Universitat de Girona

Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

La doble vida de l'aconitasa: regulació dels nivells de ferro i del metabolisme

Estudiant: Cristina Prat Ferrer

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: cristina.prat.ferrer@gmail.com

Tutor: Dr. Ferran Feixas Geronès

Empresa/Institució: Institut de Química Computacional i Catàlisi, Universitat de Girona

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Dr. Ferran Feixas Geronès

Empresa/Institució: Institut de Química Computacional i Catàlisi, Universitat de Girona

Correu electrònic: ferran.feixas@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 29 de maig del 2015

AGRAÏMENTS

AL DR. FERRAN FEIXAS GERONÈS,

A L'INSTITUT DE QUÍMICA COMPUTACIONAL I CATÀLISIS,

ALS PROFESSORS,

ALS AMICS PROPERS,

I A LA FAMÍLIA,

PEL SEU SUPORT I CONSELLS DURANT EL TREBALL FINAL DE GRAU,

GRÀCIES.

RESUM

El ferro és un element biològicament essencial per a moltes formes de vida ja que forma part d'un gran nombre de grups prostètics de proteïnes implicades en processos cel·lulars centrals. El contingut de ferro cel·lular s'ha de mantenir dins d'un rang estret per evitar les conseqüències adverses provocades per la deficiència o excés de ferro. El manteniment de l'homeòstasi de ferro cel·lular s'aconsegueix mitjançant la regulació coordinada de l'absorció de ferro, l'emmagatzematge i l'exportació a través de la proteïna IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*). La IRP1 (PDB 3SNP) s'uneix a IREs (*Iron Responsive Elements*) en les UTRs dels ARNm i regula la codificació de proteïnes implicades en la captació, el segrest i l'exportació de ferro. Per altra banda, l'aconitasa citosòlica (PDB 2B3Y), que conté un clúster de [4Fe-4S] al centre actiu, és un enzim clau en la via principal de producció d'energia formant part del cicle de l'àcid tricarboxílic. L'aconitasa i la IRP1 presenten una seqüència molt similar i existeix la hipòtesi de que es tracta de la mateixa proteïna tot i presentar grans diferències estructurals i funcionals.

El primer objectiu d'aquest treball és determinar si aquestes dues proteïnes realment són una d'única. Per mitjà de mètodes computacionals s'ha estudiat el mecanisme pel qual l'apo-2B3Y pot alterar la seva funció, passant d'una conformació tancada amb el clúster de [4Fe-4S] a una conformació oberta (pròpia de IRP1) sense el clúster. Per tal d'analitzar el canvi de conformació, s'han realitzat simulacions de dinàmica molecular. A partir dels resultats obtinguts, s'ha demostrat que l'aconitasa desenvolupa la capacitat d'obertura. Així, es conclou que la mateixa proteïna duu a terme les dues funcions: unir-se als IREs ARNm per regular els nivells de ferro i assemblar el clúster de [4Fe-4S] actuant com a aconitasa citosòlica. El segon objectiu ha estat determinar l'efecte de mutacions en el canvi de conformació de la proteïna. En aquesta direcció, s'han mutat diversos residus presents a la cavitat d'obertura. L'efecte més significatiu s'ha observat per la doble mutació *S778A_R780Q* la qual reté la proteïna a una conformació tancada similar al PDB 2B3Y. Els residus 778 i 780 juguen un paper important en la transició de l'aconitasa citosòlica a IRP1 essent un factor crític per a l'estudi de malalties relacionades amb el ferro i en l'avanç de tractaments relacionats amb trastorns en el metabolisme del ferro.

RESUMEN

El hierro es un elemento biológicamente esencial para muchas formas de vida ya que forma parte de un gran número de grupos prostéticos de proteínas implicadas en procesos celulares centrales. El contenido de hierro celular debe mantenerse dentro de un rango estrecho para evitar las consecuencias adversas provocadas por la deficiencia o exceso de hierro. El mantenimiento de la homeostasis de hierro celular se consigue mediante la regulación coordinada de absorción, almacenamiento y exportación de hierro por parte de la proteína IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*). La IRP1 (PDB 3SNP) se une a IREs (*Iron Responsive Elements*) en las UTRs de ARNm y regula la codificación de proteínas implicadas en captación, secuestro y exportación de hierro. Por otra parte, la aconitasa citosólica (PDB 2B3Y), que contiene un clúster de [4Fe-4S] en el centro activo, es una enzima clave en la vía principal de producción de energía formando parte del ciclo del ácido tricarboxílico. La aconitasa y la IRP1 presentan una secuencia muy similar y existe la hipótesis de que se trata de la misma proteína pese a las importantes diferencias estructurales y funcionales.

El primer objetivo de este trabajo es determinar si estas dos proteínas realmente son una única. Por medio de métodos computacionales se ha estudiado el mecanismo por el que la apo-2B3Y puede alterar su función, pasando de una conformación cerrada con el clúster de [4Fe-4S] en una conformación abierta (propia de IRP1) sin el clúster. Para analizar el cambio de conformación, se han realizado simulaciones de dinámica molecular. Con los resultados obtenidos, se ha demostrado que la aconitasa desarrolla la capacidad de apertura. Así, se concluye que la misma proteína lleva a cabo las dos funciones: unirse a los IREs ARNm para regular los niveles de hierro y ensamblar el clúster de [4Fe-4S] actuando como aconitasa citosólica. El segundo objetivo consiste en analizar el efecto de mutaciones en el cambio de conformación de la proteína. En esta dirección, se han mutado diversos residuos presentes en la cavidad de apertura. El efecto más significativo se ha observado en la doble mutación *S778A_R780Q* la cual retiene la proteína en una conformación cerrada similar al PDB 2B3Y. Los residuos 778 y 780 juegan un papel importante en la transición de la aconitasa citosólica a IRP1 siendo un factor crítico para el estudio de enfermedades relacionadas con el hierro y en el avance de tratamientos relacionados con trastornos en el metabolismo del hierro.

ABSTRACT

Iron is an essential element for many biological life forms as part of a large number of prosthetic groups of proteins involved in central cellular processes. The cellular iron content should be maintained within a narrow range to avoid the adverse consequences of iron deficiency or excess. The preservation of cellular iron homeostasis is achieved through coordinated regulation of iron absorption, storage and export by protein IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*). IRP1 (PDB 3SNP) binds IREs (*Iron Responsive Elements*) in UTRs of mRNAs that encode proteins involved in the iron recruitment, abduction and export. On the other hand, the cytosolic aconitase (PDB 2B3Y), that contains a cluster [4Fe-4S] at active site, and is a key enzyme in the main energy production pathway being part of the tricarboxylic acid cycle. Aconitase and IRP1 show significant sequence identity and the main hypothesis is that they are both the same protein despite the significant structural and functional differences.

The first objective of this study is to determine whether these two proteins are really the same. By using computational methods, the mechanism by which the apo-2B3Y can alter its function, going from a closed conformation with the [4Fe-4S] cluster to an open conformation without cluster, has been studied in detail. To understand the conformational change, molecular dynamics simulations have been performed. Overall, the results obtained in this work have shown that the enzyme cytosolic aconitase evolves towards an open conformation. Thus, concluding that the same protein performs two functions: in low iron conditions it bind to IREs mRNA acting as IRP1 and in high iron conditions assembles [4Fe-4S] cluster acting as cytosolic aconitase. The second aim of the project consists of analysing the effect of mutations on the aconitase conformational change. In this work, several residues from the opening cavity are mutated. The most significant effects corresponds to the double mutation *S778A_R780Q* which is able to retain the protein in a closed conformation similar to PDB 2B3Y. The residues 778 and 780 play an important role in the transition from cytosolic aconitase to IRP1, being a critical factor in identifying iron-related diseases and in advancing the clinical treatments for such disorders of iron metabolism.

