

RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Milagros Medina

INVESTIGADORES:

Dr. Marta Martínez Júlvez

Dr. Patricia Ferreira Neila

Dr. Raquel Villanueva Llop

Dr. Guillermina Goñi Rasia

María Sebastián Valverde

Silvia Romero Tamayo

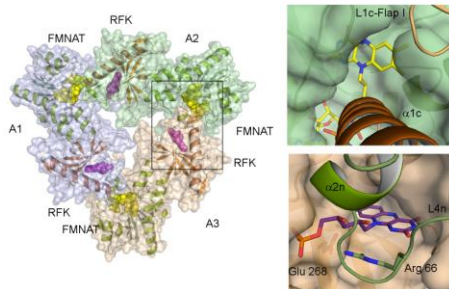
Ernesto Anoz Carbonel

RESUMEN

La gran versatilidad de las flavoenzimas les permite realizar múltiples funciones en todo tipo de organismos, siendo las más conocidas aquellas donde participan en procesos de transferencia de electrones, oxido-reducción o deshidrogenación. Por otra parte, algunas flavoenzimas han sido identificadas como interruptores redox para el control y la modulación de procesos celulares mediados por otras biomoléculas. En este contexto, se abren nuevos horizontes en la comprensión de los mecanismos de acción y los estilos de vida dependientes de flavinas, así como en el desarrollo de estrategias biotecnológicas basadas en estas enzimas. Las flavoenzimas actúan como componentes comunes en procesos metabólicos dependientes de reacciones de óxido-reducción debido a su versatilidad y capacidad única para conectar procesos de dos electrones con los de un solo electrón. Estas enzimas pueden participar en procesos de óxido-reducción porque la parte isoaloxazina de sus cofactores FMN o FAD es un agente redox que puede existir en tres estados diferentes: totalmente oxidado (quinona), reducido por un electrón (semiquinona) y reducido por dos electrones (hidroquinona). La gran versatilidad que FMN y FAD pueden proporcionar *in vivo* solo puede entenderse cuando la flavoenzima es considerada en conjunto, ya que solo actúan como cofactores eficientes cuando su potencial reactivo es modulado por la parte proteica. Esto hace a cada flavoenzima altamente específica con respecto a reacciones y parejas redox. Las flavoenzimas pueden, por tanto, considerarse eficientes y sofisticados instrumentos moleculares que utilizan el reconocimiento molecular para el control de procesos de óxido-reducción. Esto permite que además puedan llegar a ser instrumentos clave en biomedicina y biotecnología, actuando como dianas farmacológicas (desarrollo de antimicrobianos o control de enfermedades humanas), así como proporcionando productos químicos esenciales para diferentes actividades humanas. La utilización biotecnológica de estas enzimas es todavía limitada. Esto es consecuencia de nuestra todavía pobre comprensión de estos sistemas, que nos impide controlar los factores que rigen su comportamiento, estabilidad y, particularmente, actividad catalítica. Nuestra hipótesis es que necesitamos entender los mecanismos moleculares de flavoenzimas con funciones metabólicas clave en bacterias, parásitos, plantas o animales, con objeto de explotar

su potencialidad en diversas áreas de la biotecnología. En nuestro grupo, aplicamos una combinación interdisciplinaria de herramientas de bioquímica, biofísica, biología celular y biología computacional con objeto de investigar los mecanismos y los factores que aportan versatilidad a varios sistemas dependientes de flavoenzimas, con el objeto de utilizar dicha información en nuevas aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas. Las publicaciones del grupo reflejan nuestras contribuciones en áreas clave en la comprensión de flavoenzimas. Dado el amplio abanico de interés y metodologías en nuestra investigación, mantenemos estrechas colaboraciones con especialistas de otras disciplinas, tanto dentro de BIFI y UNIZAR, como de fuera de nuestra institución.

