones de la proteína, estas van convergiendo hacia la estructura donde todas las interacciones se han consolidado.

4.1.2 Simulaciones de la dinámica molecular como herramienta para ver más allá de la estructura

Las distintas técnicas de determinación estructural brindan una noción muy detallada de las posiciones atómicas de las macromoléculas y sus interacciones relevantes. Esto es cierto tanto para las interacciones intramoleculares, como con el

solvente y otras moléculas según el contexto (cofactores, otras macromoléculas, ligandos específicos, etc.). Dichas disposiciones espaciales son propias de cada átomo en las condiciones en las cuales se realiza la determinación estructural. Por ejemplo, las determinaciones cristalográficas o por criomicroscopía electrónica (CME) capturan una estructura correspondiente a un plegado particular que suele corresponder a la conformación más estable en las condiciones de cristalización, mientras que la resonancia magnética nuclear (RMN) revela un ensamble de conformaciones que por ser una técnica que estudia a la molécula en solución refleja la movilidad conformacional.

Precisamente debido a que las macromoléculas se encuentran en constante movimiento interactuando con el solvente, y que oscilan entre varias conformaciones cercanas al mínimo conformacional de energía, es que las simulaciones de dinámica molecular de proteínas constituyen una herramienta que permite explorar las variaciones estructurales permitidas dentro de un ensamble conformacional.

En las simulaciones de dinámica molecular clásica, se reconstruye la trayectoria de los átomos que conforman la macromolécula a partir de las ecuaciones de movimiento, siguiendo las leyes de Newton en una aproximación que describe los movimientos moleculares fielmente. Para tal fin, debe calcularse la fuerza sobre cada átomo, eso permite obtener la aceleración, y conociendo las posiciones y velocidades en el paso posterior se mueve cada uno de los átomos a su nueva posición, teniendo en cuenta un paso de tiempo o *time step*. Para calcular las fuerzas, se cuenta con una ecuación que define la energía en función de las coordenadas atómicas, y que incluye contribuciones de enlace y no enlace. Esta ecuación presenta una gran cantidad de parámetros,

determinados para los distintos tipos de aminoácidos, ácidos nucleicos, solvente, etc, y constituye lo que se denomina el “campo de fuerzas”. Este considerará la naturaleza particular de cada átomo, su masa, su carga, y densidad electrónica para cada par de átomos interactuantes. Para realizar este tipo de cálculos con bajo costo computacional, se han implementado distintas aproximaciones. Al aproximar cada átomo a una esfera de un tamaño y carga parcial parametrizados según su identidad, y cada enlace a un resorte parametrizado según su naturaleza, se consigue crear un campo de fuerza que predice los movimientos e interacciones más probables. Partiendo de esa estructura inicial, ciertas interacciones podrán formarse mientras que otras podrán romperse.

En el caso de este trabajo de Tesis, se usó una aproximación de simulación de tipo *all atom* con solvente explícito. Esto implica que es simulada en el contexto de una “caja con moléculas de agua” donde cada una de las moléculas de solvente es simulada explícitamente y está conformada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, así como sus interacciones con la macromolécula proteica en cuestión y con otras moléculas de agua, en un algoritmo que toma en cuenta las particularidades propias de las interacciones entre moléculas de agua (Jorgensen et al. 1983).

4.1.3. Dinámica molecular aplicada al estudio del super complejo desulfurasa

Entre los antecedentes de aplicación de herramientas de simulación de la dinámica molecular en el contexto del super complejo de síntesis de centros Fe-S sobresale el análisis llevado adelante por Di Maio y colaboradores usando como estructura de partida una cristalografía de rayos X tomada a partir del complejo ortólogo de *E. coli*.

En dicho trabajo se describe que la FXN modula la libertad conformacional de la ISCU (IscU), y tal vez la del *loop* que contiene a la Cys catalítica de la proteína orotologa de NFS1 (IscS) (Di Maio et al. 2017).

Es importante señalar que para el antecedente citado fue necesario reconstruir *in silico* el *loop* que contiene a la cisteína catalítica (Cys381 en la variante humana) porque no se encontraba resuelto en la estructura de partida. El detalle es de mucha importancia porque esa zona de la proteína se encuentra sin resolver en la mayoría de estructuras de las que se dispone, en principio debido a su incrementada flexibilidad conformacional. También es importante resaltar que la FXN de *E. coli* fue artificialmente encastrada en la estructura de la desulfurasa IscS, y que para ello se utilizaron datos experimentales de RMN que brindaron algunas pistas de cómo tendría que ser la interacción entre IscS, IscU y CyaY. Al utilizar estructuras iniciales manipuladas se puede perder potencia en las conclusiones que se pretenden obtener de las simulaciones computacionales, debido a que estas dinámicas son sistemas complejos donde pequeños cambios en las condiciones iniciales pueden tener grandes consecuencias en las trayectorias y en las observaciones finales. De este trabajo los autores concluyen que aunque ISCU está firmemente anclada a la desulfurasa IscS puede tener un movimiento de pivote alrededor de la interfaz y postulan que ciertos cambios conformacionales de IscS podrían ser relevantes en el proceso de biosíntesis de los centros FeS. Esta flexibilidad se ve disminuida en el complejo ternario que incluye FXN bacteriana (CyaY), lo que podría explicar las propiedades aparentemente inhibitorias que exhibe la FXN en la formación de los centros Fe-S en *E. coli*.

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio (Espeche et al. 2022), en el que se llevaron adelante simulaciones de dinámica molecular para variantes de FXN se encontró que para las variantes de Trp W173G y W168G varía significativamente el espacio conformacional correspondiente al Trp155 que es un residuo crítico para la actividad de FXN y cuya mutación deriva en Ataxia de Friedreich (FRDA) (**Figura 4.2**). Se observa que la mutación de uno de estos dos triptofanos internos deriva en la pérdida de función por la alteración en la selección del rotámero correcto para el Trp que se encuentra en la posición 155, implicando así modulaciones alostéricas en un residuo fundamental para la correcta actividad del complejo (el Trp155 forma parte del sitio de ensamblado de centros Fe-S).

Esto hace pensar sobre lo delicado y relevante que puede ser el equilibrio conformacional en las interfases del super complejo. Así también muestra como cambios aparentemente sutiles en el mismo pueden determinar profundamente el correcto funcionamiento enzimático. Toda esta información adicional puede ayudar a determinar el rol de la FXN en el contexto de la reacción global de síntesis de centros Fe-S y la dinámica conformacional del super complejo.

Entonces, identificar específicamente las interacciones moleculares que determinan la función de FXN es trascendental para encontrar oportunidades de intervención en el sistema como estrategias de tratamiento para la FRDA.

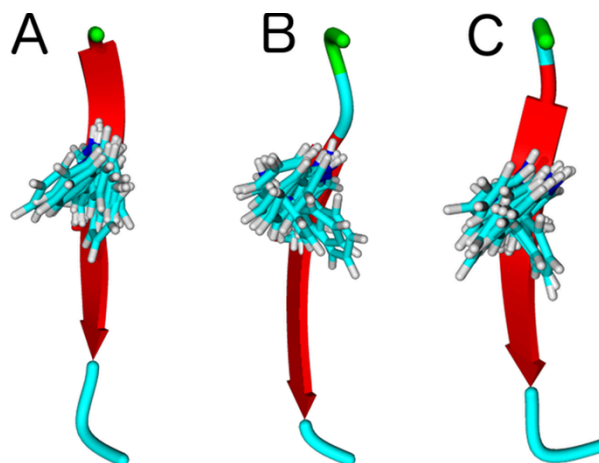


Figura 4.2. Dinámica molecular de variantes de FXN 2022. Los rotámeros Trp155 se muestran a través de la superposición de instantáneas tomadas de los MD de (A) tipo salvaje, (B) variante W168G y (C) W173G, la cinta corresponde a los residuos 151-160. Figura tomada de (Espeche et al. 2022).

4.1.4. Estructuras disponibles para el estudio por dinámica molecular

El banco de datos de estructuras de proteínas (PDB) ofrece una generosa y variada colección de estructuras del complejo desulfurasa, tanto formado por proteínas humanas como ortólogas. Dependiendo de la pregunta que se plantee, las distintas estructuras pueden ser más o menos apropiadas para aproximaciones de simulación computacional por dinámica molecular. Por ejemplo, Di Maio y colaboradores (Di Maio et al. 2017), emplearon como base una estructura de *E. coli* y distintas herramientas computacionales y experimentales para el modelado del complejo de *E. coli* incluyendo CyaY (el equivalente ortólogo de FXN).

Así mismo, con el descubrimiento del rol del heterodímero ACP-ISD11 para el correcto plegado del super complejo humano (tal y como se describe en Capítulo 3) se obtuvieron distintas estructuras que permitieron la caracterización estructural completa del súper complejo de síntesis de centros ferrosulfurados.

Una característica sobresaliente compartida entre las distintas estructuras es la dificultad para resolver la conformación del *loop* catalítico de la desulfurasa. En la **Figura 4.3**, se muestran distintos ejemplos de estructuras cristalográficas que no consiguieron resolver dicha porción; puntualmente en la **Figura 4.3.C** se muestra la estructura bajo identificador PDB: 3LVL de *E.coli* utilizada por Di Maio y colaboradores. Esto se puede explicar por una amplia movilidad del segmento que muy probablemente esté asociada con la diversidad conformacional requerida por el rol funcional. Este loop debe fluctuar entre al menos dos conformaciones que sitúan a más de 20 Å a la Cys persulfurada (desde el sitio del PLP hasta el sitio ISCU).

Si durante el proceso de cristalización no se consigue homogeneidad conformacional entre las distintas moléculas individuales, la información obtenida con base en los patrones de difracción de rayos X no podrá ser correctamente asignada a ninguna estructura proteica en esa zona de la cadena.

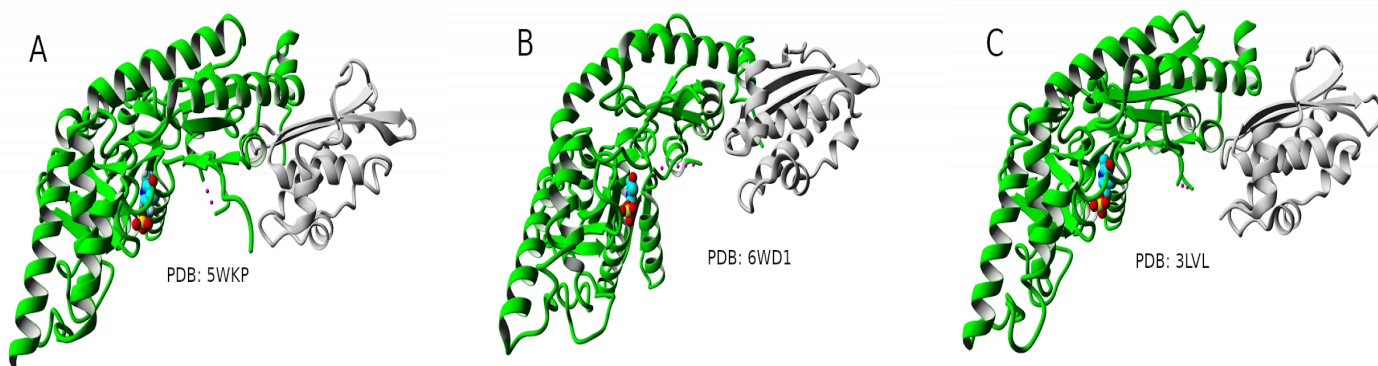


Figura 4.3. Estructuras del complejo desulfurasa en las que no se logró resolver la conformación del *loop* catalítico. En todos los casos se representa una subunidad de NFS1 (o su equivalente homólogo) en verde e ISCU (o su equivalente homólogo) en gris. Se representa como punteado rosa la porción no resuelta del loop catalítico y como esferas el PLP como referencia del sitio activo PLP. En A se representa a la estructura humana bajo identificador PDB 5WKP. En B se representa la estructura humana bajo el identificador PDB 6WD1. En C se representa la estructura del *E. coli* bajo identificador PDB 3LVL.

Entre las estructuras en las que se logró resolver este *loop*, se encuentran las que llevan los identificadores de PDB 5WLW, 6NZU, y 6XUE. En la **Figura 4.4** se representan distintas estructuras del super complejo humano, y en cada uno de ellas se aprecia una conformación diferente para el *loop*. Se observa que el *loop* puede tener una conformación resguardada con la Cys381 mirando hacia el PLP (**Figura 4.4.A**) y otra más bien extendida con la Cys381 coordinando un átomo de Zn(II) unido a ISCU (**Figura 4.4.B**), o en el llamativo caso de la estructura bajo identificador PDB: 6UXE (**Figura 4.4.C**) en la que se observa una conformación de *loop* abierta en ausencia de Zn(II). El detalle es interesante porque saca un poco que el protagonismo de un hipotético ion metálico (Zn(II) para el contexto de las determinaciones estructurales Fe(II) en el contexto de la reacción) para una eventual transición conformacional del *loop*.

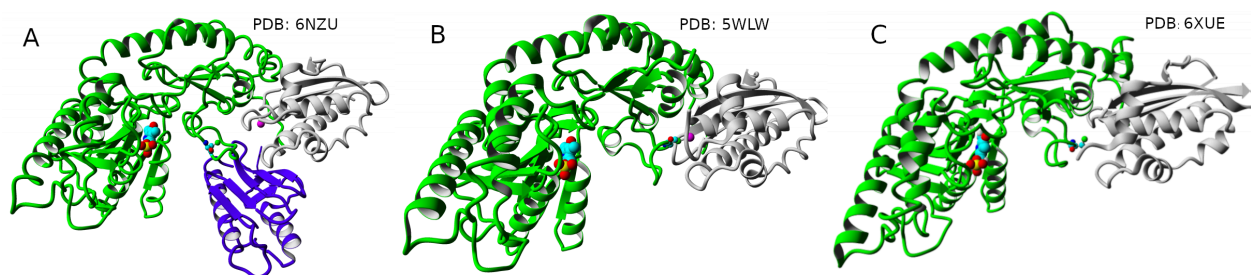


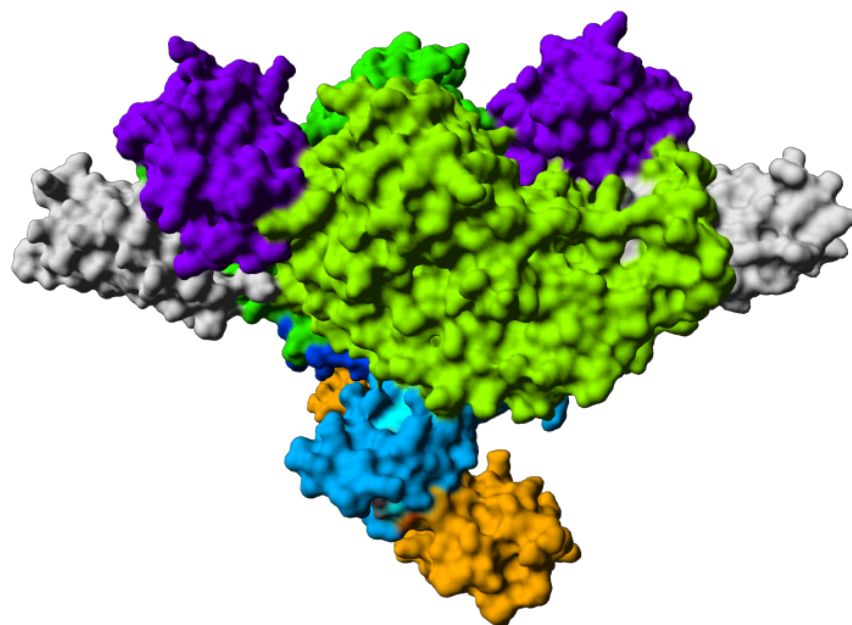
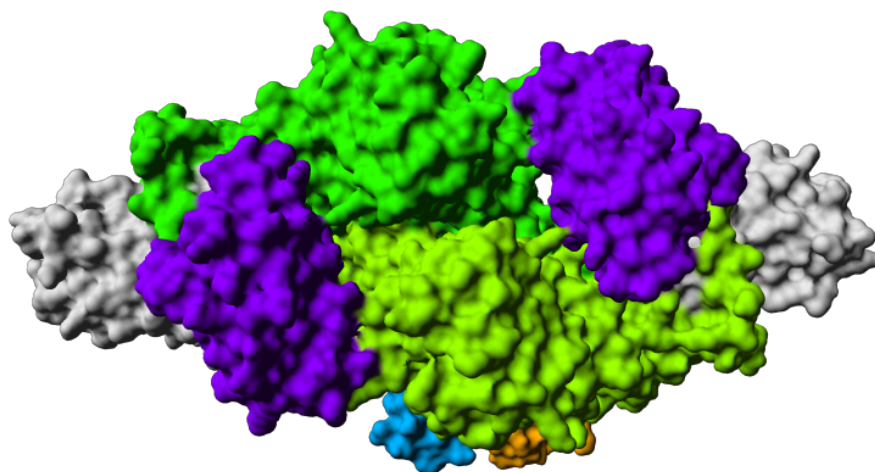
Figura 4.4. Estructuras del complejo desulfurasa en las que sí se consiguió resolver el loop catalítico que contiene a la Cys381. En todos los casos se representa una subunidad de NFS1 en verde, una subunidad de ISCU en gris y según esté incluida en la estructura una subunidad de FXN en púrpura. Se representa como esferas el PLP como referencia del sitio activo PLP. En A se representa a la estructura humana bajo el identificador PDB 6NZU. En B se representa la estructura humana bajo el identificador PDB 5WLW. En C se representa la estructura humana bajo el identificador PDB 6XUE.

La relevancia de estas características estructurales, es que da lugar a interpretar mecanismos de reacción que involucran, en primer lugar a la reacción de desulfuración en el sitio activo PLP, con el posterior traspaso del persulfuro al sitio activo ISCU, donde un átomo de Fe(II) sería capaz de coordinar al átomo de azufre recién incorporado y catalizar su ruptura para el montaje del centro Fe-S propiamente dicho (Parent et al. 2015; Fox et al. 2019; Bridwell-Rabb et al. 2014; Gervason et al. 2019).

En paralelo, otra cuestión que es de suma importancia y podría estar vinculada a lo anterior, es el rol conformacional que puede tener la FXN en el contexto del super complejo. Ya sea como un modulador alostérico, formando parte estructural del sitio activo de montaje de los centros Fe-S, o como facilitadora de la transpersulfuración; es decir el transporte del átomo de azufre (como persulfuro sobre la Cys del loop, -S-SH) fruto de la desulfuración de la cisteína sustrato (L-Cys), al sitio activo de ensamblaje de *centros* en la ISCU (Cai et al. 2018; Gervason et al. 2019).

4.1.5. La estructura elegida como punto de partida

En este capítulo, se detallan resultados que se desprenden de simular computacionalmente al complejo de síntesis Fe-S completo partiendo de una estructura inicial experimental que contiene a los cinco miembros del super complejo, es decir: (NFS1-ISD11-ACP-ISCU-FXN)₂



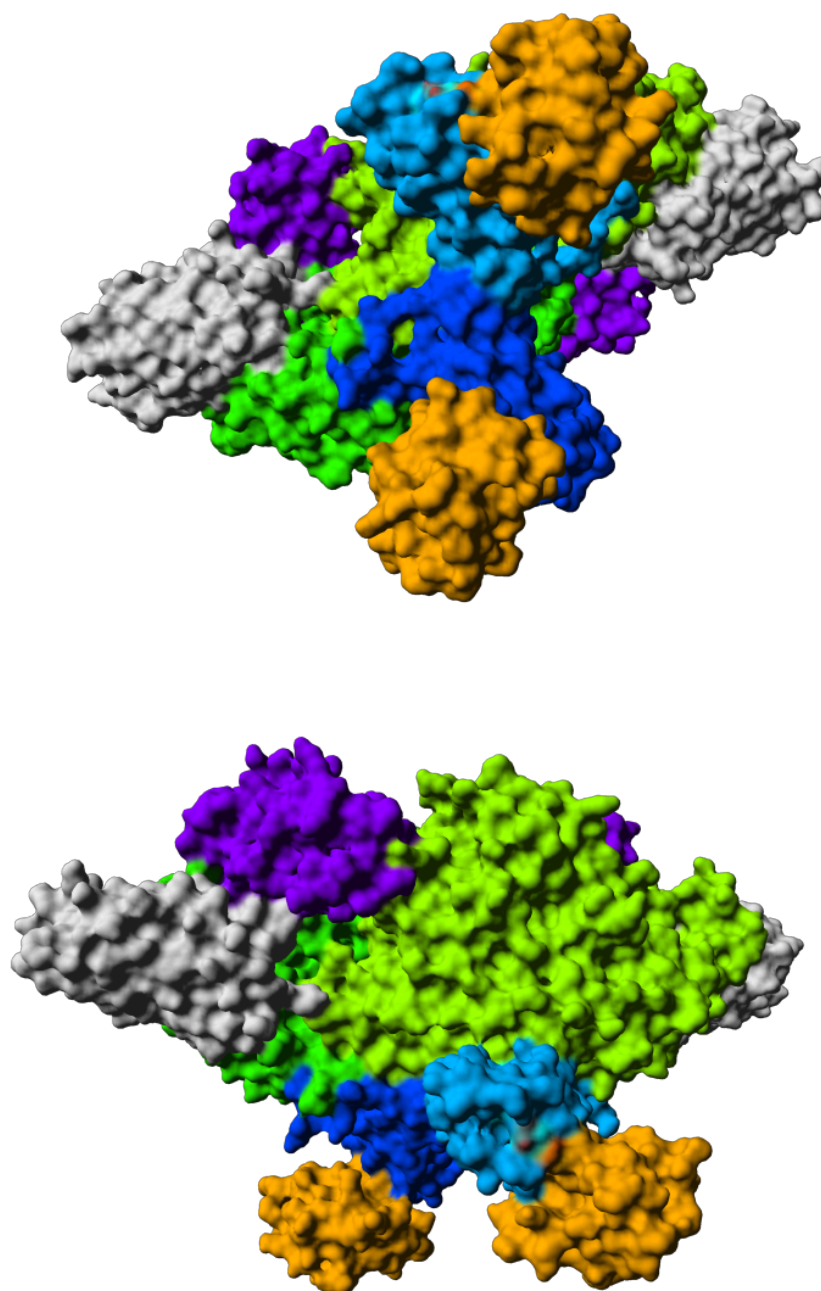


Figura 4.5. Modelo del super complejo estudiado en este capítulo. Cuatro vistas distintas en una representación de las superficies de cada una de las diez subunidades que lo conforman. En verde (claro y oscuro) las dos subunidades desulfurasa, en gris las dos subunidades ISCU, en violeta las dos subunidades FXN, en celeste y azul las dos subunidades ISD11 y en naranja las dos subunidades ACP.

Este complejo que también identificamos en este trabajo como “NIAUF” (N por desulfurasa NFS1, I por ISD11, A por ACP, U por ISCU y F por FXN) se encuentra en la PDB bajo el identificador PDB ID: 6NZU. Vale la pena mencionar que esta estructura se determinó por medio de la técnica de CME, que logró resolver la conformación de ambos *loop* catalíticos y que es la única estructura que tiene a todos los miembros del complejo incluyendo a FXN. Este último punto es muy significativo ya que es el único resultado experimental que permite localizar a la FXN en el contexto funcional y entender su modo de acción y las relaciones estructura-función en este proceso tan central para la bioquímica mitocondrial, como lo es la generación de centros Fe-S.

Así, lo más conveniente para realizar nuestras simulaciones fue utilizar una estructura que haya resuelto correctamente al *loop* catalítico, así como ser una conformación que incluya a todas las subunidades del súper complejo, y vale decir que 6NZU es la única estructura que cumple con estas dos condiciones.

Al simular dicha estructura originalmente buscamos capturar los efectos de modulación conformacional que pudiera inducir FXN en el contexto del super complejo, buscando una respuesta para la pregunta sobre cuál es la función de la FXN. Es importante entender que si la FXN es capaz de modular la dinámica y/o el espacio conformacional de los otros miembros del super complejo, estos deben ser tenidos en cuenta en el contexto de la enfermedad y los hipotéticos tratamientos terapéuticos que tengan al super complejo desulfurasa como objetivo. Al mismo tiempo, y prestando especial atención a la zona del *loop* catalítico, podemos esperar alguna diferencia en la movilidad propia del loop o en la distancia que la Cys381 mantenga con los dos sitios críticos para la catálisis (sitio del PLP y sitio ISCU). En la **Figura 4.5D** se muestran en

detalle de la interfase de dicha estructura. Además, como características relevantes sobresalen las interacciones entre FXN, el loop catalítico, la ISCU y la sección carboxilo terminal (CTS) de NFS1. En la Tabla 1 se describen en detalle las interacciones específicas que se encuentran para varios aminoácidos de NFS1 en el contexto de la interfase entre las tres proteínas.