Índex

Introducció 1
Objectives 6
Metodologia 8
Preparació/edició del PDB 2B3Y per a la simulació de dinàmica molecular 8
Introducció de mutacions al PDB 2B3Y 8
Dinàmica molecular (MD) i dinàmica molecular accelerada (aMD) 9
Anàlisis de les dinàmiques moleculars 10
Validació de l'ús de MD i aMD per a l'aconitasa citosòlica 11
Resultats i discussió 12
Anàlisi comparatiu de les estructures PDBs 12
MD i aMD de l'apo-2B3Y i mutants 15
PCA de MD i aMD 18
Estabilitat estructural 19
Interaccions dels residus per a l'obertura de la cavitat 20
Conclusions 24
Future prospects 26
Referències 27

Introducció

El ferro és un element biològicament essencial per a moltes formes de vida ja que forma part d'un gran nombre de grups prostètics de proteïnes implicades en processos cel·lulars centrals, incloent la respiració, la síntesi d'ADN i el transport d'oxigen. En el cos humà, principalment, el ferro es troba present formant complexes amb proteïnes com a components hemo (veure **Figura 1 A**) com és el cas de l'hemoglobina o bé, com a components no-hemo com és el cas de les proteïnes ferro-sofre (veure **Figura 1 B**) (Abbaspour, Hurrell, & Kelishadi, 2014).

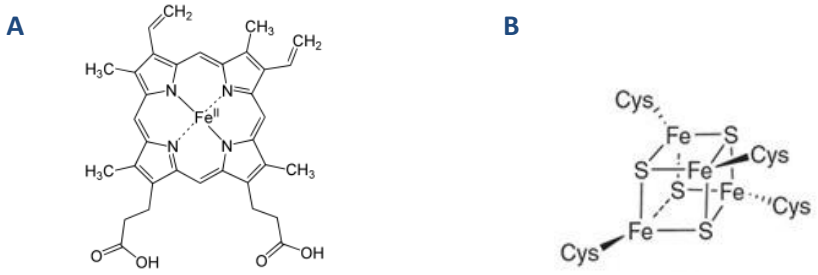


Figura 1 A. Estructura del grup hemo. Cofactor que consisteix en un ió Fe^{2+} contingut en el centre d'un gran anell heterocíclic orgànic anomenat porfirina. **B.** Estructura del clúster [4Fe-4S]. Els centres de Fe solen estar coordinats amb cisteïnes. Component no-hemo.

Degut a la importància del ferro en el nostre organisme és rellevant entendre els mecanismes de regulació d'aquest element. L'absorció intestinal de ferro és un procés altament regulat portat a terme pels enteròcits[1]. El ferro cel·lular és inicialment emmagatzemat dins la proteïna ferritina. És translocat a través dels enteròcits mitjançant la ferroportina que és una proteïna transmembrana encarregada de transportar el ferro des de l'interior de la cèl·lula a l'exterior de la mateixa. Finalment, és exportat al torrent sanguini mitjançant una glicoproteïna anomenada transferrina que juga un paper important en la regulació del transport de ferro des del lloc d'absorció a pràcticament tots els teixits realitzant el procés de forma reversible. La regulació dels receptors de ferritina i transferrina està controlada per l'assemblatge d'un clúster de [4Fe-4S] al centre actiu d'unes proteïnes conegudes com a IRPs (*Iron Regulatory Protein*). La biogènesi d'aquest clúster de ferro-sofre en eucariotes està intervinguda per sistemes de muntatge complexos al mitocondri i citosol. El ferro citosòlic s'utilitza per a la formació de proteïnes que contenen ferro, i el mitocondrial per a la biosíntesi dels clúster ferro-sofre i hemo (Anderson, Shen, Eisenstein, & Leibold, 2012). Un cop formats, els cofactors (grups prostètics) de ferro passen a realitzar funcions de vital importància.

Per altra banda, l'excés de ferro cel·lular catalitza la generació de radicals lliures que poden malmetre proteïnes, DNA i lípids. A més, un excés de ferro també s'uneix a molècules com el citrat on s'acaba acumulant al fetge, que és el principal lloc d'emmagatzematge de ferro. En humans, un excés del contingut de ferro en el cervell s'associa amb diverses malalties hereditàries neurodegeneratives així com la malaltia de l'Alzheimer i del Parkinson (Fleming & Ponka, 2012). D'altra altra banda, la deficiència de ferro cel·lular afecta a la proliferació

[1] Enteròcits, o cèl·lules absorbents del budell, són un dels quatre principals tipus de cèl·lules de l'epiteli intestinal. Es troben en l'intestí prim i en el còlon. Fan la digestió i el transport de molècules des del lumen intestinal. També tenen funció secretora (Ross & Pawlina, 2006).

cel·lular. Afecta a milers de milions de persones a tot el món i resulta en dèficits cognitius en nens i anèmia en els adults (Anderson et al., 2012). Per això, el contingut de ferro s'ha de mantenir dins d'un rang estret per evitar les conseqüències adverses de la deficiència o excés de ferro. El control de l'absorció a partir de la dieta, és important perquè el cos no pot eliminar fàcilment l'excés de ferro una vegada absorbit. Qualsevol desequilibri en l'absorció intestinal o distribucions defectives causa desordres com l'hemocromatosi o l'anèmia (Tong & Rouault, 2007). Per tal d'entendre i poder combatre d'una forma eficient aquestes malalties, cal comprendre el mecanisme de regulació del ferro a nivell molecular. El manteniment de l'homeòstasi de ferro cel·lular s'aconsegueix mitjançant la regulació coordinada de l'absorció de ferro, l'emmagatzematge i l'exportació per les proteïnes IRP1 i IRP2 (*Iron Regulatory Protein 1 i 2*).

Les IRP1 i IRP2 són les principals proteïnes reguladores de l'homeòstasi de ferro cel·lular en vertebrats. La IRP1/2 modula l'expressió de les proteïnes involucrades en el metabolisme del ferro mitjançant la unió de les estructures *stem-loop* conservades anomenades IREs (*Iron Responsive Elements*) en les regions no traduïdes (UTRs) de l'ARNm que codifiquen proteïnes implicades en la captació, el segrest (ferritina) i l'exportació (ferroportina) de ferro. La IRP1 exerceix una regulació post-transcripcional tant promovent com prevenint la traducció en funció de les necessitats del cos humà. El PDB (*Protein Data Bank*) de l'estructura corresponent a la IRP1 és 3SNP (veure **Figura 3 B** i **D**).

La regulació del metabolisme del ferro cel·lular (veure **Figura 2**) es pot classificar segons la concentració de ferro present en el cos humà (Hentze, Muckenthaler, Galy, & Camaschella, 2010):

- **Deficiència de ferro.** La unió de IRP1/2 en l'extrem 5' UTR IREs de l'ARNm de ferritina i ferroportina reprimeix la traducció. I la unió en l'extrem 3' UTR IREs de l'ARNm de TfR1 (*transferrin receptor protein*) pot indirectament activar la traducció a través de la supressió de la degradació d'ARNm.
- **Excés de ferro.** La IRP no s'uneix a IREs. Es degrada la IRP2 mentre que la IRP1 s'uneix a un grup [4Fe-4S] per realitzar la funció d'aconitasa citosòlica. Augmenta la síntesi de ferritina i ferroportina, mentre que es promou la degradació d'ARNm de TfR1.