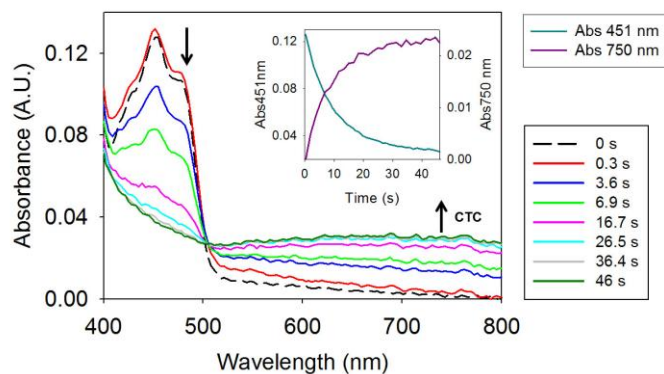
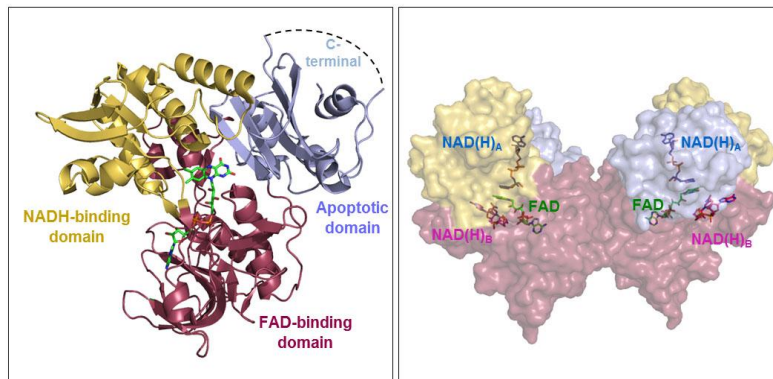
La biosíntesis de los cofactores flavínicos: las enzimas procariotas bifuncionales como dianas farmacológicas



La riboflavina (RF) puede ser sintetizada *de novo* por plantas, levaduras y la mayoría de procariotas, pero su aporte en la dieta es esencial en la nutrición humana y animal. Todos los organismos son capaces de transformar RF, primero en FMN y posteriormente en FAD, por la acción secuencial de dos actividades, una ATP:riboflavina quinasa (RFK) y una ATP:FMN adenililtransferasa (FMNAT). Sin embargo, eucariotas y arqueobacterias utilizan dos enzimas diferentes para la producción de FMN y FAD, mientras que la mayoría de procariotas dependen de una sola enzima bifuncional, la FAD sintetasa (FADS). La deficiencia de las actividades RFK o FMNAT evita el ensamblaje de flavoproteínas esenciales para la supervivencia de la célula. Además, cambios en los niveles de expresión de enzimas responsables RFK y FMNAT causan algunos estreses celulares, lo que sugiere que están implicadas en diversas funciones celulares.

En nuestro grupo se están describiendo características moleculares diferenciales para llevar a cabo la misma química entre los componentes enzimáticos para la producción de FMN y FAD en procariotas y eucariotas. Esto sugiere que la inhibición selectiva de las enzimas procariotas puede ser un posible tratamiento para enfermedades producidas por patógenos y, por tanto, merece la pena su exploración. Como primera etapa de este proceso nos propusimos aumentar el conocimiento de la relación estructura-función de todas estas enzimas, pero particularmente de las procariotas. Utilizando como modelo la FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* hemos determinado los parámetros de interacción y catalíticos para los sustratos de esta enzima en sus dos sitios catalíticos, localizados en cada uno de los dos módulos de esta enzima. No existe homología entre el módulo responsable de la actividad FMNAT en FADS procariotas y las enzimas FMNAT monofuncionales en mamíferos. Por otra parte, a pesar de la homología en el módulo RFK de las FADS procariotas con respecto a las

correspondientes enzimas monofuncionales en eucariotas, se prevé una reorganización estructural más compleja durante la catálisis para la procariota. Finalmente, la organización cuaternaria de la FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* sugiere un posible papel de esta proteína en la homeostasis de flavinas en procariotas. Actualmente, estamos estudiando también las FADSs de los patógenos humanos *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*.