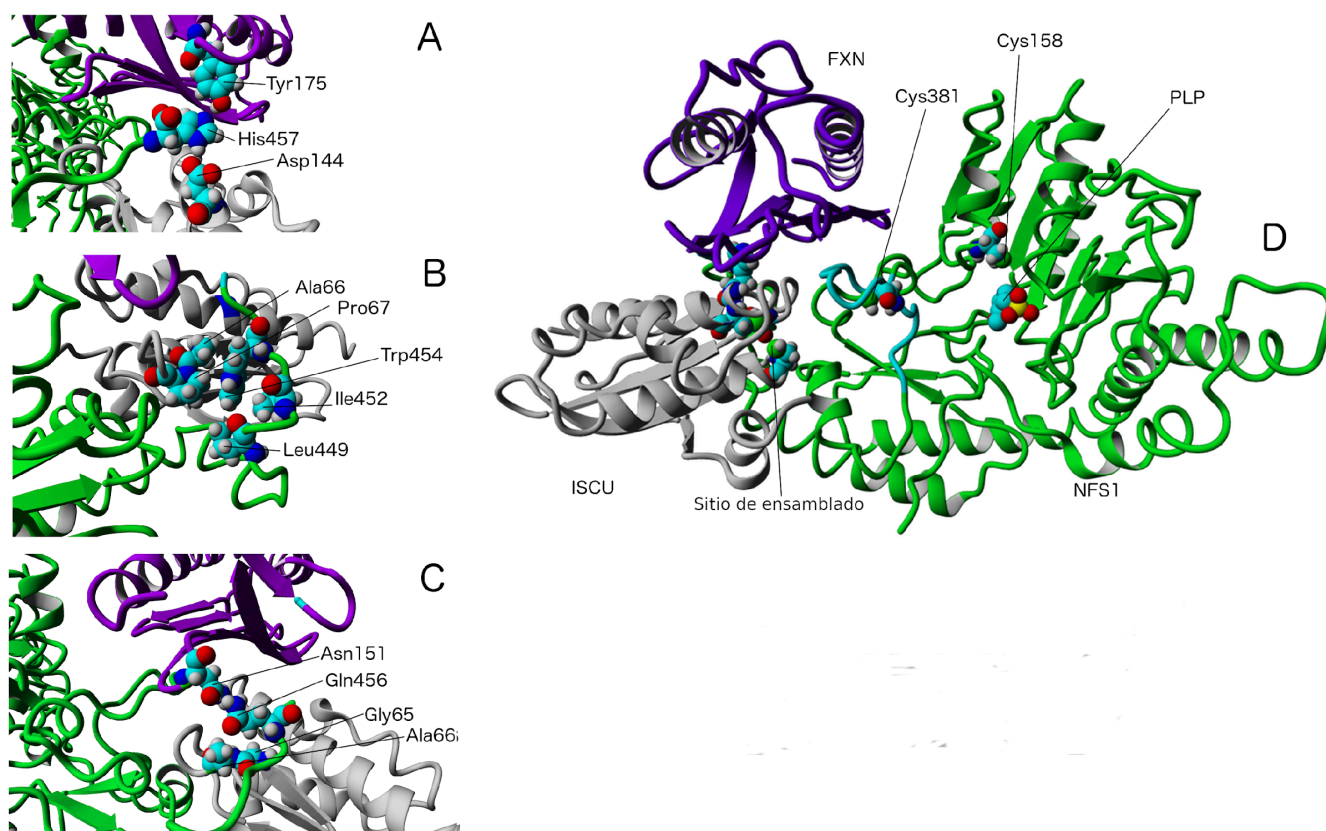


Figura 4.6 Detalles Estructurales del Supercomplejo. (A, B y C) Interacciones entre el CTS de NFS1 (verde), FXN (violeta) e ISCU (gris). (D) NFS1 Cys -Loop (cian) conecta el sitio PLP en NFS1 con el sitio de ensamblaje ubicado a más de 15 Å de distancia. Cys158 de NFS1 se encuentra cerca del sitio PLP (de PDB ID: 6NZU).

Tabla 4.1. Interacciones relevantes entre subunidades.

Residuo NFS1	Interacciones	Características sobresalientes
Ile452	Ile447/NFS1 Trp454/NFS1	CTS establece interacciones apolares entre ISCU por medio de Trp454 que está estructurado por interacciones con otros residuos del CTS (Ile452, Leu449).
Trp454	Ala66/ISCU Pro67/ISCU Ile452/NFS1 Leu449/NFS1	
Gln456	Gly65/ISCU Ala66/ISCU Cys69/ISCU Asn151/FXN	Gln456 interactúa con Ans151 de FXN (puente de hidrógeno). Esta Gln está a una distancia VDW de ISCU Cys69 (sitio de montaje).
His457	Asp144/ISCU Tyr175/FXN	His457 forma un puente y establece una interacción polar con FXN (Tyr175) e ISCU (Asp144) al mismo tiempo.
C158	PLP/NFS1	Cys158 está muy cerca del PLP (distancia S_{tiol} a $N_{\text{PLP}} = 4.3\text{\AA}$) y también tiene una secuencia cercana a los sitios de fosforilación (Thr154, TTQ T ₁₅₄ E)
C381	PLP/NFS1 Asp71/ISCU Cys95/ISCU His137/ISCU Cys138/ISCU	Cys381 en el <i>bucle</i> Cys que conecta el sitio NFS1 PLP con el sitio de ensamblaje en la superficie ISCU.

4.2. Objetivos

1. Evaluar los efectos de la presencia de la FXN sobre la movilidad y la conformación de los distintos miembros del súper complejo síntesis de centros Fe-S.
2. Investigar la relevancia de los contactos establecidos entre ISCU, FXN, y el segmento carboxilo terminal (CTS) de NFS1 para el ajuste de la conformación del súper complejo de síntesis de centros FeS.
3. Analizar posibles efectos sobre la conformación del sitio de ensamblado en la superficie de ISCU de los contactos que establece el Trp155 con las subunidades de ISCU y NFS1.
4. Evaluar la movilidad del *loop* catalítico y la distancia que existe entre la Cys381, el PLP y el sitio de ensamblado en la ISCU.

4.3. Resultados

4.3.1. La Dinámica de la L-Cys desulfurasa NFS1 y su modulación por la FXN

En este capítulo, exploramos la dinámica molecular de dos supercomplejos diferentes con aproximaciones *all atom*. Para estudiar los posibles efectos de la presencia o ausencia de FXN en la dinámica del super complejo, se prepararon dos variantes una conteniendo las dos subunidades FXN y una segunda variante del super complejo en la que se eliminaron ambas subunidades FXN.

En ambos casos, como se mencionó anteriormente, utilizamos la estructura PDBID: 6NZU como punto de partida (Fox et al. 2019).

Los complejos representados en la **Figura 4.7** muestran las dos estructuras de partida utilizadas para las simulaciones. Ambas construidas a partir de la estructura de CME ya mencionada. Se procedió a simular al complejo tal cual se encuentra en la estructura resuelta, y paralelamente, se editó el archivo eliminando los átomos correspondientes a las moléculas de FXN. Como control se realizaron simulaciones de la FXN por separado, en su forma aislada, ya que las interacciones con ISCU y NFS1 eventualmente podrían alterar la propia dinámica de la FXN. Las trayectorias obtenidas de estas simulaciones (**Figura 4.7.A y 4.7.B**) fueron relativamente “estables” durante más de 600 ns (Tsai y Barondeau 2010) (**Figura 4.8**). Detectamos que el tramo C-terminal de NFS1 (CTS) gana mucha movilidad en ausencia de FXN y, sin embargo, reduce significativamente su espacio conformacional cuando FXN está presente (**Figura 4.9.A**). Esto ocurrió para ambas subunidades de NFS1. Más importante aún, ISCU también mostró un aumento significativo en sus movimientos internos cuando FXN estuvo ausente, lo que sugiere que FXN consolida el sitio de ensamblaje y modula la arquitectura de ISCU y NFS1 en el contexto del súper complejo (Cai, Frederick, Tonelli, et al. 2018) (**Figura 4.9.B**).

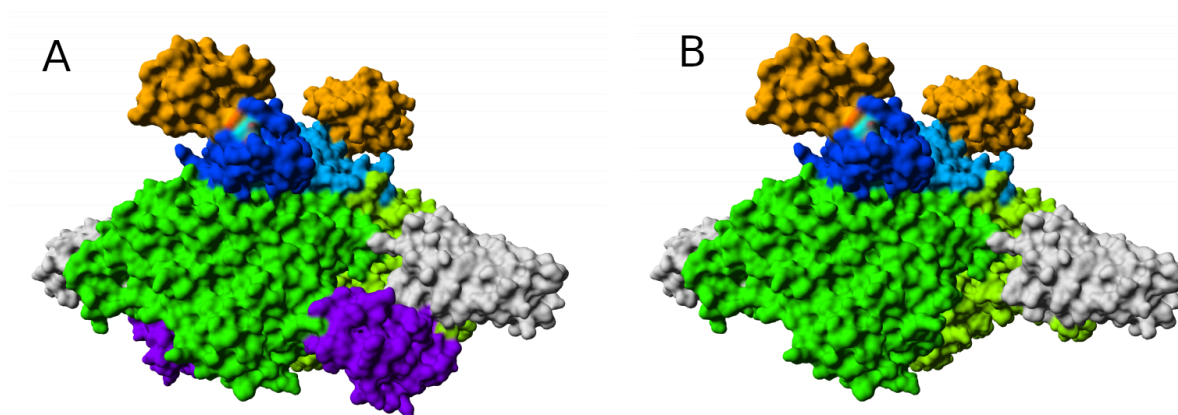


Figura 4.7. Estructuras de partida para el cálculo de dinámicas moleculares atomísticas. En A el complejo NIAUF compuesto por (NFS1/ISD11-ACP/ISCU/FXN)₂. En B la que resulta de la edición del complejo borrando a las moléculas de FXN para simular un complejo NIAU compuesto por (NFS1/ISD11-ACP/ISCU)₂. Se respeta el código de colores empleado en la **Figura 4.5**

En la **Tabla 4.2** y la **Figura 4.8** , mostramos los resultados obtenidos del análisis de simulaciones de dinámica molecular. El residuo de Trp454 del CTS de NFS1 establece una interacción apolar con la Pro65 de ISCU y con la Ala66 solo cuando FXN está presente. Este comportamiento es más evidente en la subunidad A en comparación con la subunidad E.

Por otro lado, la His457 del CTS interactúa con la Arg165 de FXN y con el Asp144 de ISCU, este último sólo cuando FXN está presente. La Gln456 de NFS1 se encuentra en la vecindad de la Cys69 que forma parte del sitio de ensamblaje de ISCU, aunque las distancias son $> 4-5 \text{ \AA}$, esto podría ser relevante para la actividad de ensamblaje de clústeres.

En estas simulaciones, el *loop* que contiene a la Cys381, está lejos del sitio PLP (la distancia entre Cys381 y PLP es mayor que 10 \AA). Por otro lado, Cys158 está ubicada cerca del sitio PLP (durante la simulación las distancias son $< 5 \text{ \AA}$), lo que sugiere cierta

rigidez del sitio PLP y que este residuo de Cys podría ser relevante para la actividad enzimática.

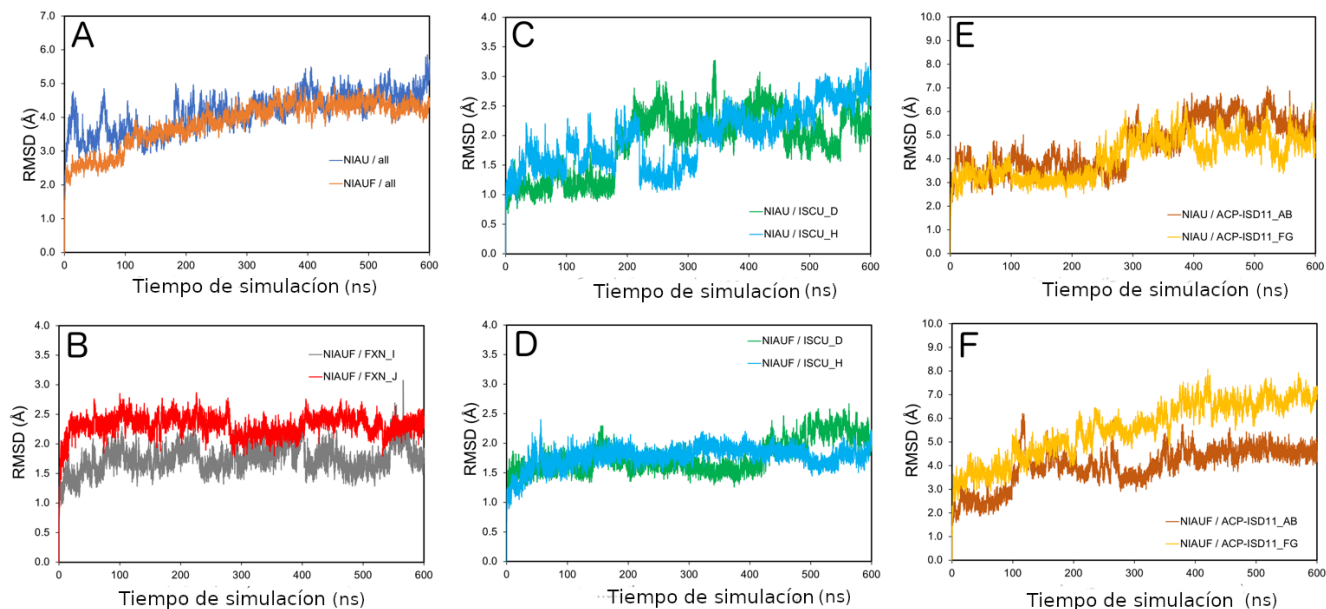


Figura 4.8 Movilidad de las subunidades en el contexto de los supercomplejos NIAUF y NIAU. (A) RMSD correspondiente a todo el super complejo durante la dinámica, en ausencia (azul) o en presencia de FXN (naranja). (B) Comparación de los valores de RMSD de ambas subunidades de FXN en el contexto de la dinámica del super complejo. (C) Valores RMSD para ISCU calculados a partir de simulaciones del super complejo NIAU (sin FXN). (D) Valores de RMSD correspondientes a ambas subunidades de ISCU obtenidos en dinámicas del super complejo NIAUF (con FXN). Valores de RMSD correspondientes a las subunidades ACP-ISC11 en ausencia (E) o en presencia (F) de FXN.

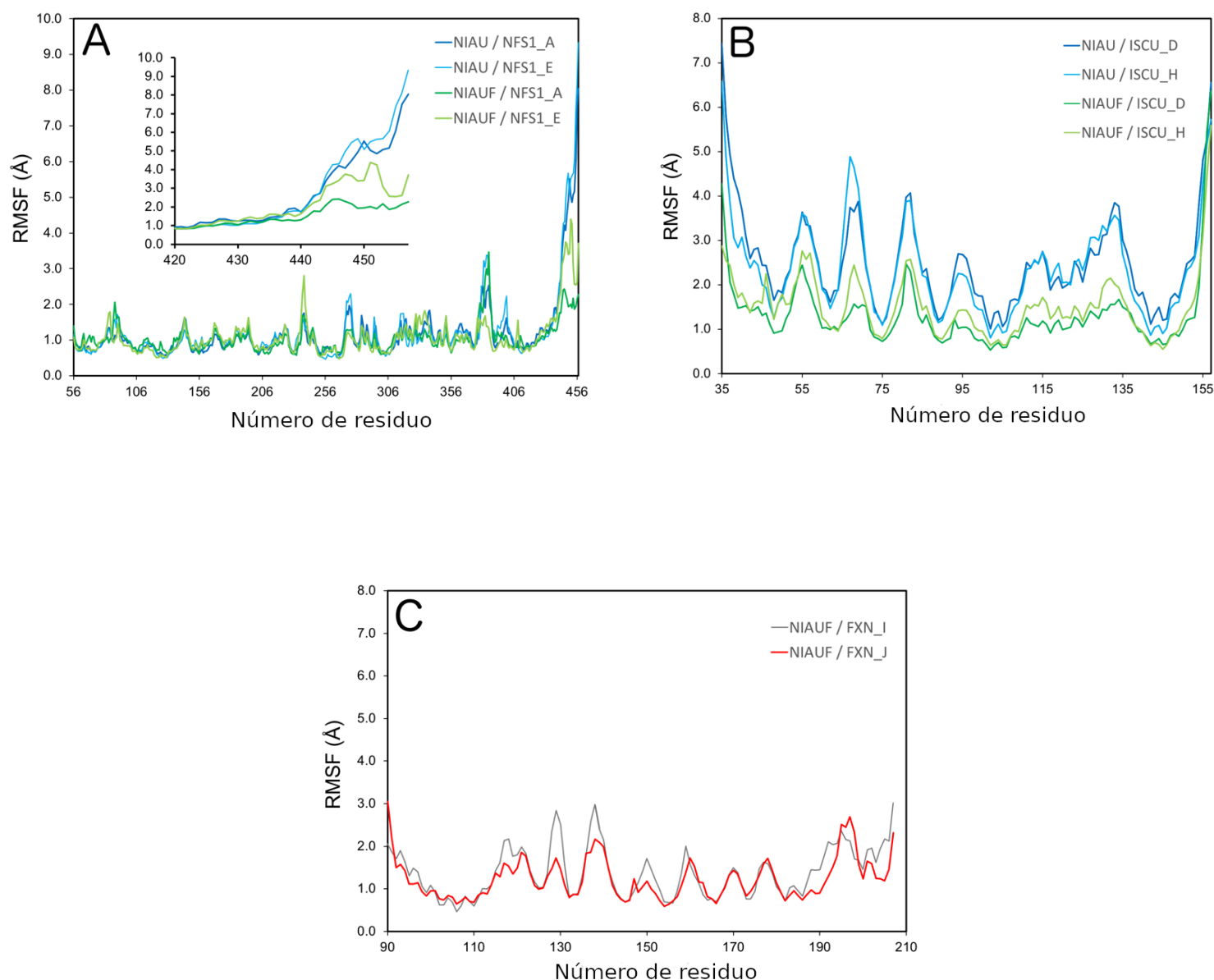


Figura 4.9. Fluctuaciones atómicas de las subunidades en el contexto de los supercomplejos NIAUF y NIAU. (A) El efecto de la presencia de FXN sobre el CTS de NFS1. (B) El efecto de la presencia de FXN sobre las fluctuaciones en las distintas regiones de ISCU. (C) Análisis de las fluctuaciones atómicas de la FXN.

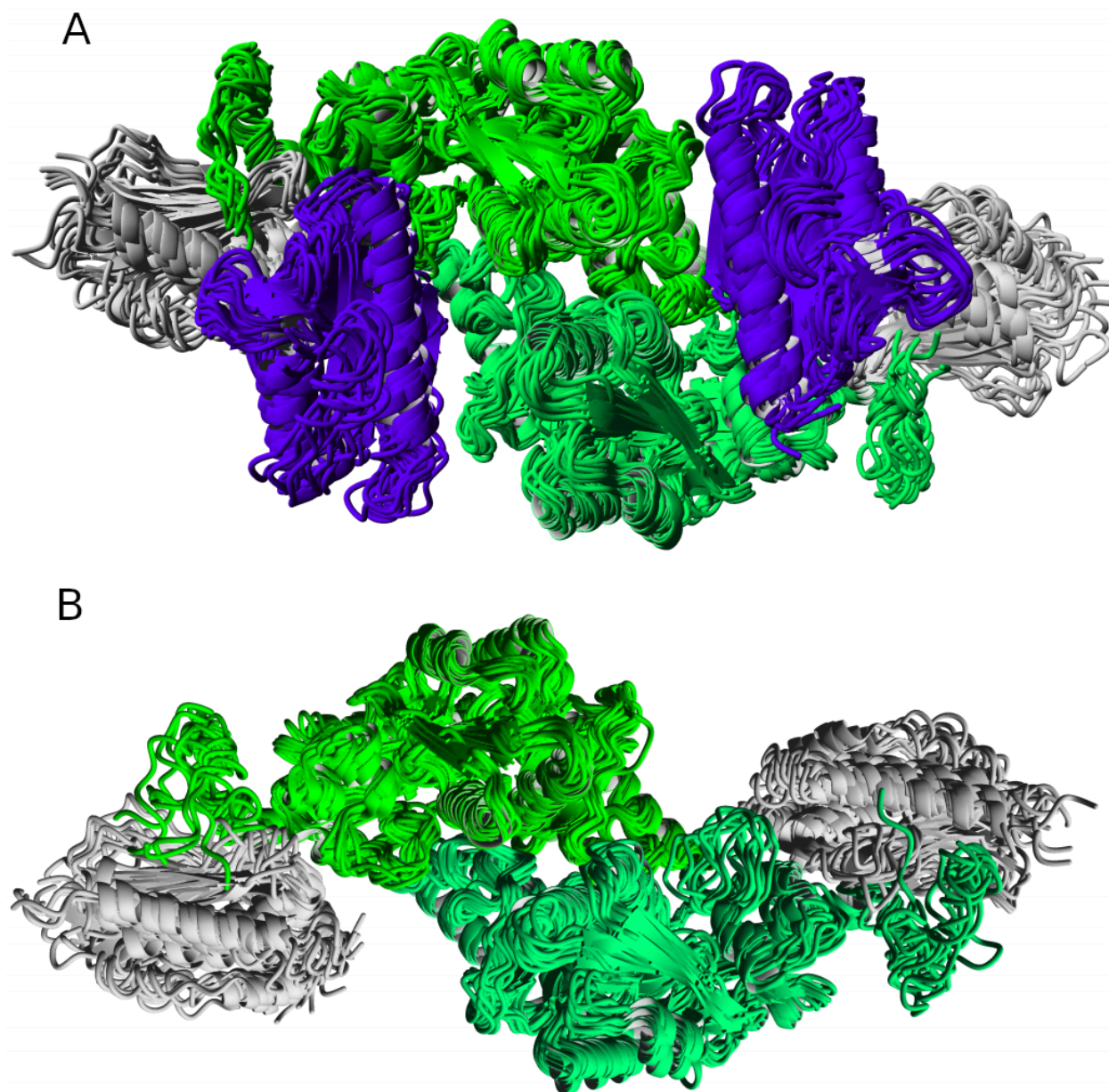


Figura 4.10. Ensemble de conformaciones emergentes de las simulaciones por dinámica molecular del complejo NFS1. Por claridad se muestran solamente las proteínas NFS1, ISCU y FXN según corresponda. En A el ensemble de conformaciones resultante de la simulación del complejo en presencia de FXN. En B el ensemble de conformaciones resultantes de la simulación del complejo en ausencia de FXN. Se puede observar como en presencia de FXN (A) el espacio conformacional de CTS se ve limitado.

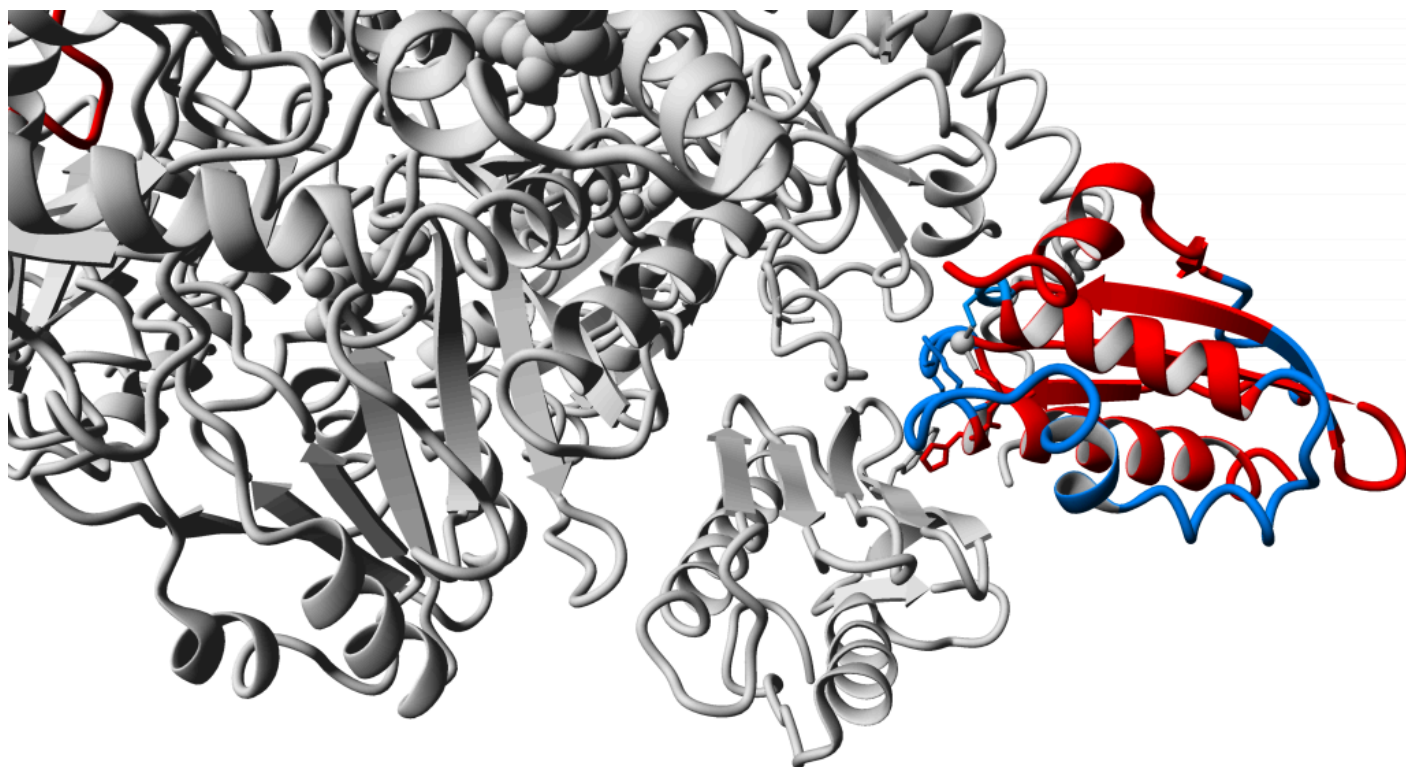


Figura 4.11. Mapeo de movilidad en el contexto de las simulaciones para ISCU2. En azul se muestran las zonas móviles de ISCU2 cuyo RMSF se ve más modulado por la presencia de FXN en el super complejo. En rojo el resto de la proteína ISCU2 y en gris el super complejo por razones de contexto.