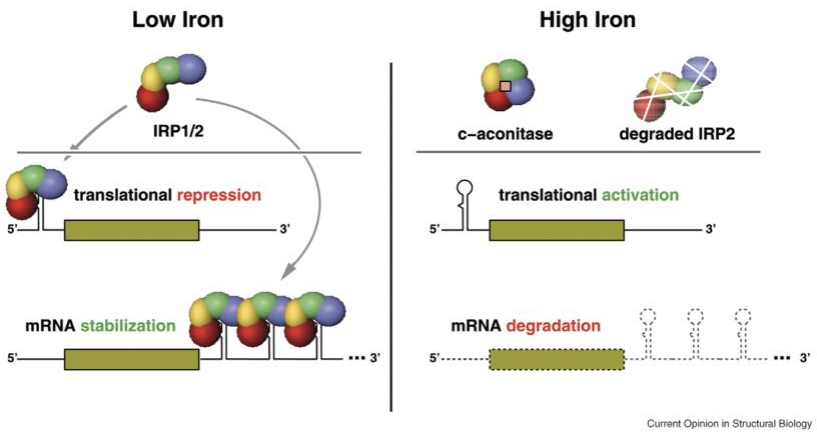


Figura 2 Regulació del metabolisme del ferro mitjançant IRPs. Imatge extreta de Volz, 2008. **Esquerra:** condicions deficients de ferro que permeten la unió dels IRPs als *stem-loop* IREs, resultant en la repressió (superior) o activació (inferior). **Dreta:** condicions en excés de ferro causen l'alliberament dels IRPs, revertint els efectes anteriors.

La presència del cofactor de [4Fe-4S] sembla jugar un paper determinant en la regulació del ferro. El desassemblatge del clúster [4Fe-4S] del centre actiu de la proteïna dirigeix IRP1 de nou a la forma apo d'alta afinitat als IREs. Els factors que faciliten aquest procés són la deficiència de ferro/disponibilitat hemo, la fosforilació, i les espècies reactives d'oxigen i nitrogen. El principal mitjà de IRP1 per "canviar" és la via ferro-dependent, si el cos té dèficit de ferro, el clúster de ferro-sofre no es pot sintetitzar, activant d'aquesta manera els mecanismes de regulació del ferro descrits anteriorment. La fosforilació de la proteïna es pot considerar una forma indirecta de desestabilització del clúster, mentre que les petites molècules d'òxids i altres espècies reactives que apareixen durant l'estrès oxidatiu es creu que actuen a través de l'atac directe al clúster. Els diferents tipus de pertorbacions en el clúster de [4Fe-4S] poden ocórrer simultàniament, i més enllà de promoure la forma apo-IRP1, en última instància, pot conduir a la degradació de la IRP1 (Wallander, Leibold, & Eisenstein, 2006). L'assemblatge i desassemblatge del clúster de [4Fe-4S] sembla ser un mecanisme efectiu per la regulació de l'activitat de la IRP1 (i per tant, de la regulació dels nivells de ferro) que s'associa amb canvis estructurals importants que afecten a tota l'estructura de la proteïna. Com es veurà més endavant, aquest fet està representat per un intercanvi entre les dues conformacions funcionals de la proteïna IRP1.

La regulació coordinada de la xarxa IRE/IRP1 permet a les cèl·lules respondre de forma equilibrada assegurant que les cèl·lules adquireixen el ferro adequat per a les seves necessitats a les múltiples senyals de disponibilitat i demanda de ferro, sense arribar a nivells tòxics.

La IRP1 presenta doble funcionalitat regulada per la presència d'un clúster de [4Fe-4S] al centre actiu de l'enzim. Quan la proteïna no disposa del clúster [4Fe-4S], s'uneix a l'ARN i participa directament en la regulació del ferro. En canvi, sorprenentment, quan la IRP1 disposa del clúster és capaç de realitzar la mateixa funció que una proteïna coneguda com aconitasa citosòlica. La distribució de IRP1 entre aquestes activitats mútuament exclusives no requereix la síntesi de nova proteïna; senzillament un excés o dèficit de ferro és el responsable de promoure la funció d'aconitasa citosòlica o l'activitat d'unió a ARN, respectivament.

Al comparar la seqüència de la proteïna IRP1 i de l'aconitasa citosòlica s'ha vist que aquestes dues proteïnes, sorprenentment, tenen la mateixa seqüència d'aminoàcids (Volz, 2008). Fet que sembla indicar que la IRP1 i l'aconitasa citosòlica són la mateixa proteïna, tot i que prèviament no havien estat relacionades. Sota condicions normals fisiològiques, la IRP1 sembla estar present com a aconitasa citosòlica en teixits (Meyron-Holtz, Ghosh, & Rouault, 2004). La IRP1 i l'aconitasa citosòlica es componen d'una única cadena proteica que es plega en quatre dominis i un segment enllaçador (*linker*) situat a la superfície de la proteïna que s'uneix als dominis 3 i 4 (veure **Figura 3**).