El factor de inducción de apoptosis humano (AIF)

Los organismos multicelulares han desarrollado complejos sistemas para eliminar del cuerpo las células potencialmente peligrosas mediante un mecanismo de muerte celular programada llamado apoptosis, cuya desregulación está relacionada con un número de procesos cancerígenos. Inicialmente se identificó una familia de cisteína proteasas (caspasas) como responsable de la apoptosis, pero posteriormente se evidenció la existencia de un mecanismo alternativo que implica al factor de inducción de apoptosis (AIF). AIF es un flavoenzima mitocondrial conservada filogenéticamente que comparte homología con diferentes familias de reductasas. En mitocondrias intactas, AIF presenta una actividad NADH-óxido-reductasa a través de su cofactor flavínico, FAD, que se ha relacionado con la estabilidad y la biogénesis de los complejos respiratorios I y III a través de la interacción con otras proteínas, como CHCHD4 (homólogo en humanos a MIA40). Sin embargo, ni su papel como reductasa, ni los mecanismos moleculares subyacentes a la biogénesis de los complejos mitocondriales se comprenden actualmente. Además, cuando las mitocondrias reciben un estímulo apoptótico AIF se transloca al núcleo, donde interacciona con otras proteínas nucleares formando el degradosoma que induce cromatinolisis. El interés en el diseño

de nuevas terapias para modular la apoptosis independiente de caspasas ha aumentado en los últimos años, convirtiendo a AIF en una diana potencial para el tratamiento de alteraciones patológicas (cáncer o enfermedades degenerativas) en la que esta proteína provoca un defecto o un exceso de apoptosis. El estado redox de AIF influye en su conformación y en su equilibrio monómero-dímero y, por extensión, en su función pro-apoptótica al modular estos factores la interacción con otras proteínas. Puesto que una de las posibilidades de modulación de la actividad pro-apoptótica de AIF recae en la regulación de su actividad redox, es imperativo responder a múltiples preguntas relacionadas con el mecanismo y la función celular de dicha actividad. Nuestra investigación sobre AIF humana tiene como objetivo proporcionar algunas de estas respuestas mediante la comprensión de los mecanismos moleculares vinculados a los procesos de óxido-reducción de AIF y las consecuencias de su actividad redox en la interacción con sus parejas proteicas en los diferentes compartimentos celulares donde se encuentra.

Fotosíntesis: una cadena de transferencia electrónica dependiente de flavoproteínas clave en la transformación de energía

Durante la fotosíntesis, una cadena de transferencia de electrones a través de la formación complejos transitorios que implican a la flavoenzima ferredoxina-NADP+ reductasa (FNR) convierten la energía luminosa en energía química (en forma de NADPH) utilizable por la célula. Bajo condiciones de deficiencia de hierro, algunas algas y cianobacterias, como *Anabaena*, incorporan otra flavoproteína a esta cadena, la flavodoxina. Puesto que el crecimiento de estos organismos está limitado por la disponibilidad de hierro en muchas partes de los océanos, esta cadena presenta un papel central en la productividad fotosintética global. A pesar de que la función biológica principal de este sistema es la producción de poder de reducción, NADPH, los procesos de transferencia de electrones en sentido inverso también tienen lugar *in vivo*. Por otra parte, aunque la función fotosintética de FNR fue la primera descrita, flavoproteínas con actividad FNR se han descrito también en cloroplastos, bacterias fototróficas y heterótrofas, apicoplastos y, mitocondrias de animales y levaduras. Nuestro grupo seleccionó el flujo de electrones en los sentidos fotosintético y no fotosintético en la enzima de *Anabaena* como modelo para estudiar los parámetros que determinan el mecanismo catalítico y la eficiencia de las enzimas de la familia FNRs fotosintéticas. Nuestro trabajo ha contribuido a describir las características estructurales que determinan aspectos fundamentales de la interacción y la transferencia de electrones entre los componentes de este sistema en complejos binarios para que pueda realizar eficientemente sus funciones fisiológicas. El empleo de algoritmos de simulación usando métodos QM/MM junto con los datos experimentales ha permitido proponer modelos estructurales para los complejos binarios catalíticamente competentes. No obstante, todavía quedan por contestar preguntas fundamentales sobre la regulación de la función de la FNR. Quedan por describir a nivel molecular los principales intermediarios y especies finales de los procesos de transferencia de electrones e hidruro dentro de los complejos ternarios, así como la contribución de la transferencia de protones a la transferencia de electrones en complejos binarios y ternarios. Sin embargo, los conocimientos

adquiridos han permitido vislumbrar la posibilidad de rediseñar funciones de estas flavoproteínas y producir sistemas enzimáticos heterólogos. Además, la comprensión de cómo el ambiente de la proteína modula el potencial de reducción del cofactor flavínico ha permitido producir una batería de variantes de las flavoproteínas estudiadas con diferentes propiedades de óxido-reducción.