Tabla 4.2. Descripción de distancias de interacción claves entre NFS1 e ISCU.

Residuo en NFS1	subunidad (Identificación de PDB: 6NZU)	Residuo de ISCU, FXN o NFS1	Distancia (con FXN) (Å)	Distancia (sin FXN) (Å)	Nota
Cys158	A	PLP/NFS1	$3,9 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,4$	Importante para la actividad
Cys158	E	PLP/NFS1	$3,7 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,0$	
Cys381	A	PLP/NFS1	$12,6 \pm 1,3$	$12,4 \pm 2,0$	Loop Cys no contactó a PLP
Cys381	E	PLP/NFS1	$16,4 \pm 1,2$	$17,1 \pm 1,8$	
Gln456	A	Cys69/ISCU	$6,2 \pm 2,5$	---	Cys69 desde el sitio de ensamblaje
Gln456	E	Cys69/ISCU	$7,5 \pm 2,9$	---	
His457	A	Asp144/ISCU	$6,3 \pm 3,0$	$18,1 \pm 5,8$	enlace H
His457	E	Asp144/ISCU	$11,6 \pm 6,2$	$17,4 \pm 7,0$	
His457	A	Arg165/FXN	$4,2 \pm 0,8$	---	Interacción carga-carga
His457	E	Arg165/FXN	$4,2 \pm 1,1$	---	
His457	A	Tyr175/FXN	$12,0 \pm 2,0$	---	Un enlace H en el modelo inicial
His457	E	Tyr175/FXN	$12,9 \pm 2,4$	---	
Trp454	A	Ala66/ISCU	$4,3 \pm 0,8$	$11,2 \pm 3,8$	interacción apolar
Trp454	E	Ala66/ISCU	$7,1 \pm 2,1$	$9,6 \pm 4,0$	
Trp454	A	Pro65/ISCU	$3,8 \pm 0,4$	$9,9 \pm 4,4$	interacción apolar
Trp454	E	Pro65/ISCU	$6,5 \pm 2,7$	$7,8 \pm 3,6$	

4.3.2. Los movimientos moleculares de Trp155 controlan la arquitectura del sitio de ensamblaje de ISCU

Dado el hallazgo realizado por nuestro laboratorio, sugiriendo que los movimientos de la cadena lateral de Trp155 podrían encontrarse alterados especialmente en el caso

de la variante inestable W173G, exploramos la dinámica de los residuos Trp155 en el contexto del súper complejo (NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN)₂ para establecer la relevancia de sus movimientos y en la determinación de la arquitectura del sitio de ensamblaje de centros Fe-S.

Los movimientos de los Trp155 mostraron un comportamiento similar al observado en el caso de la variante FXN de tipo salvaje aislada. Como se muestra en la **Figura 4.12.A**, junto con los movimientos en Trp155, la cadena lateral His137 de la ISCU, que originalmente está distante de Cys95, Cys138 y Asp71, adquirió una ubicación que se orienta hacia el sitio de ensamblaje. Los movimientos descritos anteriormente para Trp155 fueron aún más marcados en una de las dos subunidades FXN. A su vez, la cadena lateral His137 de la ISCU adquirió la ubicación correcta en el sitio de ensamblaje en ambas subunidades ISCU. Por lo tanto, sugerimos que, independientemente de la influencia del Trp155, la His137 de ISCU podría en principio experimentar una transición desde la conformación inicial hacia la del sitio de ensamblaje. Esencialmente, si el Trp155 adquiere la conformación que se encuentra más poblada durante la dinámica molecular, la His137 no puede reubicarse en la posición anterior y solo se adquiere la conformación que la aloja en el sitio de ensamblaje. Esto puede ocurrir porque Trp155 se desplaza a una posición, al menos, parcialmente superpuesta a la que anteriormente ocupaba His137 (esta última fuera del lugar de ensamblado de clústeres).

Cuando el Trp155 cambia la conformación rotamérica inicial, en la que se forma un enlace de puente de hidrógeno con la Gln153, se establece un nuevo puente de hidrógeno, que involucra a la Gln148 de FXN (**Figura 4.12**), y se muestra en detalle en

la **Figura 4.12.B**), lo mismo también ocurre con la Asn151 de FXN (**Figura 4.12.C**). Por otro lado, la Arg165 puede establecer una interacción de puente de hidrogeno con Gln153 (**Figura 4.13.A**). Esta dinámica en la red de puentes de hidrógeno también tiene lugar en el contexto de las simulaciones de dinámica molecular correspondientes a la FXN aislada, sugiriendo que esta red podría tener un rol funcional ya que varios de los residuos mencionados derivan en Ataxia de friedreich cuando mutan.

Estos resultados sugieren que los movimientos en el sitio de ensamblaje están coordinados por una interacción específica de residuos clave de FXN, al menos por Asn151, Trp155, Gln153, Gln148 y Arg165 (también quizás Asn146, entre otros residuos) **Figura 4.13**.

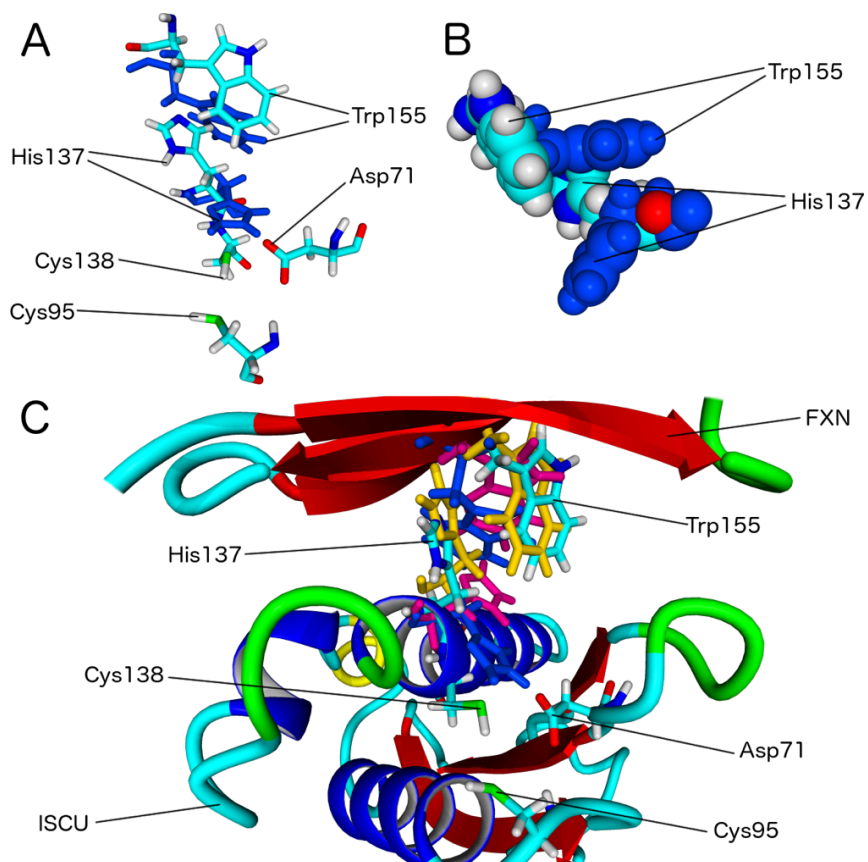


Figura 4.12. Dinámica molecular de Trp155 y His137, de FXN e ISCU respectivamente. (A) Dos conformaciones diferentes (coloreadas por elemento y azul, respectivamente) de la clave residuo Trp155 (FXN) y, Asp71, Cys95, His137 y Cys138 (el sitio de ensamblaje de ISCU). (B) Las conformaciones pobladas por el residuo Trp155 de FXN restringe las conformaciones de la cadena lateral ISCU His137. (C) Súper posición de las instantáneas extraídas del Simulaciones del supercomplejo: coloreadas por elemento, amarillo, magenta y azul, corresponde a la estructura original (PDB ID:6NZU), y tres conformaciones diferentes, respectivamente.

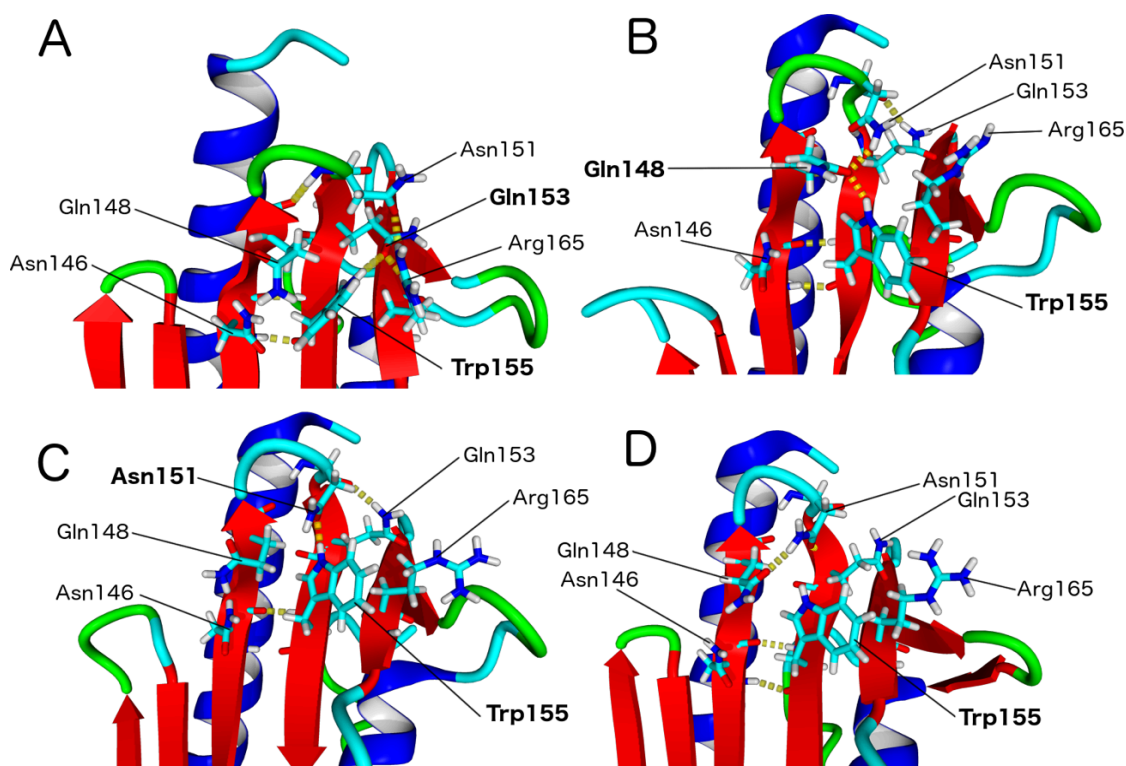


Figura 4.13. Red de puentes de hidrogeno asistida por cadenas laterales amida restringen los movimientos del Trp155. (A) y (B) H-N- de Trp155 establece un enlace H con el carbonilo O de la cadena lateral Gln148. Además, la Arg165 establece una interacción con el carbonilo O de la cadena lateral de Gln153. (C) H-N- de la cadena lateral Trp155 establece un enlace H con el carbonilo O de la cadena lateral amida Asn151. Por otro lado, el O- de la cadena lateral de Gln148 establece un enlace de H con el grupo carbonilo H-N- (esqueleto) de Asn151. (D) Trp155 forma un enlace H con O de la cadena lateral Gln153, mientras que la interacción Gln153-Arg165 se rompe, de forma similar a la conformación inicial.

4.4. Discusión

Las simulaciones computacionales de la dinámica molecular han demostrado una gran utilidad para ampliar el estudio de una macromolécula dada cuando contamos con un modelo estructural válido. En esta oportunidad, su aplicación a la estructura del súper complejo de síntesis de centros Fe-S han permitido evaluar la posible relevancia que distintas interacciones específicas pueden tener para la adquisición de conformaciones específicas vinculadas con el correcto funcionamiento. Sin duda, contar con un modelo experimental del complejo completo fue de gran importancia y permitió una evaluación del rol de la FXN en la dinámica global. Cabe decir que nuestra aproximación de remoción de la FXN podría ser incorrecta si es que el super complejo adquiere conformaciones muy distintas no pobladas durante los tiempos de simulación estudiados.

Como hallazgo principal y relevante, hemos demostrado que la FXN tiene efectos específicos y globales sobre la estabilidad conformacional de distintos miembros del súper complejo síntesis de centros Fe-S. Se observa claramente que la movilidad global de la NFS1 y la ISCU están afectadas por la presencia de la FXN (**Figuras 4.9, 4.10 y 4.11**). Esta nueva información toma relevancia, porque le confiere a la FXN un claro “protagonismo conformacional” para el super complejo, parte de sus ya conocidas funciones como proteína facilitadora o moduladora de actividad podrían estar vinculadas con estos hallazgos. Queda claro que es también un modulador estructural dentro de la dinámica natural del super complejo.

Las simulaciones de la dinámica molecular que llevamos adelante permitieron investigar la relevancia de los contactos establecidos entre ISCU, FXN, y la porción

CTS de la desulfurasa NFS1 para la conformación del súper complejo de síntesis de centros Fe-S.

Encontramos que la presencia de FXN determina la movilidad interna de ISCU en zonas que son de importancia para la estabilización del sitio de ensamblaje de los centros Fe-S, pero igualmente importante, se observó que FXN determina en gran medida la movilidad de la CTS de la desulfurasa NFS1. La interfase entre ISCU y FXN sirve de ancla conformacional para el CTS de la desulfurasa NFS1 que no tiene estructura periódica definida en la estructura de partida. Estos resultados de simulación abren la puerta para un estudio experimental que pudiera evaluar un posible rol protagonista para los aminoácidos que pertenecen a esta sección; ya sea (a) con implicancias en la catálisis, formando interacciones claves en el sitio de ensamblaje, (b) o como un modulador conformacional que en su interacciones con ISCU y FXN, selecciona los conformeros adecuados para el funcionamiento del complejo.

Por otro lado, al indagar sobre el papel que tiene FXN en la modulación conformacional del super complejo y sus implicaciones funcionales, hemos puesto la atención en el residuo Trp155 de FXN a lo largo de la dinámica. Este residuo es de suma importancia porque como mencionamos su mutación resulta en Ataxia de Friedreich por pérdida de función (Tsai, Bridwell-Rabb, y Barondeau 2011). En ese sentido, encontramos que en el contexto del supercomplejo, el Trp155 tiene un rol en la coordinación de movimientos de la His 137 de ISCU fijando el rotámero de la His137 de ISCU en la conformación que se orienta hacia la zona donde se coordinará el centro Fe-S (Espeche et al 2022). Así, la presencia de FXN induce la conformación de la His137 de ISCU que tiene relevancia catalítica en el contexto del super complejo.

Por su parte, para el *loop* de NFS1 que contiene la Cys381, no se observaron diferencias conformacionales relevantes en ausencia o presencia de FXN. Este hallazgo podría indicar que los cambios conformacionales de los que depende la movilidad del *loop* para catalizar la reacción, podría tener energías de activación relativamente altas que dificultan la exploración de estos eventos con un muestreo como el realizado, cercano al mínimo conformacional.

Para poder capturar un movimiento del *loop* podría ser necesario transponer la barrera energética que impide el cambio y aportar esa energía a través de técnicas de muestreo sesgado o dirigido, o de dinámicas aceleradas. También es posible que el cambio conformacional esté sujeto a particularidades en la conformación como lo podrían ser la coordinación de Fe o Zn en la ISCU, o de la per sulfuración de la Cys381, que puede resultar en nuevas interacciones estabilizantes o desestabilizantes de la conformación del *loop*.



"Don't only practice your art, but force your way into its secrets, for it and knowledge can raise men to the divine."

Ludwig Van Beethoven

Capítulo 5: Desentrañando las relaciones entre estructura y actividad del complejo L-Cys desulfurasa NFS1

5.1. Contexto

Revisitemos lo expuesto en el Capítulo 4 respecto de las demandas estructurales del súper complejo de biosíntesis de centros Fe-S. Debemos recordar que la estructura dimérica funcional de NFS1 está estabilizada por dos unidades heterodiméricas ACP-ISD11 (Herrera et al. 2019). Una subunidad de ISCU (la proteína de andamiaje y ensamblado de centros Fe-S) interactúa con cada monómero de NFS1, y la actividad de NFS1 es modulada positivamente por la frataxina (FXN) (Patra y Barondeau 2019; Parent et al. 2015; Bridwell-Rabb et al. 2014), esta última a su vez interactúa con ISCU y con ambas subunidades de NFS1 (Cai et al. 2018; Fox et al. 2019). Además, una parte de la superficie de la hoja beta de FXN que incluye al residuo clave Trp155 formando parte del sitio de ensamblaje de centros Fe-S.

Las mutaciones de las proteínas que forman el súper complejo conducen a una variedad de enfermedades raras y graves, entre ellas la Ataxia de Friedreich (causada por una deficiencia en la expresión y/o función de FXN) (Delatycki y Bidichandani 2019) y la Miopatía ISCU (causada por una deficiencia en la función ISCU) (Mochel et al. 2008; Nordin et al. 2011; Kollberg et al. 2009). Si bien el conocimiento estructural de las vías metabólicas en las que participa NFS1 se ha incrementado notablemente en los últimos años, en particular con la obtención de la estructura del super complejo (Fox et al. 2019), los mecanismos moleculares para la movilización de azufre y el ensamblado de centros Fe-S aún no se han entendido completamente. Esto se debe

en parte, a la dificultad de preparar el super complejo *in vitro*; también a la sensibilidad del proceso al oxígeno y la inhibición ejercida por la presencia de Zn(II) en el ensamblaje ISCU sitio (Fox et al. 2019). Por otro lado, la complejidad del mecanismo enzimático en sí mismo, y la complejidad de la detección de los productos: clústeres de Fe-S ([2Fe-2S]) y la formación de productos de azufre de alto peso molecular hacen muy difícil el estudio de este sistema.

De cualquier manera es bien sabido que la L-cisteína es la fuente de azufre (-SH) y que los primeros pasos de la reacción requieren el cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP). La L-cisteína desulfurasa NFS1 cataliza la eliminación del resto de azufre (-S-H) del sustrato y transfiere el azufre (como un grupo persulfuro, S-SH) a un residuo de cisteína ubicado en un *loop* móvil de NFS1 (Cys381 en el NFS1 humana). Este bucle conecta el sitio activo de NFS1 con el sitio de ensamblaje del centro Fe-S ubicado en la superficie de ISCU con una separación de más de 25 Å, proporcionando a la proteína las especies de persulfuro necesarias para el ensamblaje del centro propiamente dicho. Recientemente se demostró que la FXN modula positivamente la reacción al menos en dos pasos diferentes: reacciones relacionadas con PLP y (b) y el transporte de átomos de azufre a ISCU. Dado que la estructura del super complejo muestra que la FXN está lejos del sitio PLP, la activación cinética que se observa por la presencia de la FXN debe ejercerse tanto a largo alcance (sitio PLP) como a corto alcance (sitio ISCU) (Black y Dos Santos 2015).

Por otro lado, la reacción global realizada por el súper complejo puede subdividirse en varios pasos: (I) La extracción del grupo -SH del sustrato L-Cys. Este paso es complejo y (resumidamente) incluye la formación de la base externa de Schiff

(con el sustrato L-Cys); la formación del intermediario persulfuro-enzima; la liberación de L-Ala y transferencia de persulfuro; (II) el cambio conformacional del bucle móvil y la Cys381, en el que el persulfuro transferido a NFS1 en el sitio PLP (NFS1-S-SH, cerrado) se expone a la ISCU (NFS1-S-SH, abierto); y (III) la reacción de transferencia de persulfuro a ISCU. Más específicamente, la desulfuración del sustrato L-cisteína en el sitio PLP implica una serie de especies intermediarias antes de la escisión del enlace C-S que pueden asignarse por características específicas de sus espectros de absorbancia (estas especies son, cis-aldimina, cis-quinonoide, cis-cetimina). Después de la escisión del enlace C-S, el grupo -SH se transfiere al Cys 381 para formar el persulfuro (todo ello en el sitio PLP)(Gervason et al. 2019). Luego, después de un cambio conformacional del *loop* móvil que contiene Cys381, el grupo persulfuro en Cys381 (Cys 381-S-SH) queda expuesto al solvente. En este punto, la reducción de persulfuro mediante el uso de un agente reductor como DTT para regenerar Cys381-SH, permite una cinética de recambio múltiple con la producción de L-Ala y liberación de H₂S. Parent y colaboradores demostraron que la reducción de persulfuro es el paso limitante de la velocidad cuando se usa DTT como agente reductor. Además, la FXN acelera la transferencia de persulfuro de NFS1 a ISCU (50 veces) o a compuestos de tiol libre de peso molecular pequeño (la transferencia es 10 veces más rápida que el DTT no fisiológico, mientras que L-Cys o glutatión mostraron menor eficiencia reductora). En estas condiciones, la reducción de persulfuro de ISCU no fue acelerada por FXN (Parent et al. 2015; Gervason et al. 2019).

Recientemente, Gervason y colaboradores demostraron que en condiciones más fisiológicas, en las que la ferredoxina 2 mitocondrial (FDX2) es quien suministra los

electrones de manera muy eficiente para la formación de los centros [2Fe2S], y la ISCU forma un complejo con el hierro (Gervason et al. 2019). Aquí, aparentemente, la reducción de persulfuro es el paso limitante. Además, se demostró que la transferencia de persulfuro es un proceso dependiente del hierro (un hecho que puede indicar que la transferencia de azufre esté coordinada con la disponibilidad de hierro en el sitio de ensamblaje ISCU); en ausencia de metal, se suprime la transferencia de persulfuro (Gervason et al. 2019). Vale la pena mencionar que en el sistema ISC bacteriano, la unión del hierro a la proteína de andamiaje también promovió la reacción de transferencia de azufre intermolecular (Lin et al. 2020).

En este contexto, hemos propuesto realizar la disección de las relaciones entre estructura y función del súper complejo para tener una mejor comprensión del papel que juega cada subunidad en la arquitectura global y del rol de ciertos residuos y elementos estructurales y funcionales.

Para disponer de una nueva herramienta para estudios funcionales, nos hemos centrado en los primeros pasos de la reacción, y decidimos evaluar la posibilidad de medir el producto L-Ala para seguir la reacción de forma directa y muy sencilla, tanto en tiempo real, como mediante mediciones de punto final. Esto es importante porque el método del azul de metileno (Moest 1975; Tsai y Barondeau 2010), que se usa muy comúnmente incluso en nuestro laboratorio, funciona solo como un método de tiempo fijo y se basa en la medición de H_2S ; un gas que como tal, puede escapar del tubo de reacción, haciéndola una metodología semicuantitativa. Además, se sugirió que la presencia de átomos de azufre puede representar una fuente significativa de interferencias. Este aspecto es relevante porque por cuestiones de estabilidad de la

enzima y de aporte de electrones, la reacción se realiza en presencia de DTT. Asimismo, la adición de un solvente ácido, en un paso de la reacción de síntesis de azul de metileno, podría dar como resultado la liberación de grupos de azufre unidos a proteínas. Además, se sugirió que la presencia de átomos de azufre podría representar una fuente importante de interferencias.

Otras dos metodologías diferentes han sido utilizadas por otros grupos para monitorear la producción del subproducto de L-Ala. Una de ellas se basa en una reacción de desulfurasa de punto final seguida de la modificación de L-Ala con naftaleno 2,3-dicarboxaldehído (NDA) para producir la molécula fluorescente L-Ala-NDA, el análisis se realiza típicamente por HPLC fase reversa (Selbach 2010). El segundo método consiste en una reacción de punto fijo para la cisteína desulfurasa, que se detiene con ácido tricloroacético (TCA), se centrifuga y neutraliza, seguida de una reacción concatenada basada en la adición de la enzima L-Ala deshidrogenasa (ADH) para consumir el L-Ala, producido anteriormente por NFS1. Esta reacción es monitoreada por la detección de la formación de NADH (Parent et al. 2015).

Se ha implementado un tercer ensayo de actividad de L-Cysdesulfurasa que también funciona para mediciones de tiempo fijo, en el que se monitorea la concentración de L-Cys en solución (Tsai, Bridwell-Rabb, y Barondeau 2011).