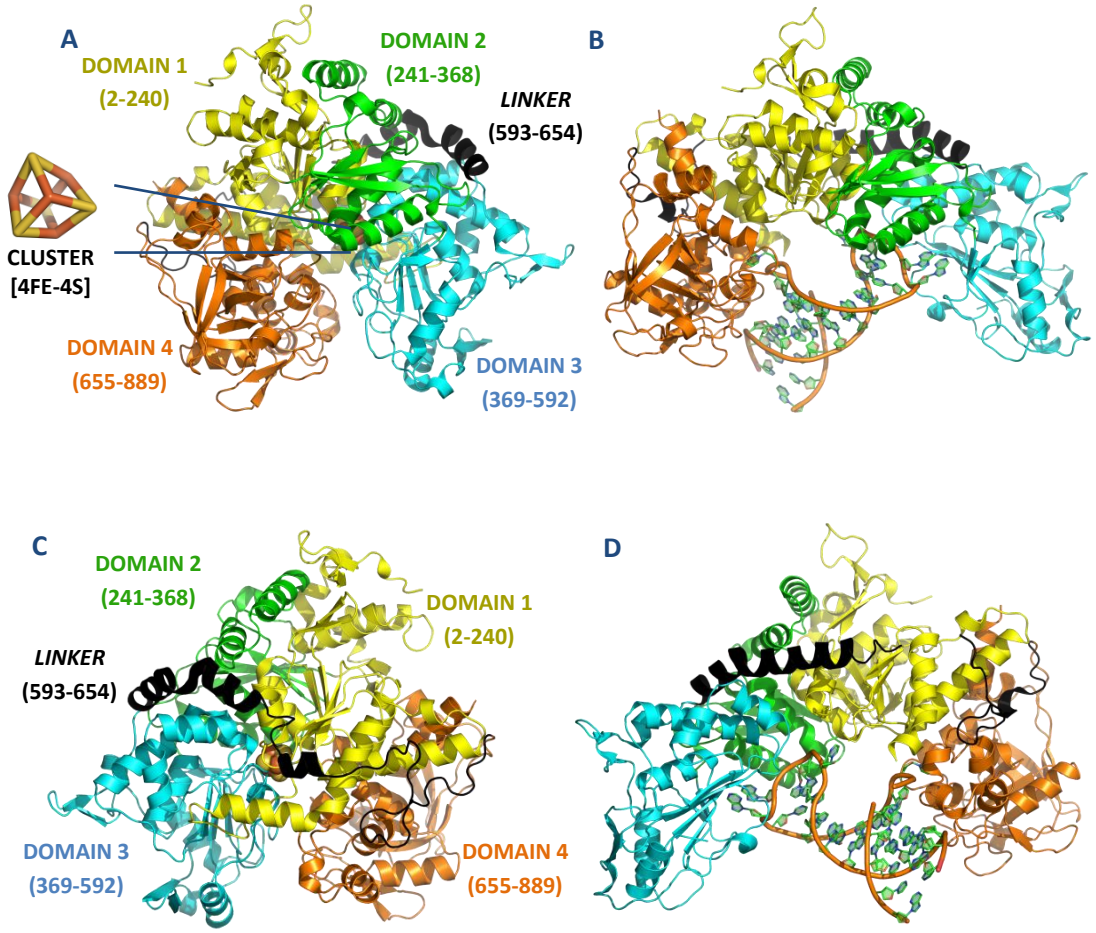


Figura 3 Organització dels dominis: domini 1 (groc) presenta els residus 2-240, domini 2 (verd) presenta els residus (241-368), domini 3 (blau) presenta els residus 369-592, *linker* (negre) presenta els residus de 593-654 i domini 4 (taronja) presenta els residus 655-889A. Les quatre figures s'han realitzat mitjançant PyMOL (DeLano, 2002). **A.** Plegament polipeptídic de l'aconitasa citosòlica humana (PDB 2B3Y) en visió frontal. El clúster [4Fe-4S] central de la molècula es mostra en mode esfera de color taronja i groc (i en ampliació a l'esquerre de la imatge) **B.** Plegament polipeptídic de IRP1(PDB 3SNP) en visió frontal. Es presenta la molècula d'ARNm associat. **C.** Plegament polipeptídic de l'aconitasa citosòlica humana (PDB 2B3Y) en visió oposada. El clúster [4Fe-4S] central de la molècula es mostra en mode esfera de color taronja i groc. **D.** Plegament polipeptídic de IRP1 (PDB 3SNP) en visió oposada. Es presenta la molècula d'ARNm associat.

L'aconitasa citosòlica és un enzim clau en la via principal de producció d'energia. Forma part del cicle de l'àcid tricarboxílic, catalitzant la isomerització de citrat a isocitrat en el citoplasma (Dupuy et al., 2006). El PDB corresponent és el 2B3Y. L'aconitasa citosòlica no s'uneix a l'ARN. En la seva forma activa conté un clúster de ferro-sofre [4Fe-4s] el quals hi ha tres residus de cisteïna (CYS 437, 503 i 506)[2] que estan involucrades en la unió d'aquest clúster (Volz, 2008). Els dominis es tanquen com un trencanous al voltant del centre actiu, que conté un clúster [4Fe-4S] que ajuda a catalitzar la reacció (veure **Figura 3 A** i **C**). Amb el clúster de [4Fe-4S], l'aconitasa adopta una conformació tancada que li permet enllaçar-se amb el citrat i catalitzar la conversió de citrat a isocitrat. L'accessibilitat del substrats es troba restringida, impedint l'accés i l'alliberament dels substrats de l'àcid tricarboxílic i els productes del centre actiu. Es creu que l'accés al domini actiu pot ser generat a través d'un moviment del domini 4 respecte els altres dominis, tal i com es proposa per l'aconitasa mitocondrial (Beinert, Kennedy, & Stout,

[2] La seqüència d'aminoàcids de l'aconitasa citosòlica és de 2-889 aminoàcids.

1996). La part principal del domini 4, anomenat domini 4a, està format pels residus 660-865. Aquest subdomini fa un contacte extensiu i principalment polar interaccionant amb als dominis 1-3. En canvi, el subdomini 4b format pels residus 866-889, està empaquetat contra el domini 1, però, en aquest cas els contactes són majoritàriament de naturalesa hidrofòbica. Els dominis 1-3 estan fixats, i únicament els moviments del cos rígid són aplicats al domini 4a (Dupuy et al., 2006).

L'aconitasa citosòlica només té activitat catalítica quan les concentracions de ferro són altes (a nivells normals), és a dir, quan hi ha suficient ferro al cos humà per sintetitzar el clúster de [4Fe-4S]. Si les concentracions de ferro decauen massa, l'aconitasa citosòlica perd el clúster [4Fe-4S] i la seva activitat enzimàtica, prenent una nova funció (actua com a IRP1). Quan l'aconitasa citosòlica canvia per convertir-se a IRP1 perd el clúster de [4Fe-4S] al centre actiu de l'aconitasa, i s'enllaça a fragments d'ARN activant la síntesi de proteïnes lligades amb el transport i emmagatzematge de ferro. D'aquesta manera el cos humà pot regular els nivells de ferro en sang. Tal i com es pot veure a la **Figura 3**, per tal d'unir-se a ARN, la proteïna necessita trobar-se en una conformació oberta, molt diferent de la conformació tancada de l'aconitasa citosòlica. El mecanisme per el qual l'aconitasa pot canviar la seva conformació a IRP1 i realitzar dues funcions és encara desconegut.

L'aconitasa citosòlica té mutacions conegudes (Philpott, Klausner, & Rouault, 1994). Les que són de gran interès per aquest treball es mostren a la **Taula 1**. Aquestes poden afectar a l'activitat aconitasa i també a la unió a ARN, podent estar implicades a les malalties anteriorment esmentades provocant una desregulació de l'enzim.

Taula 1 Mutacions realitzades al PDB 2B3Y_B amb les característiques observades en l'article "*The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation*": *R780Q*, *S778A*, *R536Q* i *R541Q* (Philpott et al., 1994).

Mutació	**Aminoàcid *wild type***	**Aminoàcid mutant**	**Descripció** (Philpott et al., 1994)
R780Q	Arginina (Arg, R)	Glutamina (Gln, Q)	Gairebé suprimeix la unió a ARN Pèrdua completa de l'alta afinitat d'unió
S778A	Serina (Ser, S)	Alanina (Ala, A)	Sense efecte en la unió d'ARN regulat pel ferro Pèrdua d'activitat de l'aconitasa
R536Q	Arginina (Arg, R)	Glutamina (Gln, Q)	Redueix fortament la unió a ARN, indicant que la càrrega de la cadena lateral és important en la interacció del residu amb l'IRE
R541Q			Redueix fortament la unió a ARN

Objectives

The role of IRP1 as cytosolic aconitase in animal cells has been overshadowed by the focus on its function as a regulator of gene expression. In fact, IRP1 exists predominantly as cytosolic aconitase in some tissues. IRP1 undergoes multiple modes of post-translational regulation, including cluster assembly/disassembly, functional switching, and modifications by iron, heme, phosphorylation, and reactive oxygen and nitrogen species. This complex combination of factors signals the iron balance and stress level within the eukaryotic cell to determine the functional fate of IRP1. The connection between the apo iron regulatory form (IRP1) and the catalytic form (as cytosolic aconitase) is still completely unknown.

The first aim of this work is to study through computational methods the mechanisms by which the apo-cytosolic aconitase can alter its function, going from a closed conformation with a [4Fe-4S] cluster in the active site to an opened conformation without iron-sulphur cluster. To this end, molecular dynamics and accelerated molecular dynamics simulations of the mammalian cytosolic aconitase (PDB 2B3Y) will be performed to understand the conformational changes that take place in this intricate process. We aim to investigate the changes that allow the IRP1 protein changing the conformation and binding the IRE to become a regulator of the translation of mRNA coding proteins that are directly involved in iron homeostasis. **Figure 4** shows the structures of the three conformations: the functional cytosolic aconitase, the IRP1:IRE complex, and the hypothetic intermediate step (apo-cytosolic aconitase) by Volz, 2008. On the left there is the complex IRP1: IRE (PDB 3SNP) showing the core, domain 3, domain 4 and RNA domain; and on the right there is the cytosolic aconitase (PDB 2B3Y) with the 4 domains. Here, we pretend to find out the mechanism by which the cytosolic aconitase in the absence of the ligand [4Fe-4S] (right), can alter the structure to form the complex IRP1: IRE (left). Thus, we pretend to identify the structure of the apo form.