Colaboraciones permanentes en otros sistemas dependientes de flavoenzimas

NADPH-flavodoxina (ferredoxina) reductasas (FPR) de bacterias: En colaboración con los grupos del Dr. E. Ceccarelli y Dra. E. Orellano de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, estamos estudiando comparativamente las enzimas bacterianas y plastídicas. Ya que en muchas bacterias, estas enzimas son esenciales o están implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, se pueden tratar como interesantes dianas farmacológicas para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos.

Deshidrogenasas y oxidasas: En colaboración con el Dr. Martínez, del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, hemos descrito el mecanismo catalítico de la flavoenzima fúngica aril-alcohol oxidasa e identificado sus residuos claves. Esta enzima está implicada en la degradación de la lignina y el aprovechamiento de la biomasa vegetal con fines biotecnológicos. Los estudios estructura-función realizados han permitido describir a detalle molecular su mecanismo estereoselectivo de oxidación de alcoholes y aldehídos aromáticos y explorar su potencial para la producción de enantiómeros o la síntesis de biopolímeros de interés. En colaboración con la Dra. Nonato de la Universidade de São Paulo, Brasil, estamos actualmente caracterizando otras flavoenzimas de interés biomédico como la dihidroorotato dehidrogenasa de *Leshmania major* y la L-amino ácido oxidasa de veneno de serpiente.

Además también mantenemos colaboraciones puntuales con diversos grupos con actividad en el campo de flavoenzimas para la caracterización cinética y estructural de sus flavoproteínas o sistemas.

Palabras clave: flavoenzimas como biocatalizadores • mecanismos de flavoenzimas • métodos de cinéticas rápidas • estructura y dinámica enzimática • biología química

Metodologías utilizadas en nuestra investigación:

- Producción de proteínas nativas y mutantes mediante el uso de técnicas de ingeniería de proteínas
- Expresión de proteínas homólogas y heterólogas en diferentes microorganismos
- Purificación de proteínas (electroforesis, métodos cromatográficos, HPLC, FPLC...)
- Trabajo bajo condiciones anaeróbicas
- Espectrometría de absorción: estudios cinéticos en estado estacionario, espectroscopia diferencial, determinación de potenciales de reducción
- Uso de técnicas de espectroscopia resuelta en el tiempo como flujo detenido y espectrometría cinética inducida por pulso de láser
- Espectroscopia de fluorescencia y dicroísmo circular

- Cristalización de proteínas y difracción de rayos x para la determinación de estructuras 3D de proteínas
- Resonancia paramagnética electrónica relacionados con técnicas (ESEEM, HYSCORE, ENDOR)
- Calorimetrías de titulación isotérmica y diferencial de barrido
- Acoplamiento, simulaciones de dinámica Molecular y QM/MM

PUBLICACIONES RELEVANTES

1.- Redox proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases establish a regulatory cascade that prevents gratuitous induction of tetralin biodegradation genes. Laura Ledesma-García, Ana Sánchez-Azqueta, Milagros Medina*, Francisca Reyes-Ramírez* and Eduardo Santero. *Scientific Reports* 6:23848 (2016).

2.- Key residues regulating the reductase activity of the human mitochondrial apoptosis inducing factor. Raquel Villanueva, Carlos Marcuello, Alejandro Usón, M. Dolores Miramar, Maria Luisa Peleato, Ana Lostao, Santos A. Susin, Patricia Ferreira, and Milagros Medina. *Biochemistry*. 54, 5175-5184 (2015).

3.- A theoretical multiscale treatment of protein-protein electron transfer: the ferredoxin/ferredoxin-NADP⁺ reductase and flavodoxin/ferredoxin-NADP⁺ reductase systems. Suwipa Saen-oon, Israel Cabeza de Vaca, Milagros Medina, and Víctor Guallar. *BBA-Bioenergetics*. 184, 1530-1538 (2015).