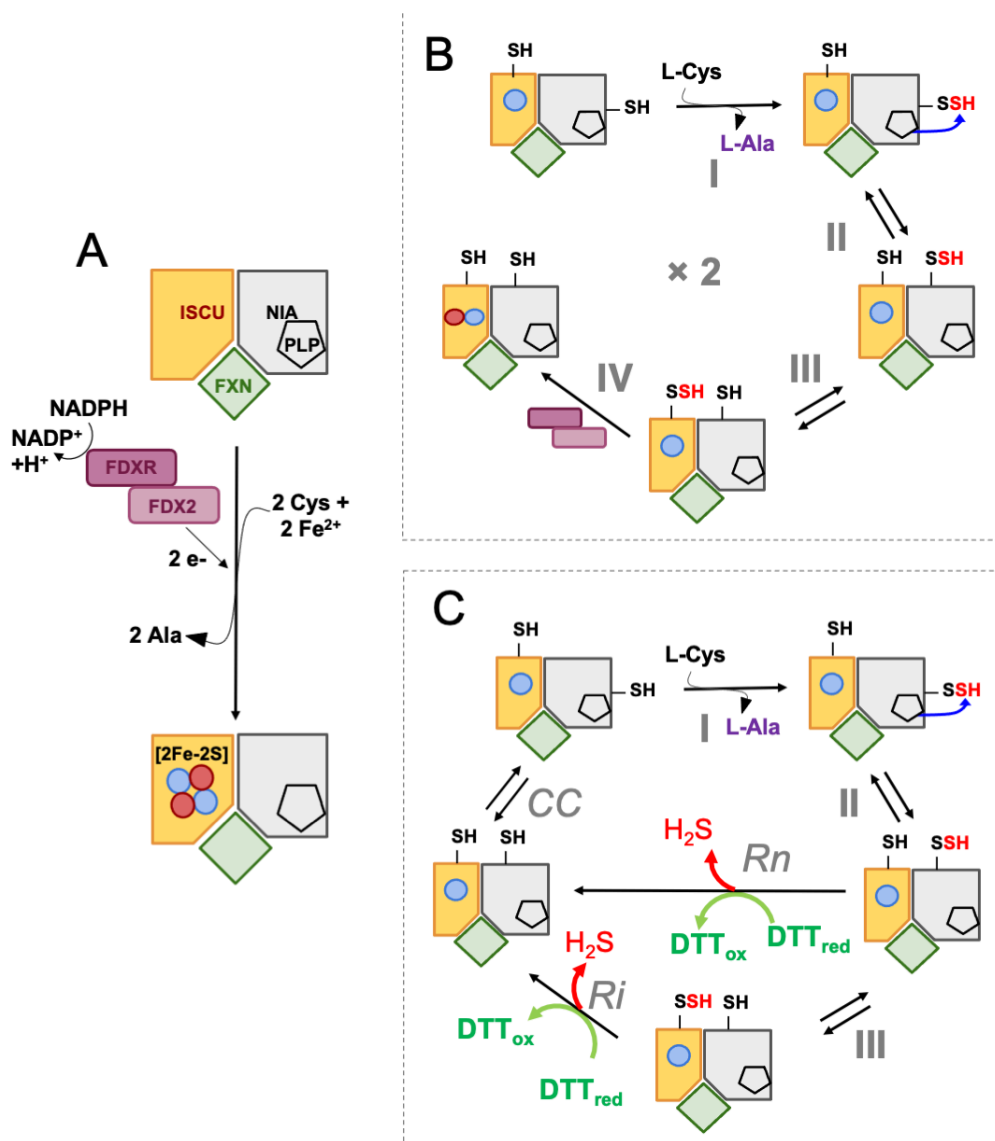


Figura 5.1.1. Proceso esquematizado de ensamblaje de grupos [2Fe-2S] y reacción in vitro. (A) La reacción general catalizada por el complejo NIAUF utiliza 2 residuos de cisteína libres, 2 electrones y 2 iones Fe²⁺ como sustratos y produce un grupo [2Fe-2S] en ISCU y alanina libre como productos. Los electrones provienen del par FDX2-FDXR y son proporcionados por NADPH. (B) Una versión detallada del proceso, dividido en 4 pasos y comenzando con ISCU ya cargada con un ion Fe²⁺: (I) la cisteína desulfurasa NFS1 cataliza la desulfuración de una cisteína libre en el sitio PLP, produciendo un persulfuro en su residuo Cys381 y alanina libre. Este es un paso dependiente de PLP y requiere proximidad espacial entre Cys381 y el cofactor PLP; (II) el bucle que contiene este residuo de Cys381 sufre un cambio conformacional que lo coloca muy cerca de ISCU; (III) el persulfuro se transfiere de NFS1 al residuo Cys138 de ISCU, y (IV) el persulfuro se reduce a azufre mediante un agente reductor (FDX2 reducido) y reacciona con el ion Fe²⁺ produciendo un grupo de Fe-S. Estos pasos ocurren 2 veces para producir un grupo [2Fe-2S]. (C) La reacción no fisiológica estudiada en este capítulo.

Al mismo tiempo, este capítulo busca explorar la relevancia estructural de distintas porciones de NFS1. Del capítulo 4 se desprende que las interacciones de la CTS de NFS1 están moduladas por la presencia de FXN y que parecen colaborar a que las porciones catalíticas de la ISCU se pongan en su correcta posición. A través de la generación de variantes de NFS1, buscamos escanear cuales de esas interacciones en el CTS tienen más relevancia y en qué contexto; las variantes elegidas fueron: H457A, Q456A, W454A e I452A (ver **Tabla 4.1**). También en la dirección del análisis estructural, sabemos que el *loop* catalítico de NFS1 que contiene a la Cys381 es vital para el correcto funcionamiento del complejo; en ese sentido también hemos querido sumar algunas preguntas, por ejemplo, si la movilidad y la flexibilidad de dicho *loop* puede alterarse para alterar el ciclo catalítico, preparamos la variante GGG, en la que se insertó un nuevo residuo Gly después de Ser377 y el residuo Ala384 se reemplazó por Gly produciendo tres residuos Gly en un nuevo bucle ligeramente más largo (**Figura 4.6**). Por lo tanto, se ubicaron dos nuevos residuos de Gly en el *loop* catalítico, uno río arriba y otro río abajo de Cys381. Por último, incluimos en nuestro análisis dos variantes de Cys en una la variante C381S como control de 100% pérdida de función, y C158A, cuya ubicación es muy cercana al sitio activo PLP sugiriendo un rol funcional o estructural. Siendo que la Cys158 está ubicada en un elemento con estructura secundaria helicoidal aparentemente estable cerca del PLP y a 4 residuos de la Cys163 (en la misma hélice alfa que la Cys158), también nos preguntamos si es que estas Cys son capaces de reaccionar con la L-Cys sustrato así como lo hace la Cys catalítica Cys 381.

5.2. Objetivos

1. Poner a punto un nuevo método para la medición de la actividad desulfurasa en tiempo real, mediante la generación y análisis de espectros ^1H -RMN 1D de L-Ala.
2. Evaluar la relevancia funcional de residuos localizados en el CTS.
3. Evaluar el efecto del incremento de movilidad del *loop* catalítico que contiene a la Cys381.

5.3. Resultados

5.3.1. Implementación de la detección de L-Ala mediante espectroscopía de RMN para evaluar la actividad del super complejo desulfurasa.

Se llevaron adelante experimentos de actividad seguidos en tiempo real mediante distintas aproximaciones. La enzima central (NFS1/ACP-ISD11)₂ exhibió una actividad de L-Cys desulfurasa basal significativa. Sin embargo, en presencia de las proteínas ISCU2 y FXN, se observa una activación cinética que previamente fue muy bien descrita (Bridwell-Rabb et al. 2014; Parent et al. 2015; Tsai y Barondeau 2010) (**Figura 5.3.A-C**). En **las Figuras 5.3.A y 5.3.B** mostramos los espectros de RMN monodimensionales de ^1H correspondientes a la región de las señales de L-Ala para la forma activada, por la presencia de FXN e ISCU2 (NFS1/ACP-ISD11/ISCU2/FXN)₂, o para el núcleo del súper complejo (NFS1/ACP-ISD11)₂, respectivamente. La

contribución a los espectros del resto de los componentes de reacción en esta región es despreciable.

La integración de estos picos puede utilizarse directamente para evaluar la evolución de la concentración de L-Ala, en función del tiempo de reacción (**Figura 5.3.C**). Cabe mencionar que nuestro diseño experimental permite obtener un espectro de RMN cada 5-7 min, y la reacción es lo suficientemente lenta como para aplicar esta estrategia para monitorear la desulfurización de L-Cys en tiempo real, monitoreando el aumento del área correspondiente a los picos de L-Ala, sin necesidad de detener la reacción para cada medida. Esta característica hace que este método simple y valioso sea una mejor opción que el utilizado anteriormente basado en reacciones de punto final (sin la posibilidad de realizar mediciones cinéticas).

Dado que la actividad de la enzima NFS1 es modulada positivamente por la presencia de FXN, estudiamos si la adición de esta proteína produce una modulación de la K_m para L-Cys, el sustrato de la enzima (**Figura 5.3.D-F**). Los resultados mostraron que la presencia de FXN resultó en una disminución significativa de la K_m aparente para el sustrato ($K_m > 1\text{mM}$ en ausencia FXN e ISCU y K_m de $12\ \mu\text{M}$ en presencia de estas proteínas). Esta disminución de la K_m aparente sugiere un aumento de ~ 100 veces en la afinidad por L- Cys para la condiciones experimentales descritas. Este resultado está de acuerdo con observaciones previas de otros grupos (Burley et al. 2021), lo que sugiere que las mediciones de RMN de L-Ala también conforman una opción para monitorear aspectos mecanísticos de la reacción. Sin embargo, este resultado debe analizarse con precaución, ya que la Cys es en sí mismo un reductor y podría acelerar la reacción simplemente por reducción del persulfuro sobre NFS1

(NFS1-Cys381-S-SH) o sobre ISCU. A esta observación debemos sumarle el hecho de que la Cys podría funcionar como inhibidor a altas concentraciones (Gervason et al. 2019), así, la obtención de la K_m de los ajustes a estos datos experimentales no resulta trivial.

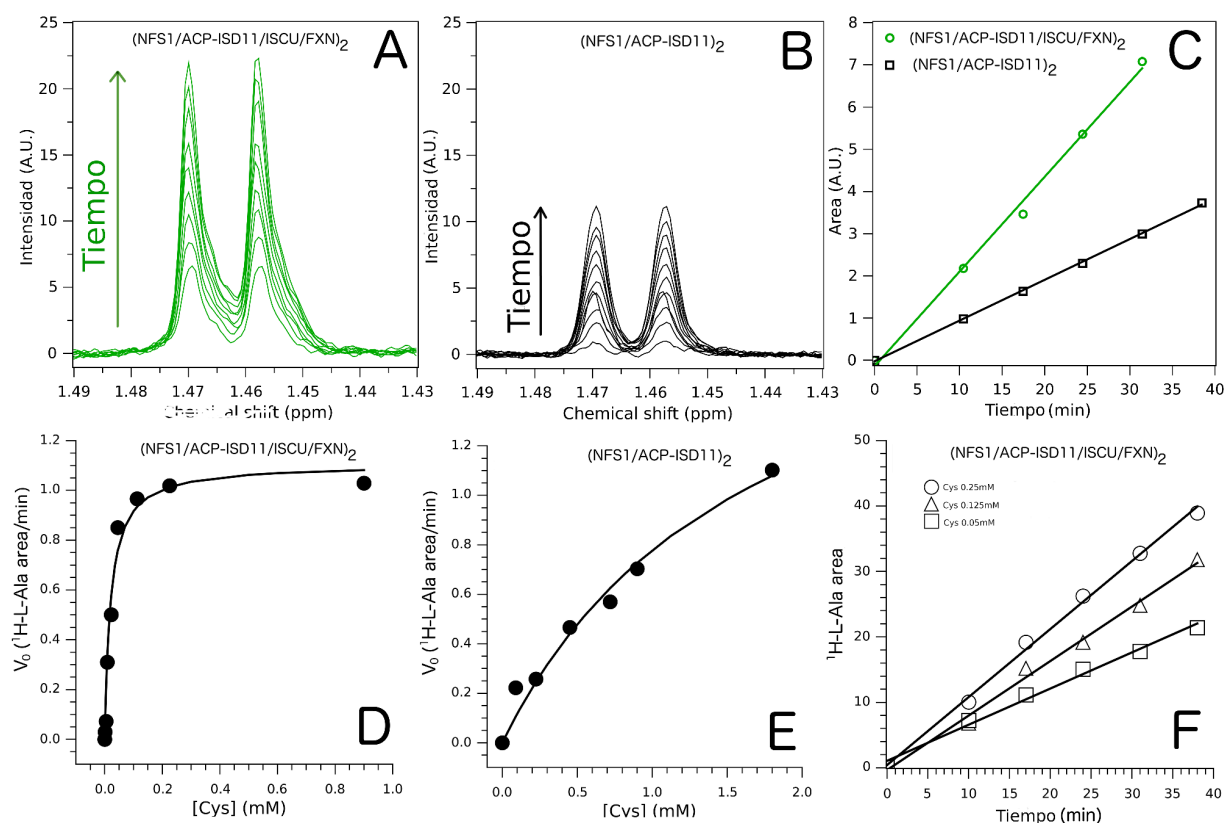


Figura 5.3. Actividad de la L - Cys desulfurasa Supervisado por ^1H -RMN en tiempo real. (A) Monitoreo en tiempo real de la actividad de $(\text{NFS1/ACP-ISC11/ISCU/FXN})_2$ y (B) enzima central $(\text{NFS1/ACP-ISC11})_2$ por el aumento lineal durante más de 70 min de [L -Ala]. Las flechas en A y B indican la evolución de la señal a lo largo del tiempo de reacción. Se muestra la sección de los espectros de RMN correspondientes al producto de reacción, L-Ala. La integración del área del pico, como medida de [L-Ala] a lo largo del tiempo de reacción, se muestra en (C). (D y E) son las curvas de sustrato correspondientes a $(\text{NFS1/ACP-ISC11})_2$ y el super complejo $(\text{NFS1/ACP-ISC11/ISCU/FXN})_2$. En (F) se muestran tres curvas representativas de la producción de L-Ala a lo largo del tiempo de reacción y en presencia de distintas concentraciones de L- Cys, y las pendientes corresponden a los valores de V_0 .

Dado que en las condiciones utilizadas en los experimentos de la **Figura 5.3**, el paso limitante de la velocidad es la reducción del persulfuro (Parent et al. 2015), exploramos la dependencia que tiene la velocidad de reacción de formación L-Ala con la concentración del agente reductor DTT, y comparamos ambas metodologías: el método del azul de metileno evaluado a tiempos fijos (**Figura 5.4**) con mediciones en tiempo real seguidas por RMN (**Figuras 5A y C**).

La dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de DTT para la generación de L-Ala fue lineal para el la variante de NFS1 de tipo silvestre y para la variante con la actividad más elevada (NFS1 C158A, Figura S3) en el rango de 0 a 4 mM de DTT. Por su parte, la dependencia de la producción de H_2S con la concentración de DTT también fue lineal para la variante silvestre de NFS1, resultado coincidente con el obtenido previamente por Parent y colaboradores (Parent et al. 2015). Por otro lado, cuando DTT estuvo ausente en la reacción, y se aumentó la concentración de L-Cys (rango de concentraciones similar), solo se observó un ligero aumento de la velocidad de reacción, compatible con un poder reductor de L-Cys mucho menor en comparación con el DTT (**Figura 5.4A, inserto**).

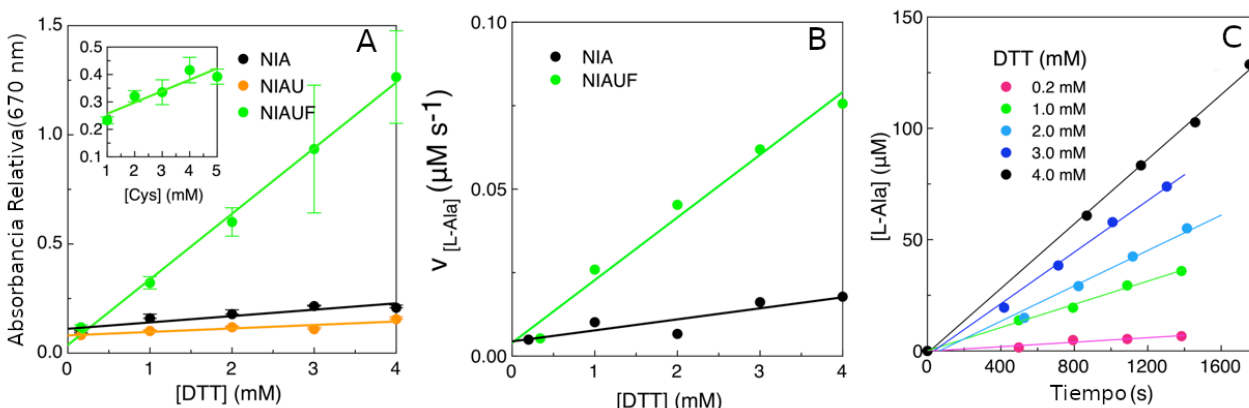


Figura 5.4. Actividad desulfurasa en función de la concentración de agente reductor (DTT). La actividad se midió en función de la concentración de DTT seguida por el método del azul de metileno (A), o por 1H -RMN en tiempo real (B); la concentración de L-Cys fue de 0,5 mM. En (C) la integración de los picos de RMN correspondientes a L-Ala para NIAUF (el super complejo de tipo salvaje), expresada como concentración de L-Ala al incluir en la reacción el estándar interno de ácido málico. Recuadro en A: DTT estuvo ausente en la reacción, y la concentración de L-Cys aumentó en el rango de 1-5 mM, el H_2S se determinó mediante el método del azul de metileno.

5.3.2. Expresión y caracterización biofísica de variantes de cisteína desulfurasa

NFS1

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la expresión de NFS1 en ausencia de ACP e ISD11 lleva a la producción de una proteína altamente inestable. Por este motivo, todas las variantes de NFS1 de L-Cys desulfurasa humana se coexpresaron con las subunidades proteicas ACP e ISD11 mitocondriales humanas.

Todas las variantes fueron purificadas a partir de la fracción soluble de los lisados, sugiriendo que los posibles efectos sobre la conformación deberían ser parciales. Sin embargo, los niveles de expresión fueron variables, hecho que podría estar vinculado con efectos sobre la estabilidad termodinámica de estos complejos proteicos (**Figura 5.5**). Vale la pena destacar que se tuvo especial cuidado en no incorporar codones

poco frecuentemente utilizados por *E. coli*, de manera de no perturbar la tasa de expresión.

Por otro lado, todas las variantes estudiadas copurificaron con ACP e ISD11, a juzgar por el análisis SDS-PAGE, y la relación de masa NFS1/ISD11 fue similar entre las variantes, tal y como se observa a partir del análisis de densitometría de las bandas correspondientes (el promedio la relación de intensidades de banda para las variantes fue $\text{NFS1/ISD11} = 2,3 \pm 0,4$), lo que sugiere la interacción adecuada con el heterodímero ACP-ISD11 y la estabilización al menos parcial de NFS1 y, en definitiva, la correcta formación del *core* $(\text{NFS1/ACP-ISD11})_2$. En el laboratorio, previamente, notamos que ACP se tiñe en menor medida que ISD11, probablemente como consecuencia de su alto contenido de residuos ácidos. Después de la purificación, el complejo se dializó extensamente en presencia de DTT 1 mM, a 4°C usando una membrana de corte de 10-12,0 kDa. Las proteínas se congelaron y se conservaron a -70°C. Notamos que su conservación de esta forma reduce la pérdida de actividad con el descongelamiento en comparación con su conservación en freezer de -20°C o en la heladera a 4°C. Antes de su uso, las variantes de NFS1 se descongelaron en hielo y se centrifugaron para eliminar posibles agregados proteicos. Observamos que la presencia de DTT impedía la oxidación de NFS1 e incrementa notablemente la conservación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación.

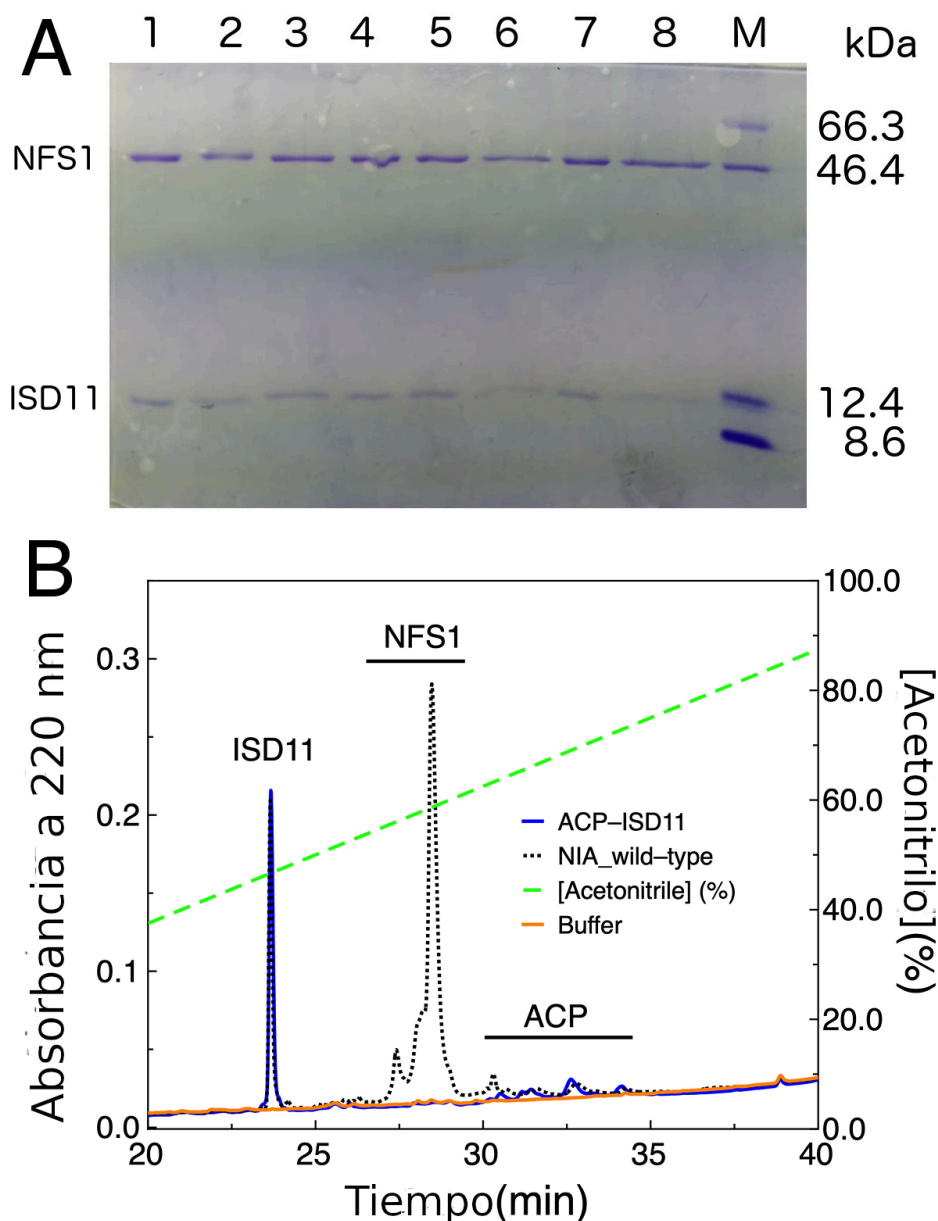


Figura 5.5. Análisis de la expresión de variantes de NFS1. (A) SDS-PAGE. Las variantes recombinantes de NFS1 se coexpresaron con las subunidades ACP e ISD11. Los carriles son (1) de tipo salvaje (NFS1/ACP-ISD11)₂, (2) H457A, (3) Q456A, (4) W454A, (5) I452A, (6) GGG, (7) C381S, (8) C158A y (M) los marcadores de peso molecular: BSA (66,3 kDa), NFS1 (46,4 kDa), ISD11 (12,4 kDa) y una afitina (8,6 kDa). El ACP no se observa fácilmente en la SDS PAGE debido a su alto contenido de residuos ácidos (Herrera et al. 2019; 2018). (B) HPLC de fase reversa (RP) (C18) de tipo silvestre (NFS1/ACP-ISD11)₂ (NIA, línea discontinua negra) y el heterodímero recombinante ACP-ISD11 (línea azul). La subunidad ACP eluyó como múltiples picos pequeños debido a la heterogeneidad de las cadenas de acilo, como se muestra antes (Herrera et al. 2018; 2019). El resto de variantes de NFS1 eluyen con perfiles de RP-HPLC muy similares.

Para evaluar la conformación de las variantes se estudiaron señales de fluorescencia de triptófano y dicroísmo circular (CD). El análisis de los espectros de fluorescencia de triptófano del complejo de tipo silvestre (NFS1/ACP-ISD11)₂ sugiere que los residuos de triptófano que aportan al espectro, en promedio, se encuentran en entornos hidrofóbicos, indicativos de entornos nativos (**Figura 5.6**). Después de una incubación de las proteínas con urea 8.0 M, los máximos de emisión de longitud de onda se desplazaron hacia los 350 nm, consistente con el desplegado completo de la proteína. Además, para todas las variantes, se observó un incremento de la intensidad de la fluorescencia con el desplegado, lo que sugiere que la extinción observada en el complejo de tipo salvaje es una característica conformacional del estado nativo, que se conserva entre las variantes que preparamos (**Figuras 5.6.A-B**).

Cabe señalar que la secuencia de aminoácidos del heterodímero ACP-ISD11 no contiene residuos de triptófano, por lo que la contribución a los espectros proviene exclusivamente de los tres residuos de triptófano de las subunidades NFS1 Trp97, Trp440 y Trp454, los dos últimos localizados en el CTS. Además, con base en el análisis estructural, los Trp440 y Trp454 podrían estar parcialmente expuestos en el complejo (NFS1/ACP-ISD11)₂ debido a una mayor flexibilidad y presumiblemente una mayor movilidad del CTS en ausencia de la FXN).