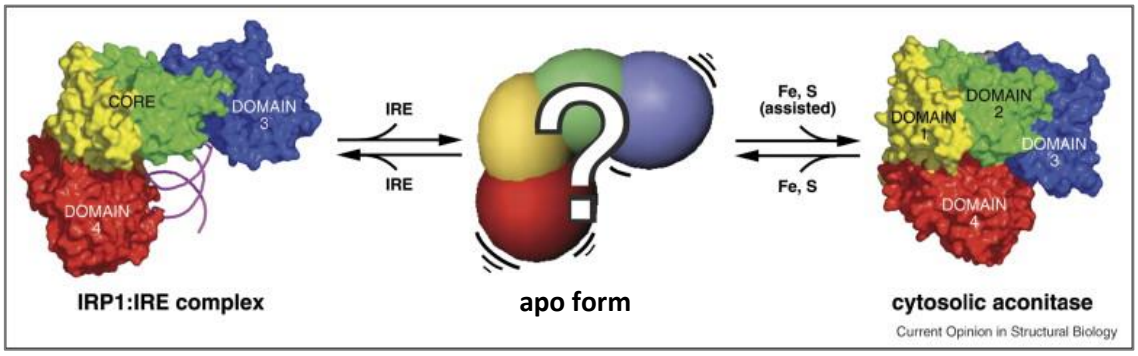


Figure 4 Structures of the two functional conformations of IRP1. Image modified and extracted by Volz, 2008. **Left:** complex IRP1: ferritin H IRE RNA (PDB 3SNP). **Centre:** cartoon of apo-IPR1, suggesting a dynamic, open conformation. **Right:** cytosolic aconitase (PDB 2B3Y). The Fe-S cluster is in the centre of the molecule, hidden from view, accessible by solvent channels between domain 4 and the other domains. Left and right figures done with PyMOL (DeLano, 2002).

A number of questions arise concerning the molecular mechanism of the IRP1 structural transformation. What does determine which conformation the IRP1 assumes? Is the apo form of cytosolic aconitase dynamic and flexible, or does it have a restricted conformation that

could influence the direction of the structural transition? And, finally, is the apo form less compact than cytosolic aconitase revealing a more open conformation?

This work will study the structural biology and protein dynamics of the two functional states of IRP1, and also discuss the implications of protein sequence variations among the IRP1. Whilst research has long focused on grasping the 'sequence-to-structure' relationship, structure can only provide a cursory understanding of a proteins function (Markwick & McCammon, 2011). Unveiling the role of protein dynamics is crucial to understand protein function.

First, BLAST will be used to confirm the similarity between the two proteins (PDB 2B3Y and 3SNP). Then, to study the intermediate apo form the principal component analysis of the molecular dynamics trajectory will be performed to identify the areas of more fluctuation and RMSD will be used to study the global protein stability. The challenge of working with these structures is that they are usually different in composition (containing different numbers of atoms, residues, chains, ligands, structures, conformations and so on) but these differences are what make this analysis more interesting.

The second aim of the project consists of analysing the effect of a number of mutations on the aconitase flexibility and dynamics. In this work, we aim to determine the residues that are able to change the protein activity by introducing mutations associated with residues that make hydrogen bond between domains 3 and 4 in the wild type form. With molecular dynamics simulations we pretend to determine the effect of each mutation, either globally or in active-site of the protein. Alterations of the active cytosolic aconitase may lead to a decrease in the interaction with citrate (substrate) or [4Fe-4S] cluster hereby blocking the function of aconitase in the citric acid cycle. On the other hand, some mutations may restrict the high flexibility of aconitase preventing the opening of the protein. This will prevent the protein to bind the IREs and to participate in the regulation of iron homeostasis leading to iron related diseases.

A better understanding of how iron contributes to neurodegeneration is needed with the goal of developing safer and effective therapies to treat these disorders. In order to maintain optimal health, the concentration and distribution of iron must be tightly controlled to provide enough to meet cellular requirements while avoiding excessive levels that are toxic. Understanding the tissue and cell-type specific processes underlying the control of iron homeostasis remains a critical factor in identifying iron-related diseases and in advancing the clinical treatments for such disorders of iron metabolism.

Metodologia

En l'apartat de metodologia es descriuen les tècniques utilitzades en aquest treball. Primer de tot, s'ha editat el PDB 2B3Y per a la simulació de dinàmica molecular (MD) per tal d'eliminar els lligands i afegir hidrògens. La introducció de les mutacions per aquest mateix PDB s'ha realitzat a través de *PyMOL* per tal d'estudiar els efectes dels residus seleccionats. A continuació, s'ha procedit a realitzar les simulacions de la dinàmica molecular (MD) i, posteriorment, la dinàmica molecular accelerada. Finalment, l'anàlisi d'aquestes simulacions s'ha fet principalment mitjançant *VMD* i Bio3D.

Preparació/edició del PDB 2B3Y per a la simulació de dinàmica molecular

Per tal d'estudiar el moviment d'una proteïna mitjançant simulacions de dinàmica molecular cal una estructura tridimensional de partida. En aquest cas, es parteix del PDB 2B3Y (Dupuy et al., 2006) corresponent a l'aconitasa citosòlica per a les simulacions de dinàmica molecular. L'estructura tridimensional del PDB associat a aquesta proteïna presenta una resolució de 1,85 Å mitjançant la difracció de raigs X. Les estructures cristal·lines de proteïnes normalment s'obtenen per co-cristal·lització o estan acomplexades amb altres lligands no proteics. Les dues cadenes (A i B) que inclou el PDB 2B3Y contenen lligands diferents per a cadascuna d'elles (glicerol, àcid fòrmic, ió acetat i clúster de [4Fe-4S]). S'ha escollit treballar a partir de la cadena B la qual conté el clúster [4Fe-4S], àcid fòrmic i ió acetat com a lligands no proteics.

Un cop escollit el PDB de partida, cal preparar l'estructura per a poder ser utilitzada en programes de dinàmica molecular. *PyMOL* és un paquet de gràfics moleculars utilitzat per visualitzar, seleccionar, etiquetar i modificar biomolècules i residus (DeLano, 2002). Mitjançant aquest programa, doncs, s'han extret els diferents lligands presents en la cadena B de la molècula per tal d'obtenir l'apoenzim que correspon a l'enzim sense el seu grup prostètic característic que servirà com a punt de partida per a les simulacions computacionals.

Com que, en general, les estructures tridimensionals de les proteïnes obtingudes per difracció de raigs X no contenen hidrògens, a l'estructura de l'apoenzim s'hi han afegit aquests mitjançant *H++ server* (Anandakrishnan, Aguilar, & Onufriev, 2012). Aquest servidor web és un sistema automatitzat per a l'addició d'hidrògens absents a les estructures PDB basat en la predicció dels valors de pKa dels grups ionitzables d'acord amb el pH especificat, generant arxius que serviran de punt de partida per a les simulacions de MD (Anandakrishnan et al., 2012).

Introducció de mutacions al PDB 2B3Y

En aquest treball es pretén estudiar l'efecte de diferents mutacions a l'estructura, dinàmica i funció de l'aconitasa. En questa direcció, a més de la proteïna apo-2B3Y, s'han realitzat rèpliques d'apo amb mutacions a determinats residus. Les mutacions han estat realitzades amb el programa *PyMOL.* Per tal d'analitzar l'efecte de les mutacions a la proteïna aconitasa, han estat seleccionats els residus que formen enllaços d'hidrogen o ponts salins dins la cavitat d'obertura de l'aconitasa citosòlica. Per a la determinació dels enllaços d'hidrogen s'ha utilitzat UCSF Chimera. Aquest és un programa altament utilitzat per a la visualització i l'anàlisi de les estructures moleculars (Pettersen et al., 2004). Un cop introduïda la mutació, s'ha dut a terme

el mateix procediment que l'apo 2B3Y de l'aconitasa citosòlica per a la preparació de l'estructura de partida per a la simulació de la dinàmica molecular.