4.- Dynamics of the active site architecture in plant-type Ferredoxin-NADP⁺ reductases catalytic complexes. Ana Sánchez-Azqueta, Daniela L. Catalano-Dupuy, Arleth López-Rivero, María Laura Tondo, Elena G. Orellano, Eduardo A. Ceccarelli, and Milagros Medina. *BBA-Bioenergetics* 1837, 1730-1738 (2014).

5.- Structural insights into the coenzyme mediated monomer-dimer transition of the pro-apoptotic Apoptosis Inducing Factor. Patricia Ferreira, Raquel Villanueva, Marta Martínez-Júlvez, Beatriz Herguedas, Carlos Marcuello, Patricio Fernandez-Silva, Lauriane Cabon, Juan A. Hermoso, Anabel Lostao, Santos A. Susin and Milagros Medina. *Biochemistry*. 53, 4204-4215 (2014).

6.- ?

7.- Theoretical study of the mechanism of the hydride transfer between Ferredoxin NADP⁺ reductase and NADP⁺. The role of Tyrosine 303. Isaías Lans, Milagros Medina*, Edina Rosta*, Gerhard Hummer, Mireia García-Viloca, José M. Lluch, and Àngels González-Lafont. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 20544-20553 (2012).

8.- Comparative genomics of *Ceriporiopsis-subvermispora* and *Phanerochaete-chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. Elena Fernández-Fueyo, Francisco J. Ruiz-Dueñas, Patricia Ferreira, +62 autores and Dan Cullen. *PNAS* 109, 5458-5463 (2012).

- 9.- Role of key residues at the riboflavin kinase catalytic site of the bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase from *Corynebacterium ammoniagenes*.** Ana Serrano, Susana Frago, Beatriz Herguedas, Marta Martínez-Júlvez, Adrián Velázquez-Campoy and Milagros Medina. *Cellular Biochem. Biophys.* 65, 57-68 (2013).
- 10.- Understanding the FMN cofactor chemistry within the *Anabaena* Flavodoxin environment.** Isaías Lans, Susana Frago and Milagros Medina. *BBA-Bioenergetics* 1817, 2118-2127 (2012).
- 11.- Role of specific residues in charge transfer complex formation and hydride transfer between NADP⁺/H and Ferredoxin NADP⁺-reductase from *Anabaena* PCC 7119.** José R. Peregrina, Ana Sánchez-Azqueta, Beatriz Herguedas, Marta Martínez-Júlvez and Milagros Medina. *BBA-Bioenergetics* 1797, 1638-1646 (2010).
- 12.- Evolutionary divergence of chloroplast FAD synthetase proteins.** Inmaculada Yruela, Sonia Arilla, Milagros Medina and Bruno Contreras. *BMC Evol. Biol.* 10:311 (2010).
- 13.- Aryl-Alcohol Oxidase Involved in Lignin Degradation. A mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates.** Patricia Ferreira, Aitor Herández-Ortega, Beatriz Herguedas, Maria Jesús Martínez, Ángel T. Martínez and Milagros Medina. *J. Biol. Chem.* 284, 24840–24847 (2009).
- 14.- The puzzle of ligands binding to *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase.** Susana Frago, Adrian Velázquez-Campoy and Milagros Medina. *J. Biol. Chem.* 284, 6610-6619 (2009).
- 15.- Hyperfine correlation spectroscopy and electron spin echo envelope modulation spectroscopy study of the two coexisting forms of the heme protein cytochrome c6 from *Anabaena* PCC 7119.** Inés García Rubio, Pablo J. Alonso, Milagros Medina and Jesus. I. Martínez. *Biophys. J.* 96, 141-152 (2009).

PRINCIPALES PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- 1.- Flavoenzimas: mecanismos y dianas moleculares, patologías y aplicaciones biotecnológicas. BIO2016-75183-P.** Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Enero 2017-Diciembre 2019. Universidad de Zaragoza. Research Leader: Milagros Medina.
- 2.- Flavoenzyme dependent systems: from action mechanisms to biotechnological and sanitary applications. BIO2013-42978-P.** Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Enero 2014-Diciembre 2016. Universidad de Zaragoza. Research Leader: Milagros Medina.