Las variantes exhibieron características similares de emisión de triptófano y todas ellas mostraron espectros de CD en el UV lejano (190-240 nm) similares (intensidades de señal y forma de los espectros, **Figuras 5.6.C-D**), compatibles con un core estructurado con estructura secundaria similar. Sin embargo, cuatro de las variantes (C158A, I552A, W454A y GGG) mostraron una señal de CD ligeramente inferior (tanto

a 208 como a 220nm), resultado quizá compatible con un ligero aumento del desorden y movimientos incrementados y, eventualmente, una sutil pérdida de estructura secundaria de tipo alfa hélice. El espectro correspondiente a la variante GGG se truncó en valores de longitud de onda inferiores a 215 nm debido a un notable incremento del cociente señal/ruido.

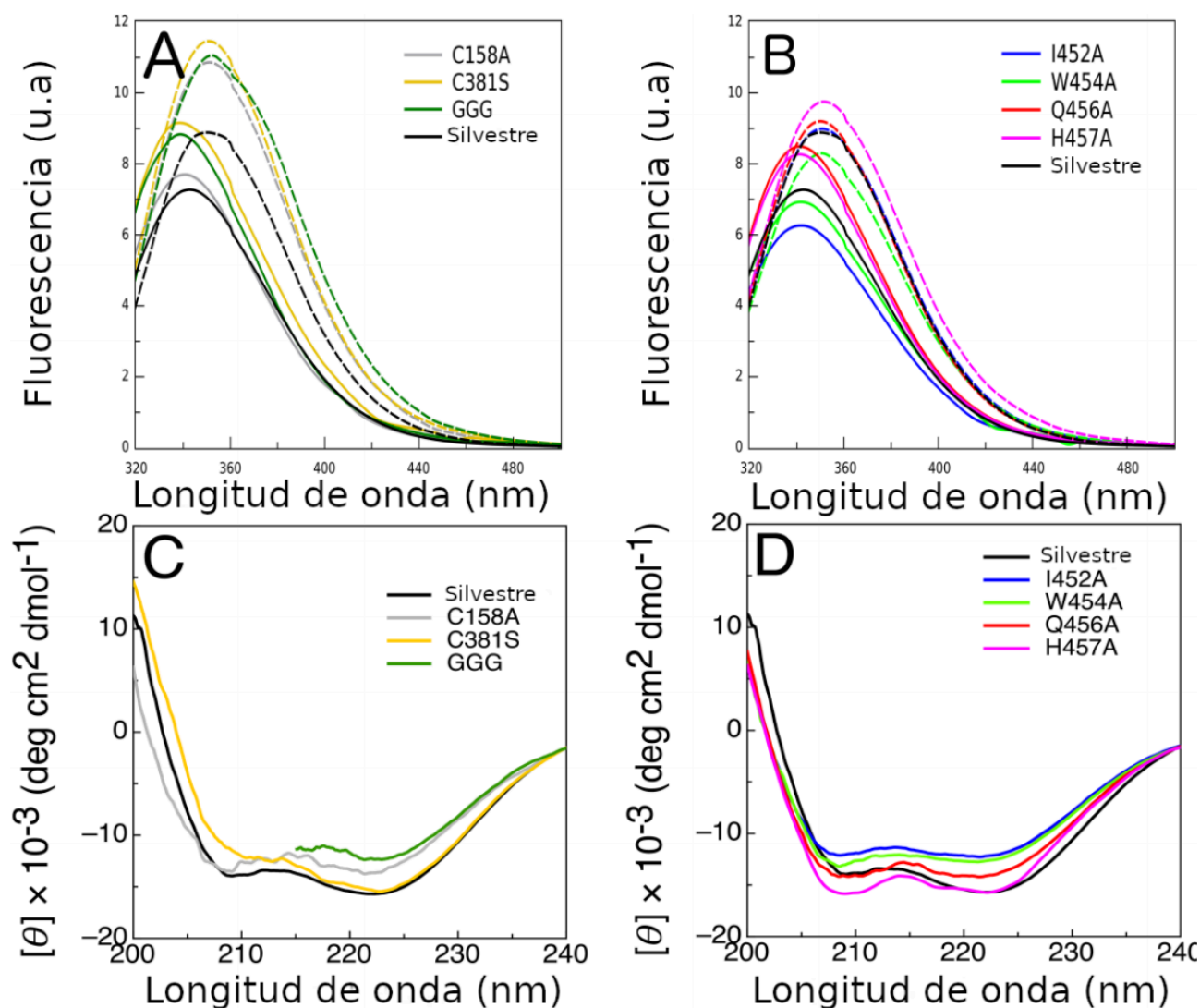


Figura 5.6. Caracterización espectroscópica de las variantes principales de NFS1/ACP-ISD11. Espectros de fluorescencia de triptófano de las variantes correspondientes a (NFS1/ACP-ISD11)₂ de (A) variantes C158A, C381S y GGG, y (B) correspondientes a (NFS1/ACP-ISD11)₂ de variantes CTS. La excitación se llevó a cabo a 295 nm. El buffer fue Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, a pH 7.5, en ausencia (línea continua) o presencia (línea discontinua) de urea 8,0 M. Espectros de CD Far-UV correspondientes a (NFS1/ACP-ISD11)₂ de las variantes (C) C158A, C381S y GGG y (D) a (NFS1/ACP-ISD11)₂ de las variantes CTS NFS1.

Adicionalmente llevamos adelante un “control de calidad” adicional para cada variante producida con el objetivo de constatar la cantidad de PLP con la que se purifican. Realizamos un tratamiento con ácido clorhídrico 50 mM para separar al PLP

de la proteína (en estas condiciones las proteínas precipitan y la unión covalente PLP-Lys se rompe (base de Schiff); luego de una centrifugación a máxima velocidad el sobrenadante se sometió a un análisis por HPLC en fase reversa usando una columna C18. Por otro lado, hicimos espectros de absorbancia en condiciones nativas evaluando el pico de absorbancia propio del PLP unido al complejo que se encuentra a 420 nm. A partir de estas dos aproximaciones pudimos constatar que todas las variantes son capaces de unir el PLP aunque detectamos cierta variabilidad entre ellas, en promedio cada variante cuenta con $0.98 \pm 0,16$ de PLP por molécula de NFS1.

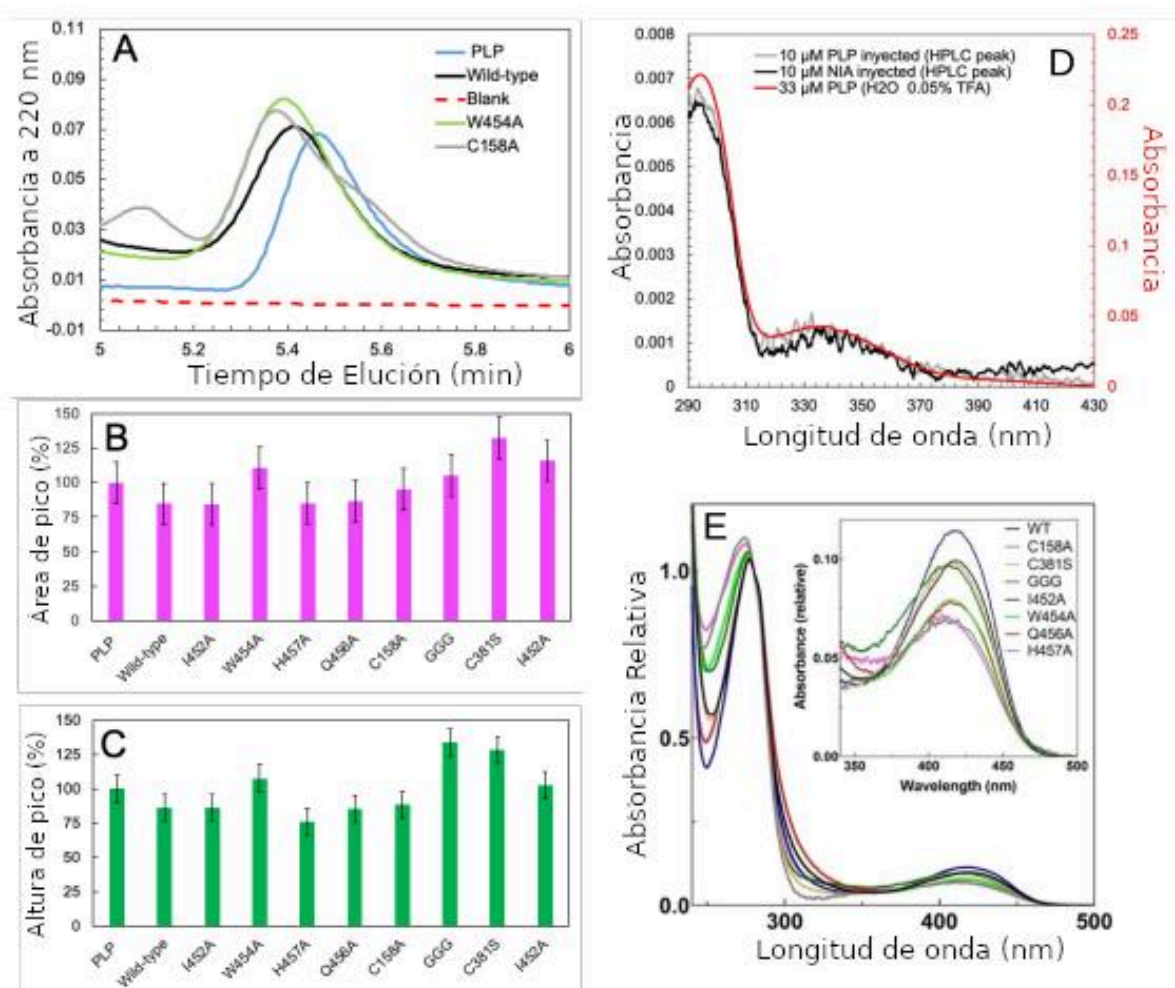


Figura 5.7. Cuantificación de PLP en muestras de proteína NFS1/ACP-ISD11 por HPLC. (A) Perfiles de HPLC correspondientes a PLP como estándar (se cargó un volumen de 100 μ L de 7.0 μ M PLP y se preparó la muestra en condiciones similares de *buffer* y concentración de HCl), y perfiles correspondientes a las extracciones de muestras de la variante silvestre, W454A y C158A. (B) El área del pico correspondiente al PLP. (C) Se muestra la altura del pico correspondiente a PLP, para cada variante. En promedio, las variantes de NFS1 contenían $0,98 \pm 0,16$ moléculas de PLP por subunidad de NFS1. La FXN se incluyó como referencia. La desviación estándar entre muestras para cada variante fue inferior al 15% y 10% para área y altura, respectivamente. (D) Espectros UV-VIS de picos de HPLC recuperados (tiempos de elución 5.2-5.8 min) para una inyección de 100 μ L de 10 μ M PLP (gris, eje izquierdo) o una inyección de 100 μ L de 10 μ M NIA (negro, eje izquierdo)) tras un tratamiento ácido de la muestra (HCl 0.05 M, 10 min). Como control también se muestra el espectro correspondiente a 33 μ M PLP preparado en H₂O, 0.05% TFA (rojo, ejes derecho). (E) Espectros UV-VIS de complejos NFS1/ACP-ISD11. Para mayor claridad, todos los espectros se relativizan a una absorbancia de 280 = 1. El recuadro muestra un detalle del Pico a 420 nm de PLP. El *buffer* fue Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, DTT 1 mM, pH 8.0. En todos los casos se restó el espectro correspondiente al *buffer*.

5.3.3. La actividad de las Variantes de cisteína desulfurasa NFS1

Convenientemente, la detección de L-Ala basada en RMN también se puede utilizar como método de determinación en tiempo fijo. Los límites de detección para mediciones confiables fueron 20 y 12 μ M, para espectrómetros de 300 y 500 MHz, respectivamente.

La actividad medida por el método de azul de metileno se correlacionó muy bien con las medidas por RMN (**Figura 5.8**). Esto nos permite investigar el efecto de mutaciones específicas sobre la actividad desulfurasa. Mientras que para el método del azul de metileno las reacciones se detuvieron después de 40 min, la producción relativa de L-Ala para diferentes variantes de NFS1 se midió después de una reacción de 120 min y se detuvo calentando las muestras de reacción durante 5 min a 98°C. Además, las actividades de las variantes también se investigaron mediante el método del azul de metileno (**Figuras 5.8.A y C**).

La mutación de Trp454 exhibió el mayor efecto entre las mutaciones de CTS estudiadas. Este residuo, como mencionamos anteriormente, interactúa con residuos de ISCU (Ala66 y Pro67) y establece interacciones clave con otros residuos de la subunidad NFS1 (Ile452 y Leu449) que pueden conferir una característica más estructurada a un CTS.

Por su parte, la mutación del residuo Cys381 de NFS1 dio como resultado un super complejo inactivo (**Figuras 5.8. A y B**). A su vez, la mutación del residuo Cys158 que está muy cerca del grupo PLP, dió como resultado un aumento significativo y poco intuitivo en la actividad. Esto sugiere un papel clave para Cys158 en la modulación de la catálisis. La alteración de la flexibilidad en el loop Cys esperada para la variante GGG no eliminó completamente la función de la proteína como lo hizo C381S; sin embargo, la actividad es muy reducida (**Figuras 5.8.A y C**).

A juzgar por las mediciones de tiempo fijo, las variantes de NFS1 que incorporan mutaciones que presumiblemente alteran las interacciones entre el segmento C-terminal de NFS1 con ISCU y FXN mostraron una actividad significativamente menor en comparación con la observada para la variante silvestre (**Figuras 5.8. C y D**). Esta activación reducida podría indicar la incapacidad de interactuar con FXN/ISCU de manera útil.

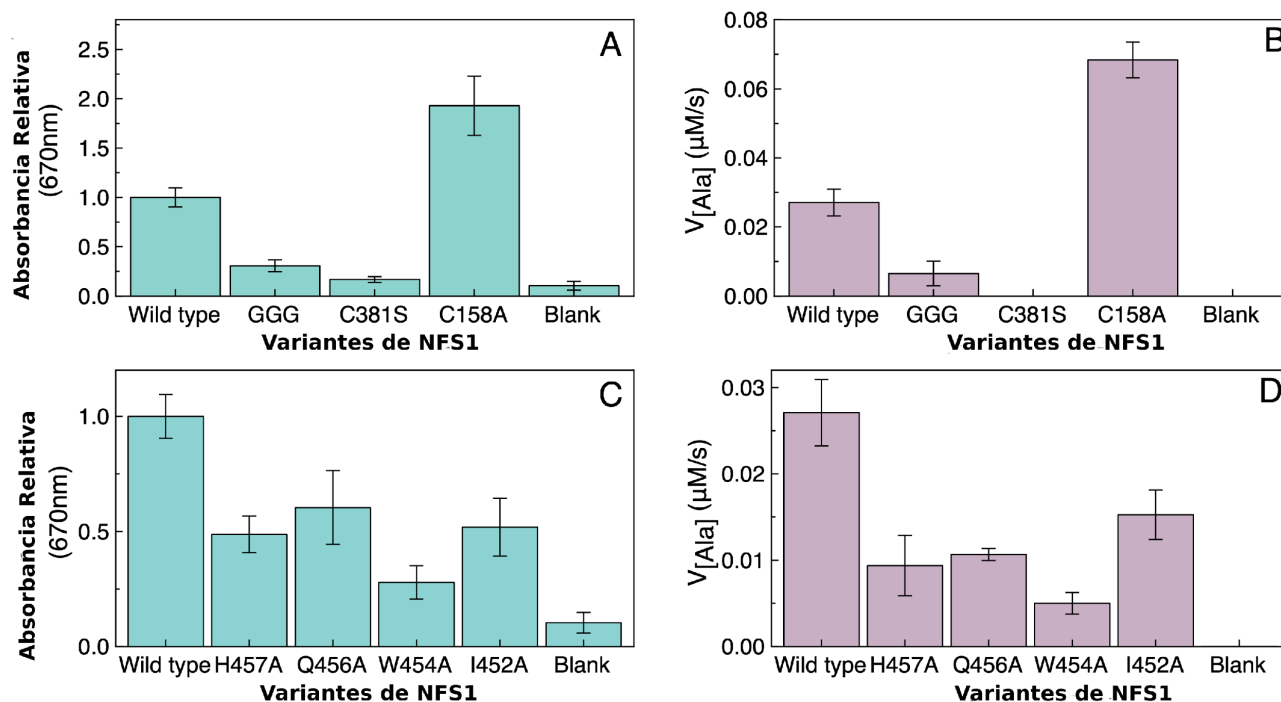


Figura 5.8. Mediciones de punto final por el método del azul de metileno y por RMN (500 MHz) de la actividad L - Cys de las variantes de NFS1. (A) variantes Cys NFS1 y (C) variantes CTS NFS1 monitoreadas por azul de metileno (punto final después de 40 min). Actividad medida por ^1H -RMN para las variantes de Cys NFS1 (D) y CTS NFS1 (D) (la reacción se detuvo después de 120 min). Las mediciones se realizaron en presencia de las proteínas ISCU y FXN y $(\text{NFS1/ACP-ISC11/ISCU/FXN})_2$. En todos los casos, los espectros de ^1H -RMN se adquirieron después de finalizar la reacción calentando a 95°C durante 10 min.

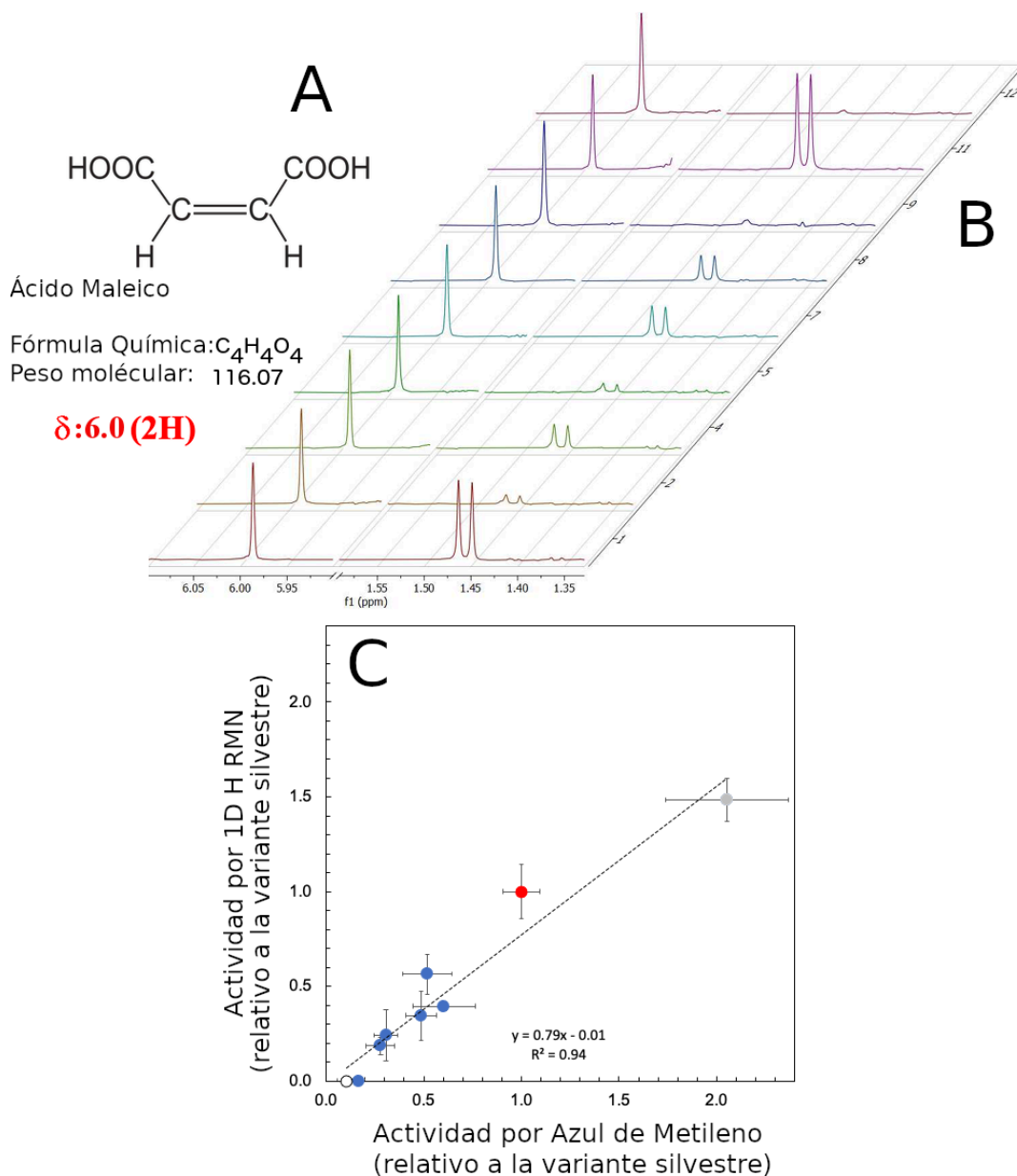


Figura 5.9. Mediciones de punto final por RMN (500 MHz) de la actividad desulfurasa de las variantes de NFS1. (A) Ácido maleico, el estándar interno utilizado en este trabajo para cuantificar L-Ala. (B) Secciones de los espectros de RMN que muestran las intensidades máximas correspondientes al producto de reacción L-Ala (1,45 ppm, derecha) en presencia de variantes de NFS1 (1): tipo salvaje, (2): H457A, (3): Q456A, (4): W454A, (5): I452A, (6): GGG, (7): C381S, (8): C158A o (9): sin NFS1 y el estándar de ácido málico (6,00 ppm, izquierda). (C) Correlación entre el método de azul de metileno y la detección de L-Ala por 1H -RMN 1. En azul se muestran los valores correspondientes a las variantes excluyendo el mutante C158A, en rojo NFS1 silvestre y en gris la variante C158A. El círculo vacío corresponde al blanco, el *buffer* de reacción y los sustratos sin proteínas.

Un punto muy importante es que todas las variantes con excepción de GGG parecerían interaccionar con ISCU2. Para verificarlo aprovechamos el hecho de que la actividad enzimática del core NIA disminuye por el agregado de ISCU2 en ausencia de FXN (**Figura 5.10**).

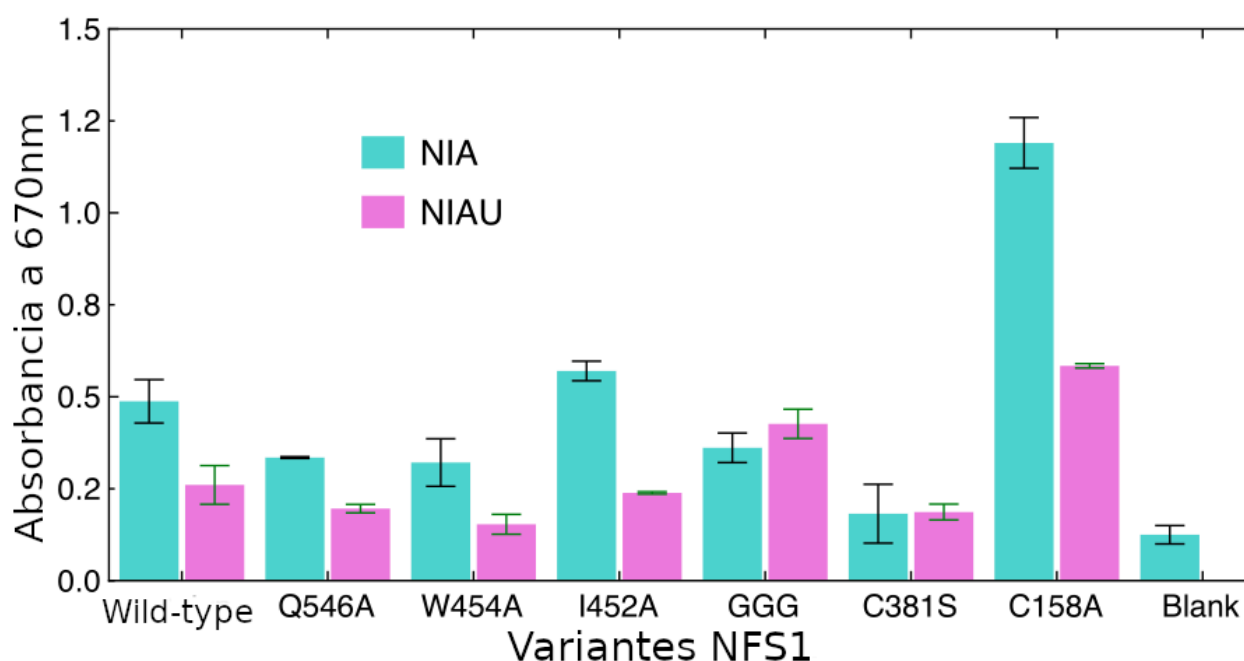


Figura 5.10. Mediciones de actividad desulfurasa a punto final seguidas por el método del azul de metileno para las variantes de NFS1 en ausencia de FXN. Se midió la actividad enzimática desulfurasa de cada variante NFS1 en ausencia de FXN. Por un lado el complejo en su configuración NIA (en ausencia de ISCU2 y en ausencia de FXN) y por el otro en su configuración NIAU (solo en ausencia de FXN). Se confirma el efecto inhibitorio de ISCU2 para cada una de las variantes.