Dinàmica molecular (MD) i dinàmica molecular accelerada (aMD)

La funció de les macromolècules biològiques ve determinada no només per l'estructura tridimensional, sinó també per la seva dinàmica. Les proteïnes són sistemes altament flexibles per naturalesa que mostren una àmplia gamma de moviments en escales de temps que van des de picosegons a segons (Markwick & McCammon, 2011). Molts processos biològics importants com per exemple la regulació al·lostèrica, el canvi de conformació d'una proteïna o el plegament d'una proteïna succeeixen a l'escala de temps de micro a milisegons. Aquests processos dinàmics són molt difícils d'estudiar experimentalment. És per aquest motiu, que l'ús de tècniques computacionals com la dinàmica molecular suposen una gran ajuda per entendre el mecanisme per el qual tenen lloc aquests fenòmens. La dinàmica molecular és un mètode àmpliament utilitzat per a la simulació de processos d'activació de proteïna, per al disseny de nous fàrmacs i per simular el plegament de proteïnes (Dror, Dirks, Grossman, Xu, & Shaw, 2012).

Tot i el ràpid increment de potència computacional disponible i el desenvolupament d'algoritmes de simulació eficients, les simulacions de dinàmica molecular (MD) de proteïnes són generalment limitades a escales de temps de desenes a centenars de nanosegons. La superfície d'energia potencial d'una proteïna, consta de molts mínims d'energia separats per barreres energètiques (estats de transició) de diferent magnitud. Els processos biològics que tenen lloc en escales de temps de l'ordre de microsegons estan separats per barreres d'energia elevades que difícilment són superades al llarg d'una simulació de dinàmica molecular. Això fa que un gran nombre de processos que tenen lloc en escales de temps superior als centenars de nanosegons no puguin ser estudiats per mitjà de la dinàmica molecular convencional. Per tal de solucionar aquesta limitació, existeixen tècniques que permeten accelerar la dinàmica d'una proteïna. Entre elles, la dinàmica molecular accelerada (aMD), introduïda pel grup del Prof. McCammon a la UCSD, és un tècnica que permet modificar la superfície d'energia potencial d'una proteïna i accelerar l'estudi computacional de diversos fenòmens biològics com el canvi de conformació o plegament de proteïnes. L'aMD és una tècnica que permet l'estudi eficient dels sistemes biomoleculars de fins escales de temps de diversos ordres de magnitud més gran (de micro a milisegons) que els accessibles utilitzant mètodes estàndards de MD clàssics (limitats a centenars de nanosegons), mentre que encara manté una representació totalment atomista del sistema (Markwick & McCammon, 2011). En aquest treball s'utilitzarà la tècnica aMD per a simular el canvi de conformació de la proteïna aconitasa en absència del cofactor Fe-S, un procés que requereix l'ordre de microsegons.

L'aMD simula la transició entre estats de la proteïna separats per barreres d'alta energia sense cap coneixement previ de la ubicació dels pous d'energia potencials o estats de transició que els separen. En aquest mètode, la superfície d'energia potencial es veu alterada per l'addició d'un potencial extra sobre el veritable potencial. De tal manera que és més fàcil escapar dels pous d'energia potencial, el que accelera i estén l'escala de temps en simulacions de dinàmica molecular permetent el càlcul d'evolucionar molt més ràpid (Hamelberg, Mongan, & McCammon, 2004). Aquest mètode pot treballar tant en la reducció de les barreres com en

l'augment dels mínims. Els únics paràmetres addicionals necessaris que s'especificaran en una simulació d'aMD són:

a. EthreshP. Mitjana de llindar de potencial total d'energia.
b. alphaP. Factor d'impuls de força inversa per a l'energia potencial total.
c. EthreshD. Mitjana de llindar d'energia diedre.
d. alphaD. Factor d'impuls de força inversa per a l'energia diedre.

Les simulacions de dinàmica molecular de les diferents estructures apo i apo-mutants s'han realitzat a través d'un dels superordinadors més potents del Centre de Supercomputació de Barcelona (BSC-CNS) anomenat MinoTauro. El programa utilitzat per realitzar les simulacions s'anomena AMBER.

Anàlisis de les dinàmiques moleculars

Els diferents arxius *.mdcrd* generats a partir de les simulacions de les dinàmiques moleculars amb MinoTauro, són visualitzats a través d'un programa de visualització molecular dissenyat per a la modelització, visualització i anàlisis dels sistemes biològics anomenat VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). S'ha utilitzat per animar i analitzar la trajectòria de les simulacions MD i aMD. A més, s'ha utilitzat per mesurar els àngstroms de distància entre un residu i un altre. Per determinar l'obertura general de la molècula s'ha mesurat un àtom de cada vèrtex de la proteïna (ARG269, CYS506 i GLU800).

L'anàlisi de l'estructura, de la trajectòria i del component principal s'han realitzat mitjançant el programa Bio3D (paquet R) (Skjærven, Yao, Scarabelli, & Grant, 2014).

L'anàlisi del component principal (PCA) és una tècnica matemàtica que permet identificar patrons en conjunts de complexes de dades, i expressar les dades d'una manera determinada per tal de destacar les seves similituds i diferències. Aquest mètode és molt utilitzat en biologia ja que proporciona una considerable percepció en la naturalesa de les diferències conformacionals entre biomolècules a partir dels components principals resultants (vectors propis ortogonals) que descriu els eixos de variància màxima de la distribució de les estructures. La projecció de la distribució de dades en l'espai definit pels majors components principals resulta en una representació dimensional inferior del conjunt de dades estructurals. El percentatge de desplaçament total quadràtic mitjà (o la variància) de les fluctuacions d'àtoms posicional capturats en cada dimensió es caracteritza pel seu corresponent valor propi. Per tant, un grapat de components principals són suficients per proporcionar una descripció útil alhora que conserva la major part de la variació en la distribució original (Grant, Rodrigues, ElSawy, McCammon, & Caves, 2006). En aquest treball les dades corresponen a l'estructura tridimensional de les proteïnes obtingudes en diferent conformacions i a cada un dels fotogrames de la trajectòria de la dinàmica molecular.

Per a l'anàlisi del canvi estructural al llarg de la simulació de dinàmica molecular, s'ha utilitzat el valor de RMSD (*Root mean-square deviation*). Aquest es pot calcular durant el curs d'una simulació de dinàmica molecular i ser utilitzat com una mesura de l'estabilitat conformacional de l'estructura. És l'estàndard de la distància estructural mitjana entre conjunts de coordenades dels àtoms d'una proteïna superimposada (Haider, Parkinson, & Neidle, 2008). Com més gran és el RMSD, major és la desviació respecte l'estructura inicial. La hipòtesi és que

les simulacions en les quals la proteïna s'obri, el RMSD augmentarà considerablement, mentre que les simulacions en les quals la proteïna es mantingui en la conformació tancada, el RMSD serà baix.

Validació de l'ús de MD i aMD per a l'aconitasa citosòlica

Per tal de valorar l'ús de dinàmica molecular clàssica (MD) o dinàmica molecular accelerada (aMD) s'ha realitzat un test partint de la conformació apo de la proteïna 2B3Y. A la **Figura 5** es presenta la projecció de les conformacions de la simulació de la trajectòria de dinàmica molecular corresponent del *test-apo* (acolorit de blau a vermell en l'ordre del temps) en l'espai dels components principals (PC) proporcionant una representació bidimensional. S'ha desenvolupat la simulació de MD fins aproximadament 100 ns (**Figura 5 A**) i, a continuació, s'ha canviat de simulació utilitzant el mètode aMD fins arribar aproximadament 200 ns en total (**Figura 5 B**). Aquest *test-apo* s'ha utilitzat per a la validació del mètode. Com es pot veure a la **Figura 5 A**, l'àrea explorada per la simulació MD és molt menor a l'explorada amb aMD. El canvi de mètode a aMD permet a la molècula sortir dels possibles pous d'energia potencials d'on es trobava atrapada. Això es pot observar a partir de l'anàlisi dels components principals (veure Resultats i discussió). En aquest treball s'utilitza una combinació dels dos mètodes per estudiar el mecanisme d'obertura de l'aconitasa.