3.- Seguimiento de los cambios conformacionales del dominio apoptótico del Factor de Inducción de Apoptosis Humano (hAIF) con marcaje selectivo de espín y espectroscopia de EPR. SGI (Universidad de Zaragoza) Enero 2015-Diciembre 2015. Research Leader: Patricia Ferreira.

4.- Retos enzimáticos, químicos y de ingeniería para la utilización de los recursos agroforestales no alimentarios (lignocelulosa) en una bio-economía más sostenible y menos contaminante. AC2014-00017-00-00. Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Octubre 2014-Diciembre 2015. CIB-CSIC/Universidad de Zaragoza y otros. Research Leader: Susana Camarero Fernandez.

5.- Grupo Consolidado Biología Estructural (B18). Diputación General de Aragón 2014. Universidad de Zaragoza. Research Leader: Maria Luisa Peleato.

6.- Structure-based drug design for diagnosis and treatment of neurological diseases: dissecting and modulating complex function in the monoaminergic systems of the brain. COST ACTION CM1103. EU. 28 November 2011 Hasta: 27 November 2015. University of St. Andrews+18. Research Leader: Rona Ramsay.

7.- Mecanismos catalíticos en flavoenzimas: clave para su utilización biotecnológica o terapéutica. BIO2010-14983. Ministerio de Ciencia e Innovación. Universidad de Zaragoza. January 2011- September 2014. Research Leader: Milagros Medina.

8.- Propiedades proapoptótica y oxido-reductasa de la proteína mitocondrial AIF (factor de inducción de apoptosis): ¿Funciones biológicas independientes o complementarias?. Ref. 212363 (JIUZ-2012-BIO-01). SGI (Universidad de Zaragoza) Enero 2013-Diciembre 2013. Research Leader: Patricia Ferreira Neila.

9.- Flavoproteins and Flavoenzymes: Energy transformation and pharmacological targets. BIO2007-65890-C02-01. Dirección General de Investigación. Ministerio de Educación y Ciencia. Universidad de Zaragoza. October 2007-October 2010. Research Leader: Dr. Milagros Medina.

10.- Estudios Estructurales y Espectroscópicos mediante Difracción de Rayos X y EPR de Proteínas implicadas en Sistemas Biológicos de Transporte de Electrones. Vicerrectorado de Investigación-Apoyo A- Ibercaja.Universidad de Zaragoza. 2009. Research Leader: Dra. Marta M^a Martínez Júlvez.

COLABORADORES

Colaboradores del BIFI

Dr. Juan Fernandez-Recio

Dr. Adrián Velázquez-Campoy

Dr. Inmaculada Yruela

Dr. Pier Paolo Bruscolini

Dr. Ramón Hurtado-Guerrero

Dr. José Alberto Carrodeguas

Dr. José Antonio Ainsa
Dr. Patricio Fernández

Colaboradores de otras Instituciones

Instituto de Nanociencia de Aragón (INA)

– Dr. Ana Isabel Gracia Lostao

Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

– Prof. Néstor Carrillo

– Dr. Néstor Cortez

– Dr. Eduardo Ceccarelli

– Dr. Elena Orellano

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

– Dr. Angel Martínez

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC. Sevilla

– Prof. Miguel A. de la Rosa

– Dr. Manuel Hervás

– Dr. José A. Navarro

Instituto Química Física-Rocasolano, CSIC, Madrid

– Dr. Juan A. Hermoso

IBB and Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona

– Dra. Mireia García-Viloca

– Dr. José M. Lluch

– Dra. Angels González

Barcelona Supercomputing Centre, Barcelona

– Dr. Victor Guallar

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla

– Dra. Francisca Reyes

Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

– Dr. Santos Susín

Universita degli Studi di Bari

– Dr. Maria Barile

Universidad de Sao Paolo, Brasil

– Dr. M Cristina Nonato

Clark University, Biology Department, USA

– Dr. David Scott Hibbett

University of Oulu. Biocenter Oulu, and Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, Finland.

– Dr. André H. Juffer

Wageningen University, Laboratory of Biochemistry, Netherlands

– Prof. Willem van Berkel

University of Turku, Molecular Plant Biology, Finland

– Dr. Paula Mulo