Con el objetivo de indagar sobre el comportamiento de la variante C158A, llevamos adelante ensayos cinéticos usando al agente reductor DTT como variable, dado que los antecedentes demuestran que en nuestro ensayo este paso limita la velocidad de la reacción. Se realizaron experimentos a tiempo fijo usando el método de azul de metileno y finalizando cada reacción a distintos tiempos, a la vez que estudiamos la reacción siguiéndola a tiempo real usando el nuevo método de seguimiento de L-Ala

por RMN. Para el experimento seguido en tiempo real por RMN ambas variantes mantuvieron un comportamiento perfectamente lineal, pero en el experimento seguido por azul de metileno a tiempo fijo, se observó un comportamiento lineal para la variante silvestre del super complejo (NIAUF) mientras que para la variante C158A, la linealidad se desvaneció sobre 1-2 mM de DTT (**Figura 5.11.A y B**). Las razones técnicas/bioquímicas de este comportamiento no se entienden completamente; sin embargo, no podemos descartar diferentes mecanismos de reacción para la reducción de persulfuro.

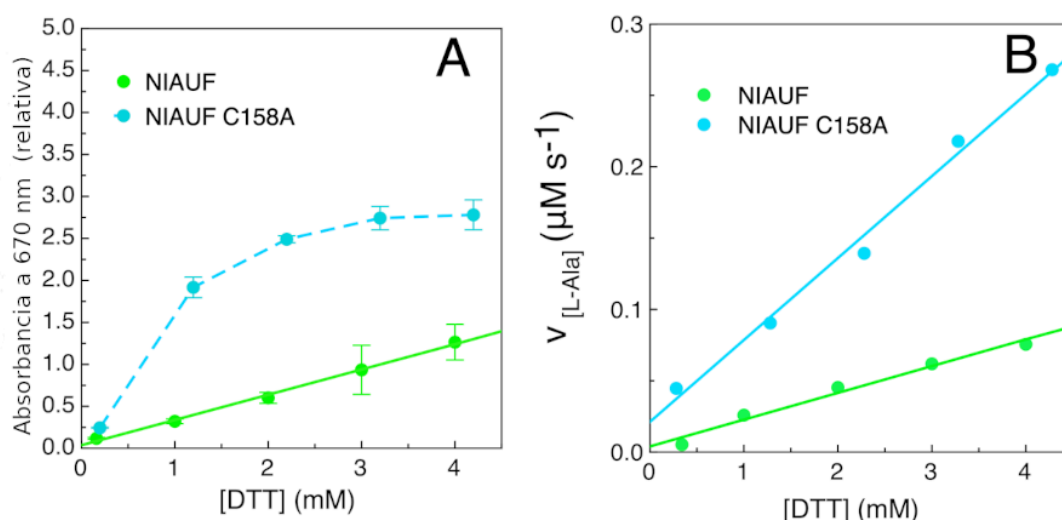


Figura 5.11. Actividad de L-Cys desulfurasa en función de la concentración de DTT monitoreada por el método del azul de metileno o RMN. (A) La concentración de L-Cys fue de 0,5 mM. (A) La producción de H_2S se controló como una reacción de tiempo fijo. La linealidad se perdió consistentemente sobre DTT 2,5 mM para la variante C158A. (B) La producción de L-Ala fue monitoreada por RMN. La reacción se llevó a cabo para C158A (cian) o variante de NFS1 de tipo salvaje. Se ajustó una regresión lineal a los datos experimentales de RMN en el panel B para el tipo salvaje (verde, pendiente = $0,019 \pm 0,002$) y la variante C158A (cian, pendiente = $0,06 \pm 0,002$).

5.4.Discusión

En este capítulo hemos evaluado el papel del CTS de NFS1 en la consolidación de la estructura y función del súper complejo. Hemos encontrado que las interacciones establecidas por este segmento de NFS1 son importantes para la función.

Identificamos residuos localizados en este corto tramo que son esenciales para la actividad del súper complejo de biosíntesis de centros Fe-S. Cabe destacar que el CTS establece interacciones con ISCU2 y con FXN simultáneamente.

Algunas de las mutantes de CTS se obtuvieron con niveles de expresión muy bajos, por lo que no descartamos que este tramo tenga un papel en la estabilidad de la proteína y de ser así podría ser una región importante para la interacción de pequeños ligandos que puedan alterar conformación y actividad.

Los residuos Ile452, Trp454 e His457 están muy conservados entre homólogos de NFS1. En la posición 454, el 100% de las secuencias recuperadas presentan Trp (**Figura 5.12**), lo que sugiere una relevancia de este residuo en esta posición, en concordancia con el rol funcional/estructural encontrado en este trabajo: la variante W454A exhibió una actividad enzimática significativamente disminuida.

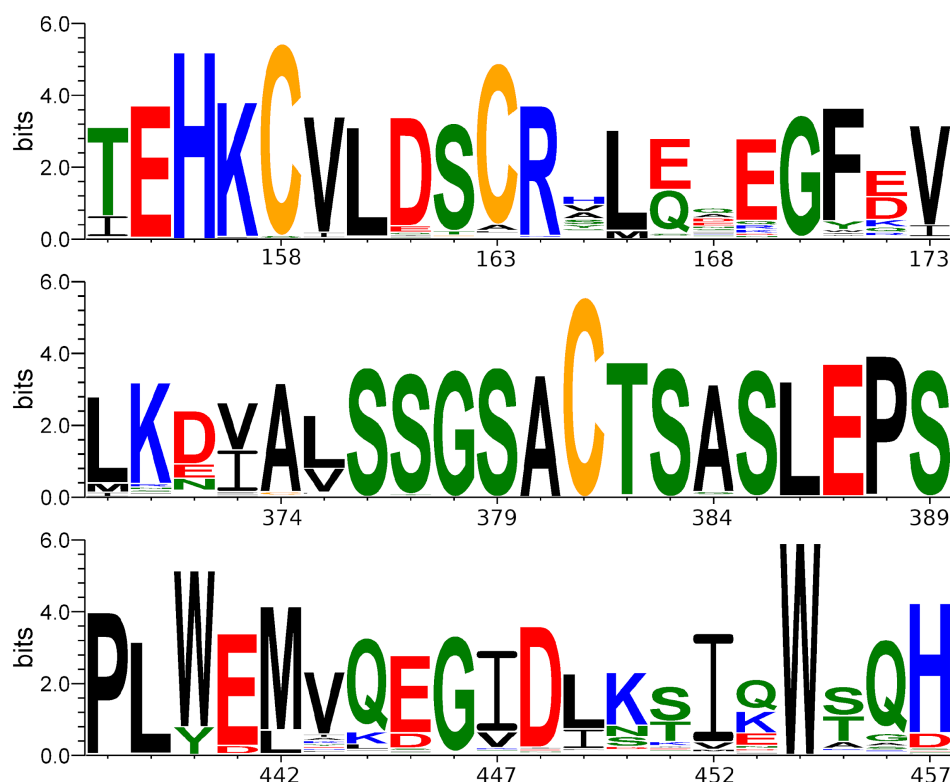


Figura 5.12. Análisis de secuencia NFS1. Logo de secuencia representado con Weblogo (Crooks et al., s. f.) de segmentos de secuencia de aminoácidos NFS1 que incluyen el motivo HXCXXXC (superior), el bucle Cys - (medio) o el tramo C-terminal (inferior). El análisis de secuencias múltiples (MSA) se construyó utilizando MAFFT (Kato et al. 2019) utilizando 133 secuencias NFS1 de organismos eucariotas con una amplia distribución filogenética.

Como ya comentamos anteriormente, la secuencia de aminoácidos del CTS también se conserva entre las proteínas NFS1 humana y la variante de levadura. Trabajos previos de otros grupos mostraron que cuando se muta al CTS de la NFS1 de levadura (S491P o I492T, Ser491 e Ile492 en levadura corresponden a Ser451 e Ile452, respectivamente), fallan las tareas de reparación del ADN (Yip et al. 2021). Curiosamente, la sobreexpresión de ISCU de levadura suprimió la sensibilidad al daño del ADN generada por estas mutaciones, lo que sugiere que la alteración de la secuencia CTS en estas posiciones, probablemente distorsione la interacción

NFS1/ISCU y en consecuencia el ensamblado el super complejo (Yip et al. 2021). La menor actividad enzimática encontrada para las variantes de CTS estudiadas en nuestro trabajo concuerda con estas evidencias.

Por otro lado, el método simple que ideamos facilita el seguimiento en tiempo real de la reacción de L-Cys desulfurasa, siguiendo la producción de L-Ala. Esta metodología también nos permite el estudio de la reacción mediante un ensayo sencillo de tiempo fijo, en el que se detiene la reacción calentando la muestra (desplegando y precipitando las proteínas por agregación). El método nuevo se utilizó de forma complementaria con la detección de H_2S .

Dado que L-Ala es un producto estable, nos da varias ventajas sobre el H_2S . La adición de un estándar (por ejemplo: ácido maleico) en el tubo de reacción nos permitió utilizar esta metodología de forma perfectamente cuantitativa. Además, el monitoreo de L-Ala hizo posible la determinación de los valores de K_m aparente a partir de las curvas de sustrato. La K_m aparente en presencia de FXN fue menor que lo observado previamente por otros grupos, lo que concuerda con la noción de que la FXN es un modulador cinético positivo para la reacción.

Cabe destacar que el incremento excesivo de la flexibilidad en el bucle Cys resultó en una enzima virtualmente inactiva, este fue el caso de la variante GGG. Se realizarán más experimentos para explorar si hemos eliminado interacciones clave específicas o, por otro lado, es un efecto inespecífico. También es cierto que en esta variante hemos insertado un residuo de Gly extra alterando no solo la flexibilidad de la cadena principal sino también la longitud de este bucle. Cabe destacar que este bucle es esencial para la actividad, ya que posee a la Cys381 que demostró ser indispensable para la reacción

de desulfuración de cisteína, y juega un papel adicional e igualmente importante en el proceso de transferencia del persulfuro a su destino en el sitio activo de ISCU (**Figura 5.8**). En ese sentido, FXN parece modular la reacción en parte a través de interacciones en esta zona de NFS1.

Por último, proponemos algunas ideas con respecto al inesperado aumento en la actividad de la variante C158A y al rol que este residuo podría cumplir. Los residuos de Cys158 y Cys163 se encuentran dentro de un motivo HXCXXXXC, que está muy conservado en los ortólogos de NFS1 de Eukarya (**Figura 5.12**). Un alineamiento múltiple construido con secuencias NFS1 de 133 organismos con una amplia distribución filogenética mostró que el residuo His en la posición 156 y Cys en las posiciones 158 y 163 están presentes en el 100, 98 y 92% de las secuencias. Solo dos de las 133 secuencias tienen otro residuo en la posición 158, específicamente serina.

A excepción del residuo His156, el resto del motivo está dispuesto en una conformación alfa-helicoidal. Cuando realizamos una búsqueda estructural de este motivo en otras proteínas del PDB, lo encontramos en la proteína no relacionada NLRP9 del inflammasoma (**Figura 5.14**), en las proximidades de una molécula de ADP unida y a 7.2 Å de distancia del equivalente a Cys158.

Hasta donde sabemos, no hay información sobre la participación funcional de este motivo ni en NLRP9 ni en NFS1. Repetimos la búsqueda estructural pero usando una versión más resumida de este motivo, incluyendo solo los residuos de Cys en el patrón CXXXXC. A partir de esta búsqueda, notamos que varias de las proteínas recuperadas contenían grupos prostéticos como NAD o NADP ubicados en la vecindad de los residuos de cisteína (en el rango de 3.6-7.0 Å de Cys158, **Figura 5.15**).

Algunas peroxirredoxinas también contienen el motivo Cys (**Figura 5.16**). Estas proteínas participan en la reducción del peróxido de hidrógeno mediante el uso de una cisteína “peroxidativa” y, para muchos miembros de esta familia, un segundo residuo de cisteína llamada de resolución o “resolutiva”, que forma un puente disulfuro con la primera como paso final de el ciclo catalítico. Ambos residuos de cisteína conforman el motivo CXXXXC en la conformación helicoidal (estado completamente plegado), y experimentan una transición conformacional de desplegado local sin que por ello se desorganice el resto de la macromolécula que conduce al estado “localmente desplegado” antes de la formación del puente disulfuro entre residuos de Cys. En resumen, el incremento en la actividad de L-Cys desulfurasa de la variante C158A, junto con la participación de Cys158 en el motivo CXXXXC altamente conservado en los ortólogos de NFS1, y junto con su observación en otras estructuras, nos impulsa a proponer un papel funcional y regulatorio para estos residuos de cisteína y el His156 conservado, que está a la distancia de van der Waals de PLP, lo que sugiere una acción moduladora sobre la actividad de L-the Cys desulfurasa NFS1.

Asimismo, los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos en función de DTT expuestos en este capítulo, nos invitan a pensar que la variante C158A tiene un mecanismo de reacción que es distinto al de la variante silvestre (**Figura 5.11**).

En la **Figura 5.13** se exponen algunos de los aspectos moleculares que podrían estar en juego para explicar el comportamiento de pérdida de linealidad de la velocidad inicial en el método de punto final por azul de metileno. Esencialmente proponemos que la variante tiene una alteración conformacional en el sitio activo, que lo hace más accesible al solvente y por consiguiente al DTT. Este acceso adicional del DTT al sitio

activo genera no solo una aceleración global de la reacción sino también la posibilidad de reacciones paralelas con formas intermediarias de reacción y nuevas moléculas de DTT. El resultado es la generación de especies que no son detectables por el método del azul de metileno y que aparecen sólo a partir de cierta concentración umbral del DTT. Este artefacto no es observable en las mediciones en tiempo real llevadas adelante siguiendo la aparición de L-Ala en los espectros de RMN. En este sentido, pensamos que el nuevo método de detección de L-Ala para monitorizar la actividad de NFS1 por RMN nos ayudará a acercarnos a una mejor comprensión de las relaciones dinámica-función.

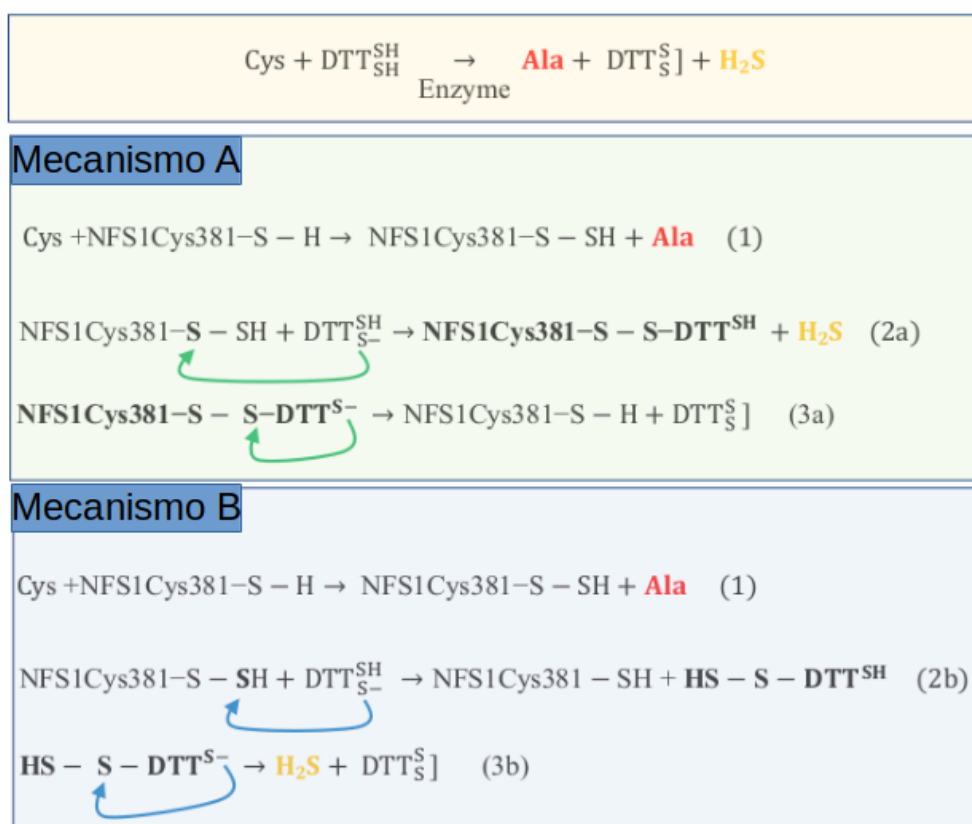


Figura 5.13. Esquema propuesto para los mecanismos puestos en juego en el incremento de velocidad de la variante de NFS1 C158A. La reacción puede ser compleja. Las reacciones 1-3a están acopladas porque para el siguiente ciclo catalítico la enzima necesita un tiol libre en Cys381. La reacción 3b no depende de la concentración de DTT y el producto es H₂S.

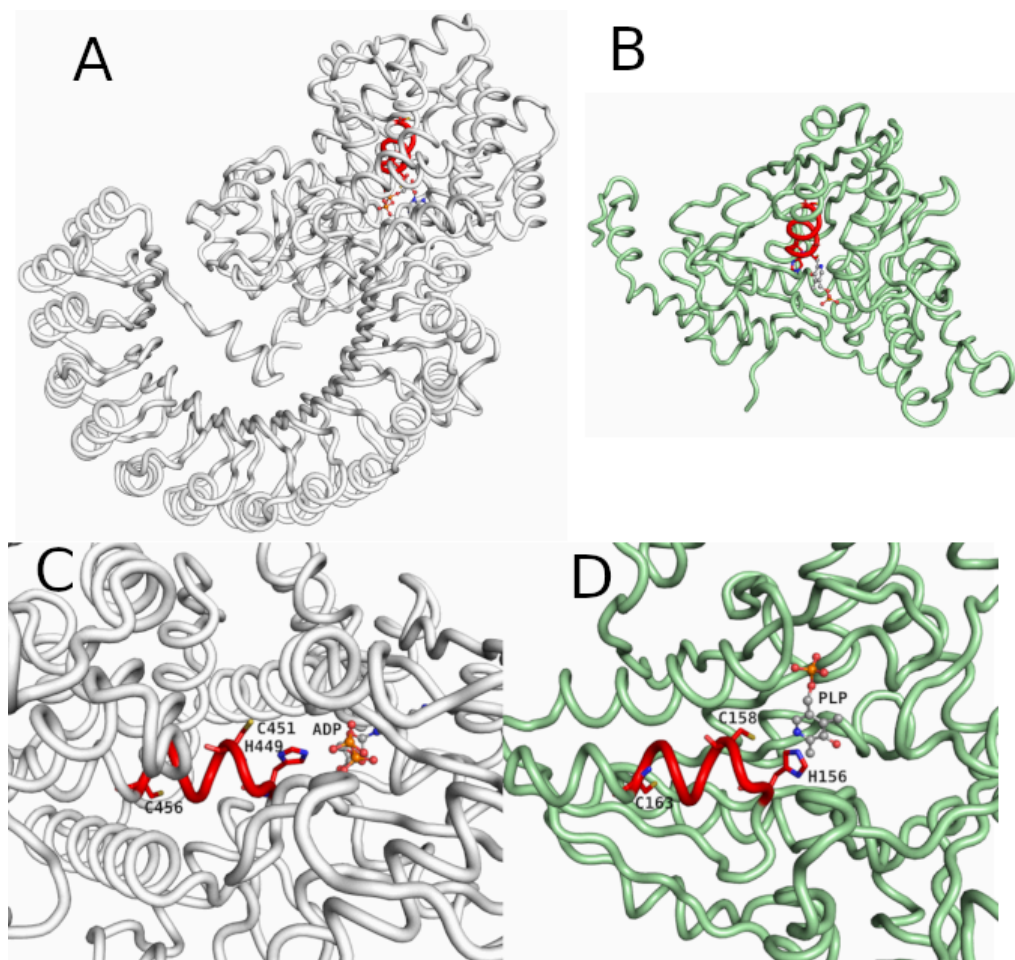


Figura 5.14. El motivo HXCXXXXC en la proteína no relacionada NLRP9. (A) Estructura de rayos X del receptor bovino NLRP9 (PDB ID: 7WBT). (B) Estructura de rayos X del monómero NFS1 humano del complejo con ISCU humano, ISD11 y *E. coli* ACP (PDB ID: 5WKP). La escala en ambas representaciones es la misma para facilitar la comparación. (C) y (D) Detalle del motivo HXCXXXXC en NLRP9 y NFS1, respectivamente. El segmento helicoidal que contiene el motivo se muestra en rojo, con los residuos His y Cys etiquetados y mostrados como barras. Los ligandos (ADP para NLRP9 y PLP para NFS1) se muestran como bolas y palos.

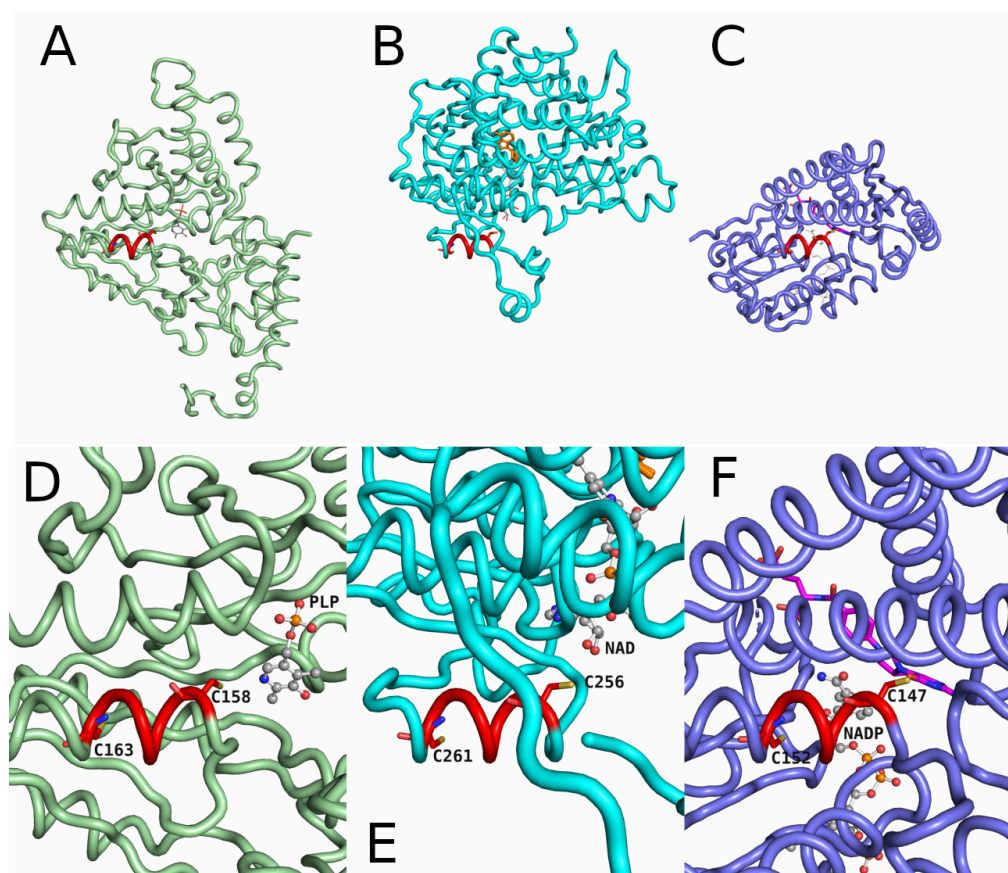


Figura 5.15. El motivo CXXXXC en otras proteínas no relacionadas. (A) Estructura de rayos X del monómero NFS1 humano del complejo con ISCU2 humano, ISD11 y *E. coli* ACP (PDB ID: 5WKP). (B) Estructura de rayos X de la enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 6F3N). (C) Estructura de rayos X de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa/ ciclohidrolasa humana (PDB ID: 6ECQ). La escala en las tres representaciones es la misma para facilitar la comparación. (D), (E) y (F) Detalle del motivo CXXXXC en NFS1, S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y metilentetrahidrofolato deshidrogenasa/ ciclohidrolasa, respectivamente. El segmento helicoidal que contiene el motivo se muestra en rojo, con los residuos de Cys etiquetados y mostrados como barras. Los ligandos PLP, NAD y NADP se muestran como esferas y barras, mientras que la adenosina (en el panel E) y el inhibidor LY345899 (en el panel F) se muestran como barras de color naranja y magenta, respectivamente.