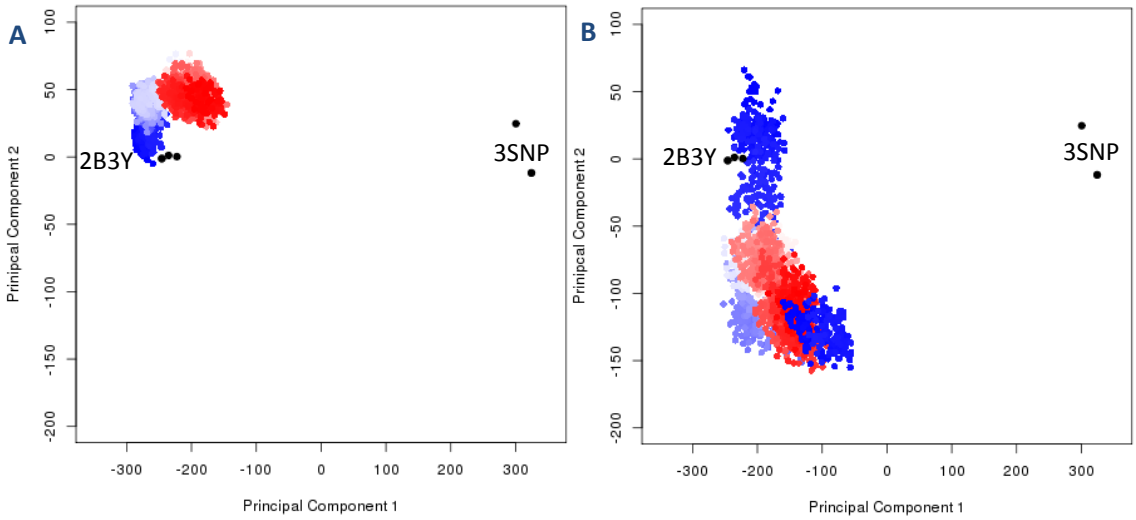


Figura 5 Projecció de les conformacions de la simulació de la trajectòria del *test-apo* (acolorit de blau a vermell en l'ordre del temps) en l'espai dels components principals (PC) proporcionant una representació bidimensional de la presa de mostres de les conformacions al llarg de la simulació. **A.** Simulació de la trajectòria de MD. **B.** Simulació de la trajectòria de aMD.

Resultats i discussió

L'apartat de resultats i discussió està dividit en els següents apartats. En primer lloc, s'ha realitzat l'anàlisi comparatiu de les estructures PDBs homòlogues al PDB 2B3Y per tal de poder entendre el canvi de conformació que realitza la proteïna. A continuació, s'ha dut a terme les simulacions de dinàmica molecular (MD) i dinàmica molecular accelerada (aMD) per tal de determinar si l'aconitasa citosòlica canvia de conformació en absència del cofactor Fe-S. Aquestes simulacions també s'han realitzat amb les mutacions escollides. Seguidament, s'ha efectuat l'anàlisi dels components principals de les simulacions pels dos mètodes de dinàmica molecular per tal d'estudiar els canvis conformacions més rellevants experimentats per la proteïna. L'anàlisi de l'estabilitat estructural al llarg de la simulació s'ha dut a terme per a la determinació de l'estabilitat estructural mitjana respecte l'estructura de partida. I finalment, s'ha realitzat l'estudi de les interaccions entre residus compresos a la cavitat d'obertura per tal de definir la seva influència en el canvi de conformació.

Anàlisi comparatiu de les estructures PDBs

Per entendre el canvi de conformació de la proteïna cal primer analitzar les diferents estructures cristal·logràfiques d'aquesta proteïna a partir d'estructures homòlogues. La comparació de les estructures homòlogues del PDB 2B3Y s'ha realitzat a partir de la superposició estructural de múltiples PDBs i l'anàlisi dels components principals (PCA) d'aquests. S'ha utilitzat el servidor BLAST per consultar la base de dades PDB i trobar seqüències similars al PDB 2B3Y a partir d'un tall (*cutoff*) de 240 bits. Com a resultat, s'han trobat sis estructures PDB homòlogues a l'aconitasa citosòlica dividides segons les seves corresponents cadenes: 2B3X_A, 2B3Y_A, 2B3Y_B, 3SNP_A, 3SNP_B i 3SN2_A. Les tres primeres estructures corresponen a la conformació tancada de l'aconitasa (veure **Figura 3 A** i **C**), mentre que les tres darreres a la conformació oberta les quals es troben enllaçades a l'ARN (veure **Figura 3 B** i **D**). A part de la diferència de conformació, aquestes estructures tenen una composició diferent entre elles (lligands, cadenes, nombre d'àtoms i seqüència) i aquestes diferències són de gran interès. En la **Taula 2** es mostren els càlculs d'identitat de seqüència entre els diferents models. Les estructures corresponents a la conformació tancada presenten exactament la mateixa seqüència d'aminoàcids (identitat de seqüència 1,000). No obstant, les estructures de la conformació oberta (3SNP i 3SN2) difereixen relativament tot i que les dues cadenes de 3SNP són idèntiques. Tot i això, la diferència màxima entre els PDBs és del 6,2%. Aquestes diferències són degudes a petits canvis en aminoàcids i a parts de la proteïna (*gaps*) en conformació oberta (3SNP i 3SN2) que no s'han pogut resoldre a través de la difracció de raigs X. Les diferents estructures presenten les següents resolucions[3]: 2B3Y (1,85 Å), 2B3X (2,54 Å), 3SNP (2,80 Å) i 3SN2 (2,99 Å).

[3] Les estructures cristal·logràfiques que tenen valors propers a 0 Å presenten altes resolucions.

Taula 1 Càlcul d'identitat de seqüència entre les diferents cadenes dels PDBs: 2B3X_A, 2B3Y_A, 2B3Y_B, 3SNP_A, 3SNP_B i 3SN2_A.

Càlcul d'identitat de seqüència						
	2B3X_A	**2B3Y_A**	**2B3Y_B**	**3SNP_A**	**3SNP_B**	**3SN2_A**
2B3X_A	1,000	1,000	1,000	0,939	0,939	0,938
2B3Y_A	1,000	1,000	1,000	0,939	0,939	0,938
2B3Y_B	1,000	1,000	1,000	0,939	0,939	0,938
3SNP_A	0,939	0,939	0,939	1,000	1,000	0,999
3SNP_B	0,939	0,939	0,939	1,000	1,000	0,999
3SN2_A	0,938	0,938	0,938	0,999	0,999	1,000

Degut a les notables diferències entre la conformació oberta i tancada (veure **Figura 3**), s'han utilitzat rondes d'iteracions de superposició estructural per identificar la regió estructuralment més invariant de les sis estructures cristal·lines anteriorment esmentades. Aquest procediment exclou aquells residus amb les majors diferències posicionals (mesurat com un el·lipsoide de variància determinat a partir de les coordenades cartesianes per equivalents d'àtoms de carboni alfa de cada PDB), abans de cada ronda de superposició, fins que només romanen els residus invariants "centrals" (de Oliveira, Grant, Zhou, & McCammon, 2011). Aquest nucli estructuralment invariant consisteix principalment de residus dins d'elements de l'estructura secundària i és utilitzat com el marc de referència per a la superposició de les estructures cristal·lines. Els aminoàcids que no es troben dins la regió invariant corresponen a les parts flexibles de la proteïna associades als canvis de conformació. A la **Figura 6** es mostren 230 posicions corresponents al *core* (d'un total de 888 aminoàcids) les quals principalment pertanyen al domini 1, *linker* i domini 4.