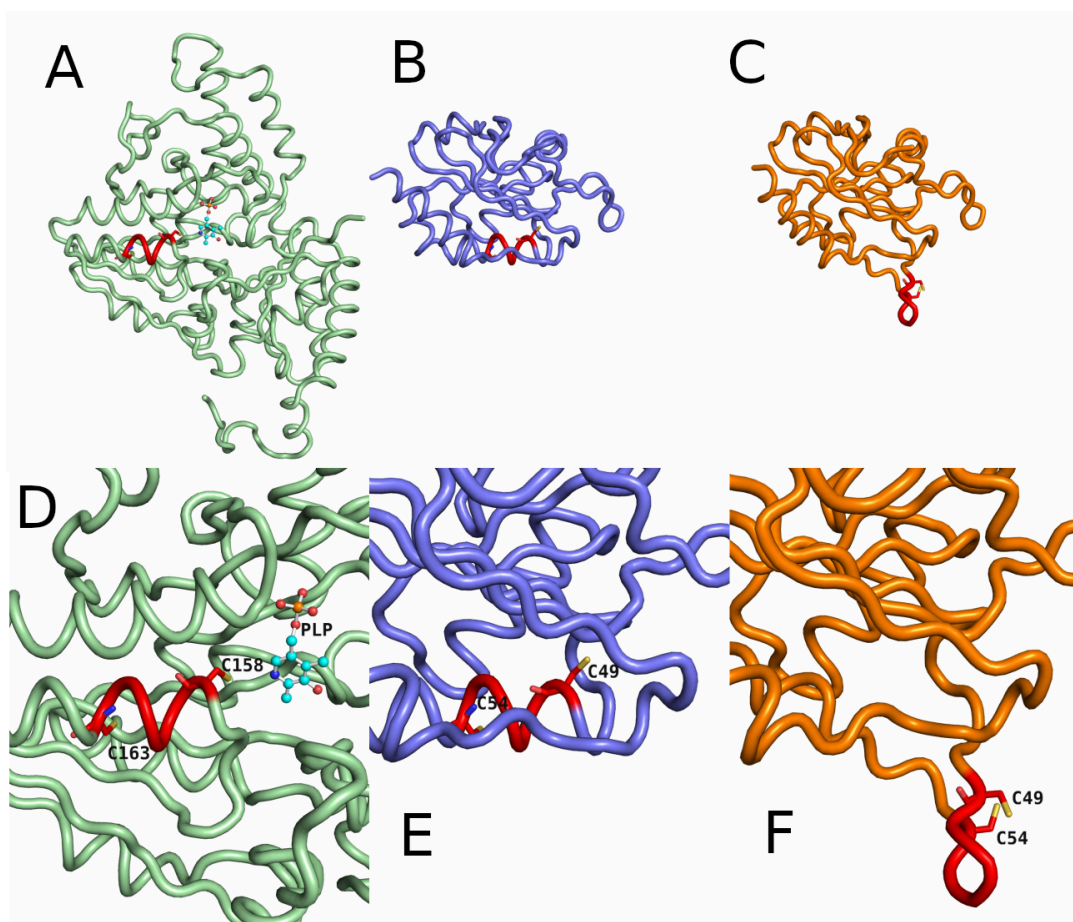


Figura 5.16. El motivo CXXXCC en la peroxirredoxina. (A) Estructura de rayos X del monómero NFS1 humano del complejo con ISCU2 humano, ISD11 y *E. coli* ACP (PDB ID: 5WKP). (B) Estructura de rayos X de la proteína co-migratoria peroxirredoxina de bacterioferritina del *Aeropyrum pernix* K1 en la conformación completamente plegada (PDB ID: 2CX4). (C) Otra molécula del mismo cristal que en (B) pero en la conformación localmente desplegada. La escala en las tres representaciones es la misma para facilitar la comparación. (D), (E) y (F) Detalle del motivo CXXXXC en Nfs1 y peroxirredoxina en conformaciones completamente plegadas o localmente desplegadas, respectivamente. El segmento helicoidal que contiene el motivo se muestra en rojo, con los residuos de Cys etiquetados y mostrados como barras. El ligando PLP se muestra como bolas y palos.



Estudiaba el comportamiento extraordinario del mate, la respiración de la yerba fragantemente levantada por el agua y que con la succión baja hasta posarse sobre sí misma, perdido todo brillo y todo perfume a menos que un chorrito de agua la estimule de nuevo, pulmón argentino de repuesto para solitarios y tristes.
Julio Cortázar, Rayuela.

Capítulo 6: Conclusiones y Discusión General

A lo largo de este trabajo de Tesis se han obtenido resultados relevantes alineados con los objetivos inicialmente planteados. Se ha confirmado la relevancia estructural del heterodímero ACP-ISD11 dentro del sistema desulfurasa, esencial para la síntesis de centros ferrosulfurados. Se demostró su estabilidad conformacional intrínseca a través de simulaciones computacionales de dinámica molecular clásica. Así también, mediante experimentos de actividad y estabilidad se estableció que el hetero dímero ACP-ISD11 induce el correcto plegado de la L-Cys desulfurasa NFS1 para constituir una nueva entidad estructural estable, soluble y catalíticamente activa; un subcomplejo $(\text{NFS1/ACP-ISD11})_2$ (o simplemente NIA) (Capítulo 3).

Por otro lado, las simulaciones computacionales de dinámica molecular clásica realizadas para el super complejo desulfurasa completo (decamérico) que incluye a FXN y a ISCU $(\text{NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN})_2$, mostraron que FXN actúa como un modulador conformacional de distintos miembros del mismo, específicamente NFS1 e ISCU2. Los movimientos internos de ambas proteínas disminuyeron en líneas generales al interactuar con FXN, aunque sobresalen en particular los efectos sobre la sección carboxilo terminal de NFS1 (llamada a lo largo de esta tesis CTS segmento por C-terminal, o en inglés C-terminal stretch). Puntualmente se observó que la presencia de FXN en el super complejo constituye un ancla conformacional para algunos aminoácidos de la sección C-terminal de NFS1. Como consecuencia estructural, algunos de esos residuos de aminoácidos forman parte de la zona de triple interfase NFS1-ISCU2-FXN, donde una parte relevante del ciclo catalítico llevado adelante por

este super complejo multienzimático tiene lugar. Este fenómeno estableció las bases para explorar la relevancia catalítica de estos aminoácidos .

Adicionalmente, se observa que el Trp155 de FXN tiene interacciones específicas y coordinadas con la His137 de ISCU2. Estos dos aminoácidos son de suma importancia para la actividad enzimática. La His137 ha sido propuesta por distintos grupos como responsable de la coordinación de metales (fundamentalmente Zn y Fe) en el sitio activo de ISCU2 (Gervason et al. 2019), mientras que la mutación del Trp 155 genera una variante que es patogénica de Ataxia de Friedreich y que no acelera la actividad desulfurasa in vitro (Espeche et al. 2022).

Las conclusiones que se desprenden de las simulaciones computacionales realizadas en esta tesis indican que la His137 tiene rotámeros permitidos que ocupan el sitio activo de ensamblado de centros Fe-S en la ISCU2 y que la selección de esos rotámeros está coordinada por los rotámeros que adopta el Trp155 de FXN. Podríamos entonces aventurarnos a imaginar un rol específico para el Trp155 en su relación con el sitio de ensamblado de centros Fe-S, y específicamente para la His137 de ISCU2 optimizando la geometría de coordinación (Capítulo 4).

En cuanto a la actividad enzimática del complejo Cys desulfurasa, en este trabajo de tesis se ha propuesto una nueva forma de medir la actividad enzimática usando espectros de $1D^H$ -RMN. Esta innovadora aproximación permite seguir el transcurso de la reacción en forma cuantitativa y en tiempo real, facilitando la determinación de parámetros cinéticos como una K_m aparente y V_{max} , así como análisis de velocidad inicial en función de la concentración de agentes reductores (en este caso

DTT). Pudo determinarse fehacientemente que la reducción del grupo RS-SH es el paso limitante de la velocidad de la reacción.

En paralelo, los resultados obtenidos en las simulaciones de la dinámica molecular en cuanto a la exploración de la relevancia de los aminoácidos pertenecientes a la sección C-terminal de NFS1 (CTS) nos permitieron postular la hipótesis de que estos residuos debían estar involucrados en la actividad del super complejo. Este punto es importante porque permitió poner al descubierto aspectos centrales de las relaciones entre estructura y función en este sistema complejo de proteínas.

Las distintas variantes de NFS1 con modificaciones en la CTS mostraron estar afectadas en distintos grados en su actividad L-Cys desulfurasa. Sin embargo, ciertos residuos como el Trp454 o la His457 (C-terminal) mostraron ser particularmente críticos: su reemplazo por Ala resultó en una disminución significativa de la actividad (observandol menos del 50% de la actividad de la variante silvestre). Además, estudiamos variantes con modificaciones en el loop catalítico, y una variante de Cys cercana al sitio activo PLP (Cys158). Los resultados permitieron corroborar que pequeños cambios introducidos tanto en la longitud como en la movilidad del loop catalítico tienen un fuerte impacto negativo en la actividad. También se confirmó el rol de la Cys381, hallado por otros grupos como residuo catalítico por excelencia del que depende toda la reacción enzimática. Curiosamente, la variante de la C158A exhibió una actividad significativamente mayor en la reacción de desulfuración de L-Cys. En una primera aproximación, creemos que la razón de este fenómeno podría deberse a una accesibilidad adicional del agente reductor al sitio activo, debido a perturbaciones

conformacionales locales. La idea es que estas perturbaciones podrían generar una mayor exposición del sitio activo al solvente y eso permitiría un encuentro más eficiente de los reactivos (R-S-SH y DTT_{red}), en un camino de reacción que si bien es más rápido, no es el fisiológico (Capítulo 5).

Por otra parte, Martinou y colaboradores han descubierto que la D-Cys es capaz de reaccionar con la base de Schiff para generar el primer intermediario de reacción en el sitio activo PLP, pero no puede transferir el tiol a la Cys 381. Entre las implicaciones mecanísticas que este hallazgo trae, sobresale el rol que tiene la orientación de los grupos reactantes en el seno del sitio activo PLP. (Martinou et al. 2023).

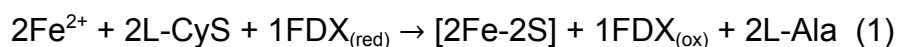
Todos estos resultados nos permiten proponer una serie de perspectivas a las cuales apuntar en el futuro cercano.

Por un lado, las simulaciones computacionales que incluyen iones metálicos en ISCU2 podrían darnos valiosa información conformacional fina de cómo se organizan los rotámeros en el contexto del sitio activo. Otras simulaciones computacionales clásicas que utilizan muestreos sesgados apoyados en la diversidad estructural que se ha ido acumulando, podría revelar el cambio conformacional del loop catalítico en detalle.

Será de importancia estudiar modulaciones conformacionales y dinámicas necesarias que podrían derivar de la presencia del persulfuro en el loop catalítico de NFS1. Todo esto permitirá comprender mejor el mecanismo fino de reacción de ensamblado de centros Fe-S. Queda también la evaluación de la capacidad de la variante C158A para ensamblar centros Fe-S, ya que si en esta actividad resulta también incrementada con respecto a la exhibida por la variante silvestre, estaríamos

frente a un hallazgo relevante y una nueva determinante para la reacción global

Es importante para nosotros reflexionar sobre los caminos de reacción que son posibles dada la evidencia acumulada en la bibliografía existente. En un estado inicial probable del sistema, ISCU2 estaría coordinando un átomo de Fe^{2+} en el sitio activo (Gervason et al. 2019). Una vez realizada la reacción de desulfuración, la Cys 381 de NFS1 pondría en contacto al persulfuro para transferirlo al sitio de ensamblado de ISCU2. El residuo propuesto como receptor en distintos trabajos es la Cys 138 de ISCU2 aunque otros como la Cys 69 serían también plausibles por su cercanía a la Cys381 de NFS1 que es quien transporta el sulfuro desde el sitio PLP. En líneas generales es posible plantear la reacción global:



En el centro $[2\text{Fe-2S}]$ generado, los estados de oxidación de los átomos de hierro son 2^+ y 3^+ . En ese sentido, es obligatorio que sucedan globalmente 2 reacciones redox correspondientes a la ruptura de 2 enlaces S-S, y en principio, uno de los electrones necesarios lo brindaría el Fe^{2+} unido a la ISCU2 en la condición inicial y el otro lo donaría la FDX2, posteriormente. Suponiendo que el ion Fe^{2+} en ISCU este coordinado formando un complejo de geometría tetraédrica, los ligandos probables serían los dos oxígenos del Asp 71, Cys 95, Cys 138 y la His 137 (Gervason et al. 2019) (**Figura 6.1**). Un camino razonable para la reacción con el enlace RS-SH es una adición oxidativa (AO).

Básicamente la AO consiste en que un complejo de 16 electrones, cuyo metal tenga un estado de oxidación relativamente bajo, interacciona con un enlace, en este caso el RS-SH, induciendo la ruptura del mismo a través de la oxidación del centro

metálico y la formación de dos enlaces nuevos. En ocasiones, reacciones de oxidación del centro metálico se llevan adelante generando a su paso radicales libres si la cantidad final de electrones no puede acomodarse de a pares.

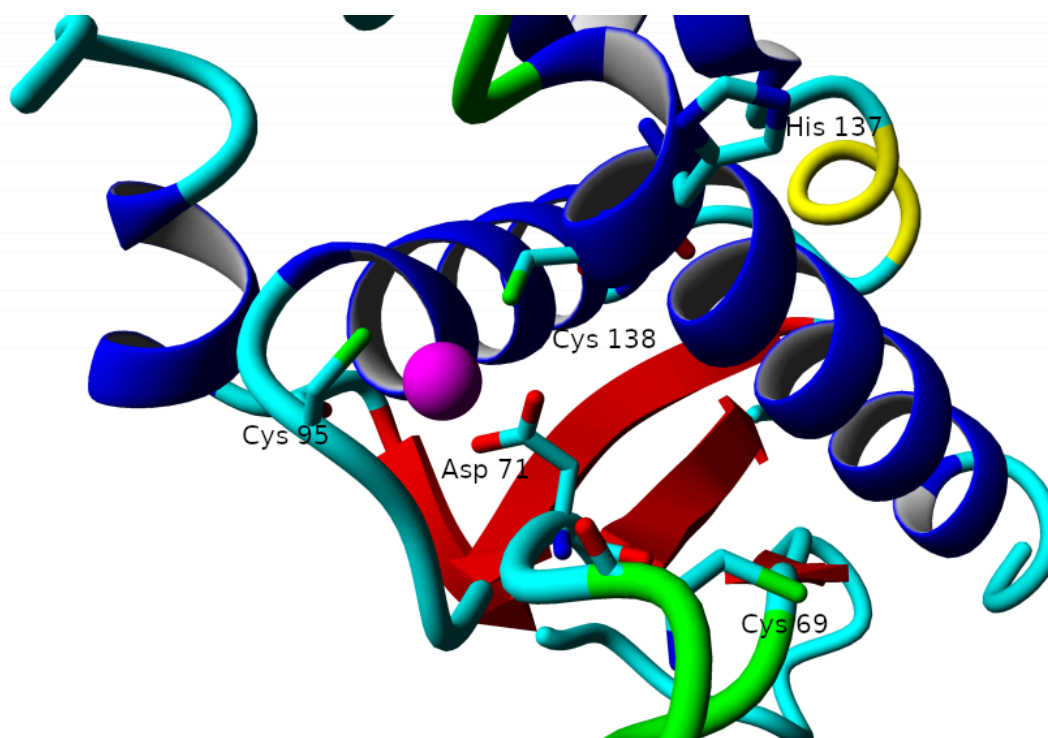


Figura 6.1. Complejo de coordinación de Zn^{2+} en la estructura de ISCU2. Se observa el complejo de Zn^{2+} en el contexto de ISCU2. La estructura elegida para la visualización es la del complejo que contiene FXN, PDB:6NZU. Se señalan los aminoácidos que forman parte del complejo de coordinación con Zn^{2+} en el contexto de esta estructura (Asp71, Cys95 y Cys138) y los que son probables candidatos a formar parte de un hipotético complejo de coordinación con el Fe^{2+} (Cys69 e His137).

En nuestro caso sería necesario que alguno de los ligandos iniciales se libere. Solo entonces el Fe^{2+} queda disponible para oxidarse y formar un enlace de coordinación nuevo. Al ceder un electrón, lleva adelante una reacción que genera un radical libre, de forma tal que el resultado de la reacción es la formación de un enlace

S-Fe^{3+} , liberando a su paso un radical libre del tipo Cys-S^{0*} .

En este escenario el radical libre recién generado podría ser neutralizado por FDX2. Sin embargo, en este trabajo de tesis nos gustaría proponer una posibilidad adicional. Se trata del Trp 155 de FXN, que se encuentra llamativamente cerca de este sitio activo. De hecho en la estructura PDB: 6NZU se puede ver que la distancia entre este Trp 155 de FXN y el Zn^{2+} (que vamos a asumir como el centro del sitio activo ISCU2) es de 7.2 Å (**Figura 6.2**). La propuesta puntualmente es que el Trp 155 de FXN podría oxidarse temporalmente para neutralizar el radical recientemente formado acomodando un radical en sus resonancias aromáticas. Ese evento le daría tiempo a la Cys 381 de NFS1 a realizar un nuevo ciclo de desulfuración en el sitio activo PLP y luego volver a transferir un nuevo persulfuro a la ISCU2 que ahora reaccionar adicionando al complejo de $17e^-$ recientemente formado. Esta puede ser una reacción de sustitución por ejemplo de tipo SN_2 (reacción de sustitución de ligandos por ataque nucleofílico al metal), dando como resultado un complejo de $17e^-$ con un ligando S^- y un ligando Cys381-S-S (**Figura 6.4**). Ahora, uno de los electrones en el enlace S-S^- recientemente fijado en la posición del metal puede dar el salto cuántico hacia el Trp que se encuentra deficiente de electrones. Al romperse el enlace S-S^- se genera un ligando S^- y un nuevo radical S^{0*} que en última instancia será neutralizado por FDX2.

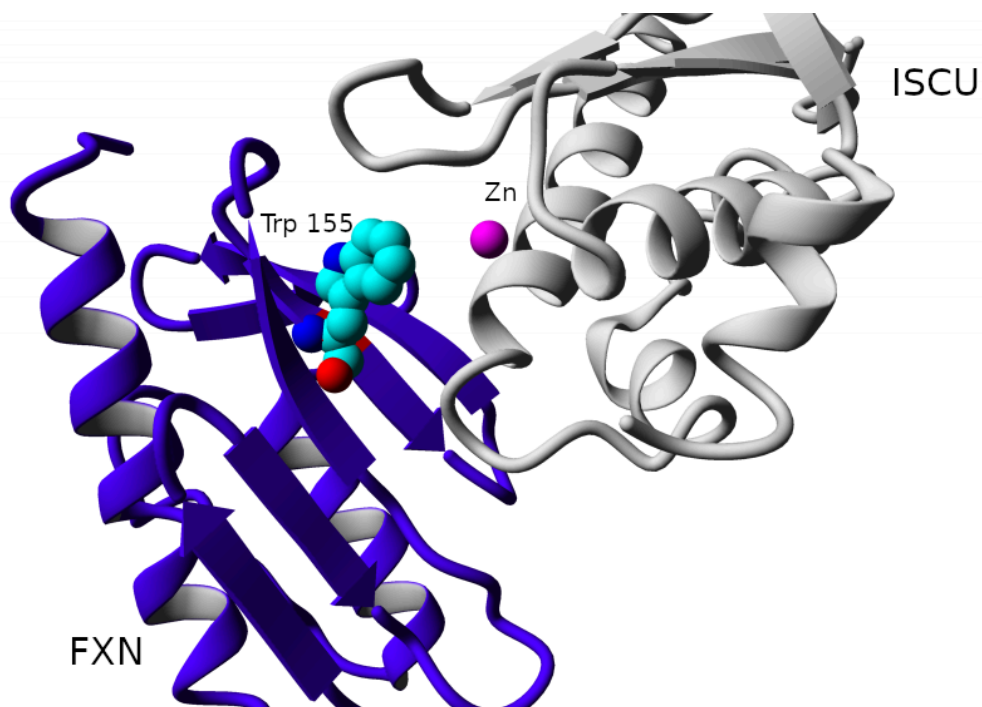


Figura 6.2. El Trp155 de FXN se encuentra ubicado en el sitio de ensamblaje de centros Fe-S. Imagen tomada de la estructura del complejo completo que contiene FXN (PDBID: 6NZU). La distancia entre el átomo de Zn y los átomos más cercanos del anillo aromático del Trp155 es de 7Å.

Los saltos cuánticos de electrones pueden darse en una gran variedad de distancias y dependen del contexto y la diferencia de potencial entre centros, de hecho existen ejemplos que pueden servirnos de referencia. Uno de ellos es el caso del Complejo I de la cadena respiratoria donde la distancia entre los centros Fe-S que transportan los electrones del módulo N al módulo Q y protagonizan la cadena de transporte, es de aproximadamente 14 Å (Read et al. 2021). Al mismo tiempo, el Trp 155 de FXN ha sido reportado como un sitio vulnerable a la oxidación por agentes radicalarios (Correia et al. 2009). Cuando la FXN fue sometida a agentes de estrés oxidativo, se observó por espectrometría de masa que el Trp 155 sufre modificaciones químicas, indicando su sensibilidad a oxidarse.

Estos hallazgos van en línea con la posibilidad estructural, por distancia y reactividad, de que sucedan las dos reacciones que proponemos y abriendo un abanico de posibles experimentos espectroscópicos y de espectrometría de masa para explorar el rol del Trp155 en la reacción. De hecho, en nuestro grupo ya nos encontramos discutiendo cuáles serían los experimentos más apropiados para confrontar estas hipótesis (**Figura 6.3**).

Por último nos queda proponer un camino para que pueda sumarse el segundo ion de Fe^{2+} . Este podría venir desde el solvente llegando al sitio activo o estar débilmente asociado a la FXN. En este sentido, nuestro grupo ha logrado determinar por RMN y mediante experimentos semicuantitativos, la existencia de interacciones entre Fe^{2+} y grupos ácidos (Asp/Glu, del “acidic ridge”, en la hélice alfa 1) de la superficie de la FXN. Igualmente se ha propuesto tanto por Gervason y colaboradores como por Freibert y colaboradores que ISCU puede dimerizar después de un ciclo de desulfuración para convertir dos complejos Fe-S en un $[\text{2Fe-2S}]$ a partir de un encuentro cara a cara desde la cara que une metales y centros Fe-S (Angerer et al. 2014; Freibert et al. 2021; Gervason et al. 2019). Esta hipótesis aún no ha sido experimentalmente corroborada, aunque sí se han observado formas diméricas y tetraméricas de ISCU2 in vitro, en el proceso de purificación y análisis conformacional de la proteína. Este mecanismo, por su parte, podría ser complejo ya que podría derivar en dímeros ISCU2:ISCU2 oxidados a través de enlaces disulfuros intermoleculares, difíciles de reducir en el ambiente mitocondrial, siendo la TRX2 quien podría tener un rol en esta reacción de reducción de los dímeros ISCU2 .

Podríamos congeniar estas ideas con la propuesta que hemos plasmado en esta

discusión, si el encuentro entre moléculas de ISCU2 ocurre entre una que ha participado de dos ciclos de desulfuración, y trae un complejo con dos ligandos S^- , con una que aunque no ha participado de ninguna reacción coordina un ión metálico Fe^{2+} . En el encuentro tendrían que generarse una serie de rearrreglos de coordinación que terminen con el traspaso del Fe^{2+} y la generación de enlaces puente que coordinen con los S^- (**Figura 6.4**).

Entre los experimentos que proponemos para poner a prueba estas hipótesis, incluimos reacciones en ausencia de reductores y en presencia de sondas de radicales libres. Teniendo en cuenta los antecedentes de Correia y colaboradores, que mostraron la posibilidad del Trp155 de la FXN a ser modificado como consecuencia de la oxidación por radicales libres, una pérdida de la capacidad moduladora en la generación de centros Fe-S como consecuencia de la oxidación o modificación del Trp155 sería indicador de su rol red-ox en la reacción. Aunque es cierto que el rol estructural de selección de rotámeros de residuos críticos del sitio de ensamblado de ISCU2 también se podría ver afectado por oxidaciones irreversibles de Trp155.

A la vez, si nuestra hipótesis es correcta, la reacción debería consumir un equivalente reductor por cada centro $[2Fe-2S]$ en presencia de FXN. En ausencia de FXN, sin embargo, al no establecerse esa estabilización del radical intermediario, este debería ser neutralizado por FDX2 a través de reacciones paralelas consumiendo más equivalentes reductores por ciclo. El estudio de la relación entre el consumo de equivalentes reductores (NADH en el contexto de esta reacción) y la generación de Fe-S podría dar alguna luz respecto de los mecanismos involucrados en la reacción.

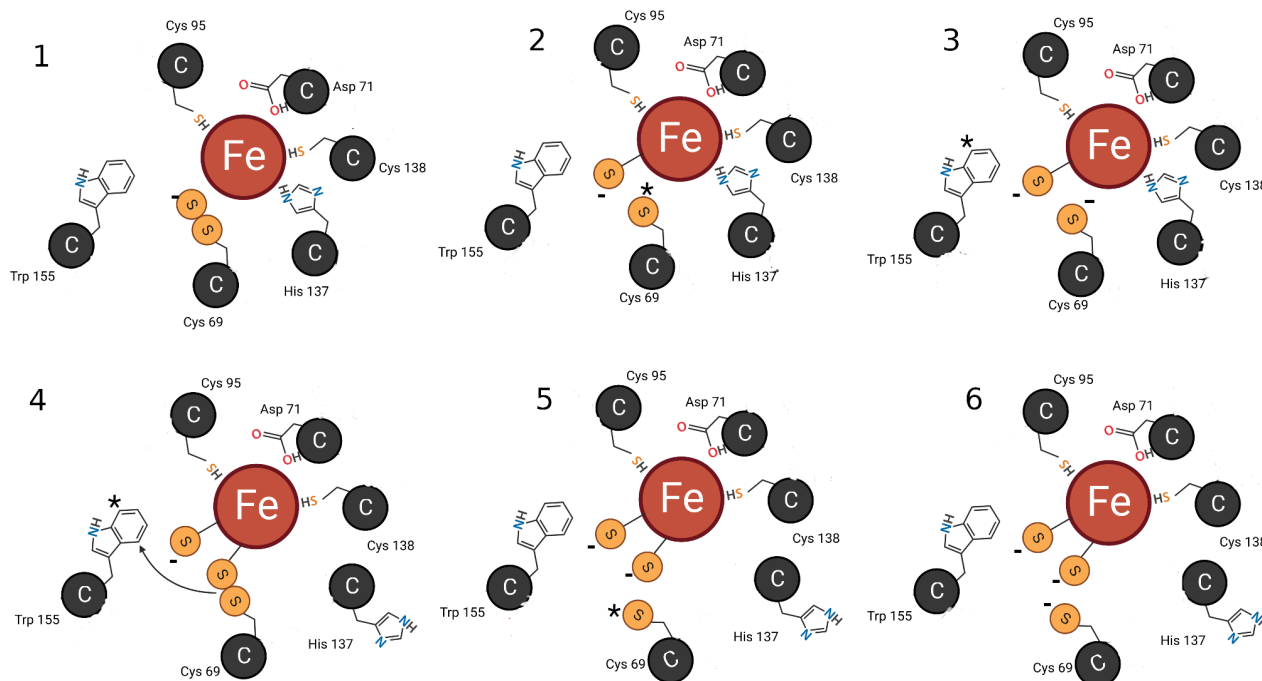


Figura 6.3. Esquema de una secuencia hipotética para la conformación fisiológica del centro [2Fe-2S]. En (1) se muestra la representación de la situación inicial, una vez terminado el primer ciclo de desulfuración con el hierro conformando un complejo de coordinación de $16e^-$. En (2) la oxidación del hierro permite la adición de un sulfuro al complejo de coordinación al tiempo que la ruptura del enlace genera un radical libre $S^{\bullet 0}$ en la Cys original (proponemos a la Cys69 de ISCU2 en este modelo). En (3) el Trp155 de la FXN se oxida para neutralizar al radical libre recién formado, estabilizando un radical libre en su estructura aromática, y dejando un grupo tiol con la posibilidad de ser nuevamente persulfurado. En (4) se cumple un segundo ciclo de desulfuración y transferencia de persulfuro, este se adhiere al complejo coordinación a través de una reacción de sustitución nucleofílica que implica la salida de un ligando, en este caso proponemos como candidata probable a la His137. En (5) el enlace S-S queda inmovilizado por la coordinación con el hierro y por su cercanía al Trp155 que se encuentra deficiente de electrones, se oxida y se rompe para formar un complejo de coordinación que incluye 2 ligandos sulfuro. En (6) como última instancia la FDX2 interviene en la reacción para neutralizar el último radical libre mediante el aporte de un electrón; el complejo de coordinación recientemente formado puede acomodarse para incorporar un Fe^{2+} a través de un rearreglo de ligandos.

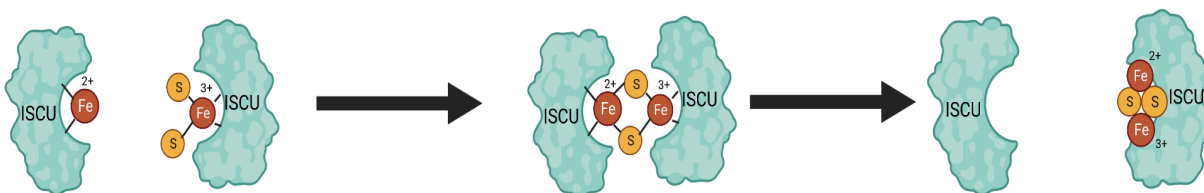


Figura 6.4. Propuesta hipotética para la construcción del centro FES dada la dimerización de ISCU2. Una vez que una molécula de ISCU2 termina dos ciclos de desulfuración, se separa del super complejo desulfurasa y reacciona con una molécula de ISCU2 que no ha participado de ninguna reacción y por lo tanto trae su átomo de hierro reducido (2^+). Como resultado de ese encuentro en configuración cara a cara ocurrirá un rearrreglo de ligandos que permita la construcción de un centro FES en una de las subunidades.

En conclusión, este trabajo de tesis ofrece una aproximación para comprender los caminos moleculares en la maquinaria de síntesis de centros Fe-S. Las interacciones entre las proteínas protagonistas han demostrado ser inter modulatorias y determinantes en distintos aspectos del proceso. Queda mucho por aprender de este sistema para poder entenderlo a cabalidad y es necesario realizar múltiples y más exhaustivas aproximaciones para resolver el mecanismo de síntesis de centros ferrosulfurados. De todos modos, y dada la relevancia metabólica del sistema, numerosos esfuerzos se llevan adelante alrededor del mundo para resolver los pasos limitantes de esta reacción de síntesis.

Referencias

- Adam, Alexander C, Carsten Bornhövd, Holger Prokisch, Walter Neupert, y Kai Hell. 2006. «The Nfs1 Interacting Protein Isd11 Has an Essential Role in Fe/S Cluster Biogenesis in Mitochondria». *The EMBO Journal* 25 (1): 174-83. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600905>.
- Angerer, Heike. 2015. «Eukaryotic LYR Proteins Interact with Mitochondrial Protein Complexes». *Biology* 4 (1): 133-50. <https://doi.org/10.3390/biology4010133>.
- Angerer, Heike, Michael Radermacher, Michalina Mańkowska, Mirco Steger, Klaus Zwicker, Heinrich Heide, Ilka Wittig, Ulrich Brandt, y Volker Zickermann. 2014. «The LYR Protein Subunit NB4M/NDUFA6 of Mitochondrial Complex I Anchors an Acyl Carrier Protein and Is Essential for Catalytic Activity». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (14): 5207-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322438111>.
- Armon, Aharon, Dan Graur, y Nir Ben-Tal. 2001. «ConSurf: An Algorithmic Tool for the Identification of Functional Regions in Proteins by Surface Mapping of Phylogenetic Information». *Journal of Molecular Biology* 307 (1): 447-63. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4474>.
- Ashkenazy, Haim, Shiran Abadi, Eric Martz, Ofer Chay, Itay Mayrose, Tal Pupko, y Nir Ben-Tal. 2016. «ConSurf 2016: An Improved Methodology to Estimate and Visualize Evolutionary Conservation in Macromolecules». *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W344-50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>.
- Becker, Oren M., y Martin Karplus. 1997. «The Topology of Multidimensional Potential Energy Surfaces: Theory and Application to Peptide Structure and Kinetics». *The Journal of Chemical Physics* 106 (4): 1495-1517. <https://doi.org/10.1063/1.473299>.
- Black, Katherine A., y Patricia C. Dos Santos. 2015. «Shared-Intermediates in the Biosynthesis of Thio-Cofactors: Mechanism and Functions of Cysteine Desulfurases and Sulfur Acceptors». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (6): 1470-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.018>.
- Boniecki, Michal T., Sven A. Freibert, Ulrich Mühlenhoff, Roland Lill, y Miroslaw Cygler. 2017. «Structure and Functional Dynamics of the Mitochondrial Fe/S Cluster Synthesis Complex». *Nature Communications* 8 (1): 1287. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01497-1>.
- Bridwell-Rabb, Jennifer, Nicholas G. Fox, Chi-Lin Tsai, Andrew M. Winn, y David P. Barondeau. 2014. «Human Frataxin Activates Fe-S Cluster Biosynthesis by Facilitating Sulfur Transfer Chemistry». *Biochemistry* 53 (30): 4904-13. <https://doi.org/10.1021/bi500532e>.
- Burley, Stephen K, Charmi Bhikadiya, Chunxiao Bi, Sebastian Bittrich, Li Chen, Gregg V Crichlow, Cole H Christie, et al. 2021. «RCSB Protein Data Bank: Powerful New Tools for Exploring 3D Structures of Biological Macromolecules for Basic and Applied Research and Education in Fundamental Biology, Biomedicine, Biotechnology, Bioengineering and Energy Sciences». *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D437-51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>.
- Cai, Kai, Ronnie O. Frederick, Hesam Dashti, y John L. Markley. 2018. «Architectural Features of Human Mitochondrial Cysteine Desulfurase Complexes from Crosslinking Mass Spectrometry and Small-Angle X-Ray Scattering». *Structure* 26 (8): 1127-1136.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.05.017>.
- Cai, Kai, Marco Tonelli, Ronnie O. Frederick, y John L. Markley. 2017. «Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis». *Biochemistry* 56 (3): 487-99. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00447>.
- Capece, Luciana, Marcelo A. Marti, Alejandro Crespo, Fabio Doctorovich, y Darío A. Estrin.

2006. «Heme Protein Oxygen Affinity Regulation Exerted by Proximal Effects». *Journal of the American Chemical Society* 128 (38): 12455-61. <https://doi.org/10.1021/ja0620033>.
- Cardenas-Rodriguez, Mauricio, Afroditi Chatzi, y Kostas Tokatlidis. 2018. «Iron–Sulfur Clusters: From Metals through Mitochondria Biogenesis to Disease». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 23 (4): 509-20. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1548-6>.
- Correia, Ana R., Saw Y. Ow, Phillip C. Wright, y Cláudio M. Gomes. 2009. «The Conserved Trp155 in Human Frataxin as a Hotspot for Oxidative Stress Related Chemical Modifications». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (3): 1007-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.095>.
- Cory, Seth. 2017. «Structure of Human Fe–S Assembly Subcomplex Reveals Unexpected Cysteine Desulfurase Architecture and Acyl-ACP–ISD11 Interactions». 20 de junio de 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702849114>.
- Crooks, Gavin E, Gary Hon, John-Marc Chandonia, y Steven E Brenner. s. f. «WebLogo: A Sequence Logo Generator», 3.
- Daniel, Roy M., y Michael J. Danson. 1995. «Did Primitive Microorganisms Use Nonhem Iron Proteins in Place of NAD(P)?» *Journal of Molecular Evolution* 40 (6): 559-63. <https://doi.org/10.1007/BF00160501>.
- Delatycki, Martin B., y Sanjay I. Bidichandani. 2019. «Friedreich Ataxia- Pathogenesis and Implications for Therapies». *Neurobiology of Disease* 132 (diciembre): 104606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104606>.
- Di Maio, Danilo, Balasubramanian Chandramouli, Robert Yan, Giuseppe Brancato, y Annalisa Pastore. 2017. «Understanding the Role of Dynamics in the Iron Sulfur Cluster Molecular Machine». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (1): 3154-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.020>.
- Espeche, Lucía D., Karl Ellioth Sewell, Ignacio H. Castro, Luciana Capece, María Florencia Pignataro, Liliana Dain, y Javier Santos. 2022. «Conformational Stability, Dynamics and Function of Human Frataxin: Tryptophan Side Chain Interplay». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 715 (enero): 109086. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109086>.
- Farhan, Sali M. K., Jian Wang, John F. Robinson, Piya Lahiry, Victoria M. Siu, Chitra Prasad, Jonathan B. Kronick, David A. Ramsay, C. Anthony Rupa, y Robert A. Hegele. 2014. «Exome Sequencing Identifies *NFS 1* Deficiency in a Novel Fe-S Cluster Disease, Infantile Mitochondrial Complex II / III Deficiency». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2 (1): 73-80. <https://doi.org/10.1002/mgg3.46>.
- Finn, Robert D., Jody Clements, William Arndt, Benjamin L. Miller, Travis J. Wheeler, Fabian Schreiber, Alex Bateman, y Sean R. Eddy. 2015. «HMMER Web Server: 2015 Update». *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W30-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv397>.
- Fontecave, Marc. 2006. «Iron-Sulfur Clusters: Ever-Expanding Roles». *Nature Chemical Biology* 2 (4): 171-74. <https://doi.org/10.1038/nchembio0406-171>.
- Fox, Nicholas G., Xiaodi Yu, Xidong Feng, Henry J. Bailey, Alain Martelli, Joseph F. Nabhan, Claire Strain-Damerell, Christine Bulawa, Wyatt W. Yue, y Seungil Han. 2019. «Structure of the Human Frataxin-Bound Iron-Sulfur Cluster Assembly Complex Provides Insight into Its Activation Mechanism». *Nature Communications* 10 (1): 2210. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>.
- Frauenfelder, Hans, Stephen G. Sligar, y Peter G. Wolynes. 1991. «The Energy Landscapes and Motions of Proteins». *Science* 254 (5038): 1598-1603. <https://doi.org/10.1126/science.1749933>.
- Freibert, Sven-A., Michal T. Boniecki, Claudia Stümpfig, Vinzent Schulz, Nils Krapoth, Dennis R. Winge, Ulrich Mühlenhoff, Oliver Stehling, Mirosław Cygler, y Roland Lill. 2021. «N-Terminal Tyrosine of ISCU2 Triggers [2Fe-2S] Cluster Synthesis by ISCU2 Dimerization». *Nature Communications* 12 (1): 6902.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27122-w>.
- Fuss, Jill O., Chi-Lin Tsai, Justin P. Ishida, y John A. Tainer. 2015. «Emerging Critical Roles of Fe–S Clusters in DNA Replication and Repair». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (6): 1253-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.018>.
- Gakh, Oleksandr, Wasantha Ranatunga, Belinda K. Galeano, Douglas S. Smith, James R. Thompson, y Grazia Isaya. 2017. «Defining the Architecture of the Core Machinery for the Assembly of Fe–S Clusters in Human Mitochondria». En *Methods in Enzymology*, 595:107-60. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.07.003>.
- Garcia, Pierre Simon, Francesca D'Angelo, Sandrine Ollagnier De Choudens, Macha Dussouchaud, Emmanuelle Bouveret, Simonetta Gribaldo, y Frédéric Barras. 2022. «An Early Origin of Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis Machineries before Earth Oxygenation». *Nature Ecology & Evolution* 6 (10): 1564-72. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01857-1>.
- Gervason, Sylvain, Djabir Larkem, Amir Ben Mansour, Thomas Botzanowski, y Benoit D'Autréaux. 2019. «Physiologically Relevant Reconstitution of Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis Uncovers Persulfide-Processing Functions of Ferredoxin-2 and Frataxin», diciembre.
- Gouy, Manolo, Stéphane Guindon, y Olivier Gascuel. 2010. «SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building». *Molecular Biology and Evolution* 27 (2): 221-24. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- Herrera, María Georgina, Martín Ezequiel Noguera, Karl Elliot Sewell, William Armando Agudelo Suárez, Luciana Capece, Sebastián Klinke, y Javier Santos. 2019. «Structure of the Human ACP-ISD11 Heterodimer». *Biochemistry* 58 (46): 4596-4609. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00539>.
- Herrera, María Georgina, María Florencia Pignataro, Martín Ezequiel Noguera, Karen Magalí Cruz, y Javier Santos. 2018. «Rescuing the Rescuer: On the Protein Complex between the Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein and ISD11». *ACS Chemical Biology* 13 (6): 1455-62. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00184>.
- Hikita, Masahide, Shoko Ogawa, Yasuhiro Takahashi, y Takashi Fujishiro. 2020. «Snapshots of PLP-Substrate and PLP-Product External Aldimines as Intermediates in Two Types of Cysteine Desulfurase Enzymes». *The FEBS Journal* 287 (6): 1138-54. <https://doi.org/10.1111/febs.15081>.
- Huttlin, Edward L., Lily Ting, Raphael J. Bruckner, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, John Szpyt, Stanley Tam, et al. 2015. «The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome». *Cell* 162 (2): 425-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.043>.
- Jorgensen, William L., Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D. Madura, Roger W. Impey, y Michael L. Klein. 1983. «Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water». *The Journal of Chemical Physics* 79 (2): 926-35. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- Kariampuzha, William Z., Gioconda Alyea, Sue Qu, Jaleal Sanjak, Ewy Mathé, Eric Sid, Haley Chatelaine, Arjun Yadaw, Yanji Xu, y Qian Zhu. 2023. «Precision Information Extraction for Rare Disease Epidemiology at Scale». *Journal of Translational Medicine* 21 (1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04011-y>.
- Katoh, Kazutaka, John Rozewicki, y Kazunori D Yamada. 2019. «MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization». *Briefings in Bioinformatics* 20 (4): 1160-66. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- Kollberg, Gittan, Már Tulinius, Atle Melberg, Niklas Darin, Oluf Andersen, Daniel Holmgren, Anders Oldfors, y Elisabeth Holme. 2009. «Clinical Manifestation and a New ISCU Mutation in Iron–Sulphur Cluster Deficiency Myopathy». *Brain* 132 (8): 2170-79. <https://doi.org/10.1093/brain/awp152>.

- Krieger, Elmar, y Gert Vriend. 2014. «YASARA View—Molecular Graphics for All Devices—from Smartphones to Workstations». *Bioinformatics* 30 (20): 2981-82. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.
- Lill, Roland, y Sven-A. Freibert. 2020. «Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis». *Annual Review of Biochemistry* 89 (1): 471-99. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111540>.
- Lim, Sze Chern, Martin Friemel, Justine E. Marum, Elena J. Tucker, Damien L. Bruno, Lisa G. Riley, John Christodoulou, et al. 2013. «Mutations in LYRM4, Encoding Iron–Sulfur Cluster Biogenesis Factor ISD11, Cause Deficiency of Multiple Respiratory Chain Complexes». *Human Molecular Genetics* 22 (22): 4460-73. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt295>.
- Lin, Cheng-Wei, Jacob W. McCabe, David H. Russell, y David P. Barondeau. 2020. «Molecular Mechanism of ISC Iron–Sulfur Cluster Biogenesis Revealed by High-Resolution Native Mass Spectrometry». *Journal of the American Chemical Society* 142 (13): 6018-29. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11454>.
- Maier, James A., Carmenza Martinez, Koushik Kasavajhala, Lauren Wickstrom, Kevin E. Hauser, y Carlos Simmerling. 2015. «ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB». *Journal of Chemical Theory and Computation* 11 (8): 3696-3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.
- Majmudar, Jaimeen D., Xidong Feng, Nicholas G. Fox, Joseph F. Nabhan, Theresa Towle, Tiffany Ma, Renea Gooch, Christine Bulawa, Wyatt W. Yue, y Alain Martelli. 2019. «4'-Phosphopantetheine and Long Acyl Chain-Dependent Interactions Are Integral to Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein Function». *MedChemComm* 10 (2): 209-20. <https://doi.org/10.1039/C8MD00489G>.
- Marcolongo, Juan P., Ari Zeida, Jonathan A. Semelak, Nicolás O. Foglia, Uriel N. Morzan, Dario A. Estrin, Mariano C. González Lebrero, y Damián A. Scherlis. 2018. «Chemical Reactivity and Spectroscopy Explored From QM/MM Molecular Dynamics Simulations Using the LIO Code». *Frontiers in Chemistry* 6 (marzo): 70. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00070>.
- Marquez, Melissa D., Carina Greth, Anastasiya Buzuk, Yaxi Liu, Catharina M. Blinn, Simone Beller, Laura Leiskau, et al. 2023. «Cytosolic Iron-Sulfur Protein Assembly System Identifies Clients by a C-Terminal Tripeptide». Preprint. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.19.541488>.
- Martinou, Jean-Claude, Joséphine Zangari, Oliver Stehling, Sven-Andreas Freibert, Florian Rouaud, Veronique Serre Beinier, Kinsey Maundrell, et al. 2023. «D-Cysteine Inhibits Iron-Sulfur Cluster Assembly and Impairs Tumour Growth». Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3355970/v1>.
- Mochel, Fanny, Melanie A. Knight, Wing-Hang Tong, Dena Hernandez, Karen Ayyad, Tanja Taivassalo, Peter M. Andersen, et al. 2008. «Splice Mutation in the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein ISCU Causes Myopathy with Exercise Intolerance». *The American Journal of Human Genetics* 82 (3): 652-60. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.012>.
- Moest, R. R. 1975. «Hydrogen Sulfide Determination by the Methylene Blue Method». *Analytical Chemistry* 47 (7): 1204-5. <https://doi.org/10.1021/ac60357a008>.
- Nevers, Yannis, Arnaud Kress, Audrey Defosset, Raymond Ripp, Benjamin Linard, Julie D Thompson, Olivier Poch, y Odile Lecompte. 2019. «OrthoInspector 3.0: Open Portal for Comparative Genomics». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D411-18. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1068>.
- Nordin, Angelica, Elin Larsson, Lars-Eric Thornell, y Monica Holmberg. 2011. «Tissue-Specific Splicing of ISCU Results in a Skeletal Muscle Phenotype in Myopathy with Lactic Acidosis, While Complete Loss of ISCU Results in Early Embryonic Death in Mice». *Human Genetics* 129 (4): 371-78. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0931-3>.

- Önder, Özlem, Heeyong Yoon, Bianca Naumann, Michael Hippler, Andrew Dancis, y Fevzi Daldal. 2006. «Modifications of the Lipoamide-Containing Mitochondrial Subproteome in a Yeast Mutant Defective in Cysteine Desulfurase». *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (8): 1426-36. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600099-MCP200>.
- Pandey, Ashutosh K., Jayashree Pain, Andrew Dancis, y Debkumar Pain. 2019. «Mitochondria Export Iron–Sulfur and Sulfur Intermediates to the Cytoplasm for Iron–Sulfur Cluster Assembly and tRNA Thiolation in Yeast». *Journal of Biological Chemistry* 294 (24): 9489-9502. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008600>.
- Parent, Aubérie, Xavier Elduque, David Cornu, Laura Belot, Jean-Pierre Le Caer, Anna Grandas, Michel B. Toledano, y Benoit D'Autréaux. 2015. «Mammalian Frataxin Directly Enhances Sulfur Transfer of NFS1 Persulfide to Both ISCU and Free Thiols». *Nature Communications* 6 (1): 5686. <https://doi.org/10.1038/ncomms6686>.
- Patra, Shachin, y David P. Barondeau. 2019. «Mechanism of Activation of the Human Cysteine Desulfurase Complex by Frataxin». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (39): 19421-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909535116>.
- Read, Austin D., Rachel Et. Bentley, Stephen L. Archer, y Kimberly J. Dunham-Snary. 2021. «Mitochondrial Iron–Sulfur Clusters: Structure, Function, and an Emerging Role in Vascular Biology». *Redox Biology* 47 (noviembre): 102164. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>.
- Ryckaert, Jean-Paul, Giovanni Ciccotti, y Herman J.C Berendsen. 1977. «Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes». *Journal of Computational Physics* 23 (3): 327-41. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- Selbach, Bruna. 2010. «Kinetic Analysis of the Bisubstrate Cysteine Desulfurase SufS from *Bacillus Subtilis*». *Biochemistry* 49 (40): 8794-8802. <https://doi.org/10.1021/bi101358k>.
- Shi, Ruifeng, Wenya Hou, Zhao-Qi Wang, y Xingzhi Xu. 2021. «Biogenesis of Iron–Sulfur Clusters and Their Role in DNA Metabolism». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (septiembre): 735678. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.735678>.
- Tsai, Chi-Lin, y David P. Barondeau. 2010. «Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe–S Cluster Biosynthetic Complex». *Biochemistry* 49 (43): 9132-39. <https://doi.org/10.1021/bi1013062>.
- Tsai, Chi-Lin, Jennifer Bridwell-Rabb, y David P. Barondeau. 2011. «Friedreich's Ataxia Variants I154F and W155R Diminish Frataxin-Based Activation of the Iron–Sulfur Cluster Assembly Complex». *Biochemistry* 50 (29): 6478-87. <https://doi.org/10.1021/bi200666h>.
- Yip, Joyce, Suqing Wang, Jasper Tan, Teck Kwang Lim, Qingsong Lin, Zhang Yu, Ofri Karmon, Ophry Pines, y Norbert Lehming. 2021. «Fumarase Affects the Deoxyribonucleic Acid Damage Response by Protecting the Mitochondrial Desulfurase Nfs1p from Modification and Inactivation». *iScience* 24 (11): 103354. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103354>.

Dedicatoria

Celebración de la amistad/1

En los suburbios de La Habana, llaman al amigo *mi tierra* o *mi sangre*.

En Caracas, el amigo es *mi pana* o *mi llave*: *pana*, por panadería, la fuente del buen pan para las hambres del alma; y *llave* por...

-*Llave, por llave* -me dice Mario Benedetti.

Y me cuenta que cuando vivía en Buenos Aires, en los tiempos del terror, él llevaba cinco llaves ajenas en su llavero: cinco llaves, de cinco casas, de cinco amigos: las llaves que lo salvaron.

Eduardo Galeano, El libro de los Abrazos

Este documento -y todos los logros resumidos en él- está dedicado a los numerosos amigos que encontré en Argentina. Quienes en tantas ocasiones se vistieron de familia, y en tantas otras me han salvado del infortunio, el dolor y la muerte.

Agradecimientos

Este documento y los muchos hechos que describe no hubieran sido posibles sin la intervención directa e indirecta de muchísimas personas a lo largo de los últimos 14 años. Para evitar el riesgo de olvidarme de alguna voy a evitar la monumental tarea de nombrarles a todos. En su lugar, quiero decir que si estás leyendo esta sección de este documento, probablemente formes parte de este tan especial grupo de personas y por esta razón te amo.

Después queda mencionar algunos que estuvieron especialmente cercanos al proceso y desenlace de esta tesis doctoral. Primero a Javier, que me dio la confianza para embarcar este proyecto, y tuvo la paciencia de liderarlo a lo largo de estos años. A Lula, quien lo dirigió, y puso a mi disposición las herramientas técnicas necesarias para mi desarrollo. A mis compañeros de grupo y colaboradores, Georgina, Florencia, Ignacio, Martín, Augusto, Julian, Naira, Gabriel, Martín Arán, Mauro y todos los miembros del laboratorio de química computacional en el INQUIMAE; de todos ustedes aprendí cada día aspectos técnicos y humanos que me acompañaran para siempre. Al consorcio DNS, quienes ayudaron a construir un espacio colaborativo de trabajo de alta calidad. Por último, a todos los miembros del IB3, por su insistencia en construir un instituto diferente donde los liderazgos están siempre en una dinámica de intercambio horizontal con los integrantes.

Vale la pena además, agradecer a la sociedad argentina en su conjunto. Quien a través de instituciones como el CONICET y la UBA, me da la oportunidad de sumar un granito de arena al desarrollo científico de esta nación. Mi segunda patria, Argentina.

.