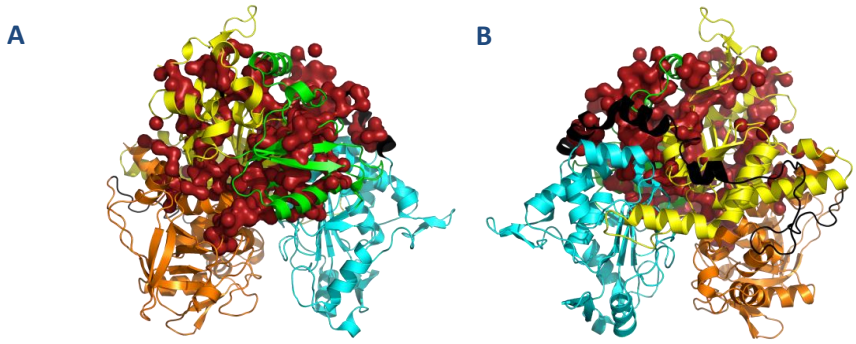


Figura 6 Visualització dels residus del *core* en format superfície de color vermell. S'ha obtingut a partir de rondes d'iteracions de superposició estructural de les estructures homòlogues a l'aconitasa citosòlica segons les seves corresponents cadenes: 2B3X_A, 2B3Y_A, 2B3Y_B, 3SNP_A, 3SNP_B i 3SN2_A. El *core* s'ha sobreposat en l'estructura PDB 2B3Y la qual està dividida segons els colors dels dominis anteriorment esmentats. Les figures s'han realitzat mitjançant PyMOL (DeLano, 2002). **A.** Visualització frontal del *core* sobreposat en l'estructura PDB 2B3Y. **B.** Visualització posterior del *core* sobreposat en l'estructura PDB 2B3Y_B vist des de darrere.

Una vegada s'ha identificat el *core* de la proteïna i s'ha realitzat la subseqüent superposició d'estructures, s'ha realitzat l'anàlisi del component principal (PCA) amb les estructures homòlogues per tal d'identificar les principals diferències estructurals.

Es destaca que els dos PDBs identificats pel BLAST com a estructura oberta presenten posicions *gaps* que s'han exclòs per identificar el PCA. Els PDBs seleccionats amb l'agrupació al

llarg del component principal 1 (PC1) i component principal 2 (PC2) permeten diferenciar acuradament les dues conformacions oberta i tancada tal i com es mostra a la **Figura 7**. La conformació tancada correspon a la proteïna en funció d'aconitasa citosòlica (presència del clúster de [4Fe-4S]) mentre que la conformació oberta correspon a la proteïna en funció IRP1 (absència del clúster de [4Fe-4S] i enllaçada a l'ARN). Aquest anàlisi dels components principals, facilitarà l'estudi de les simulacions de dinàmica molecular de l'aconitasa citosòlica per tal de veure si és capaç de passar d'una conformació tancada a una oberta.

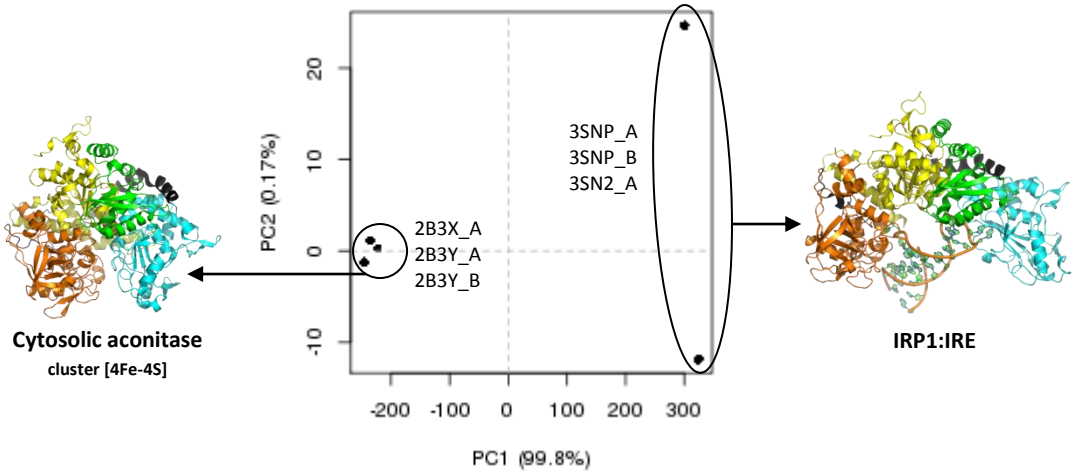


Figura 7 Anàlisi del component principal (PCA) de les estructures cristal·lines 2B3X_A, 2B3Y_A, 2B3Y_B, 3SNP_A, 3SNP_B i 3SN2_A. El cercle de l'esquerra agrupa les estructures amb la conformació tancada que tenen el clúster [4Fe-4S]. El cercle de la dreta agrupa les estructures amb la conformació oberta sense el clúster [4Fe-4S] i amb unió a les regions IRE de l'ARN.

L'estructura cristal·lina es troba en conformació tancada sense permetre l'accés i l'alliberament dels substrats i productes de l'àcid tricarboxílic. En la cavitat d'obertura hi ha una gran quantitat d'aminoàcids hidrofílics tal i com es mostra en la **Figura 8**. Hi ha una remarcable concentració de càrregues positives a la superfície dels dominis 1-3 encarats al domini 4a, entre les dues àrees carregades positivament que estan localitzades en els dominis 1 i 3, respectivament. Hi ha una xarxa parcialment connectada a les cavitats hidrofòbiques que segueix l'àrea positiva al domini de la interfase. Aquesta xarxa és probable que estigui involucrada en la guia dels substrats i productes del citrat de càrrega negativa i isocitrat del centre actiu. Una petita rotació del domini 4 d'algun punt del contacte de la interfase hidrofòbica, el qual és format entre el seu apèndix C-terminal i el domini 1, serien suficients per tal de permetre l'accés dels substrats en el centre actiu.

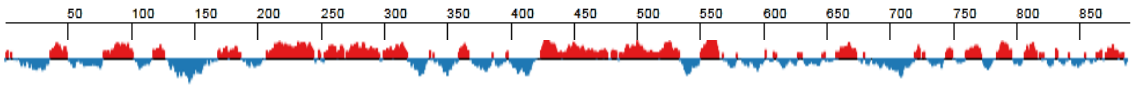


Figura 8 Índex d'hidropatia de la seqüència d'aminoàcids de l'aconitasa citosòlica basat en les taules d'hidrofobicitat estàndards. En vermell es representen els hidrofòbics i en blau els hidrofílics. Imatge de RCSB PDB (www.rcsb.org) del PDB 2B3Y.

Per tal d'analitzar l'efecte de mutacions conegudes sobre l'estructura i estabilitat de la proteïna s'han seleccionat determinats residus de l'espai present entre el domini 3 i 4 de la molècula que realitzen enllaços d'hidrogen entre el domini 1 i el 4 representats a la **Figura 9**.

Aquests residus són ARG780, SER778, ARG536, ARG541, ARG269 i GLN737 i han estat mutats per tal d'observar el seu efecte. Les mutacions *R780Q*, *S778A, R536Q* i *R541Q* han estat estudiades anteriorment (Philpott et al., 1994).

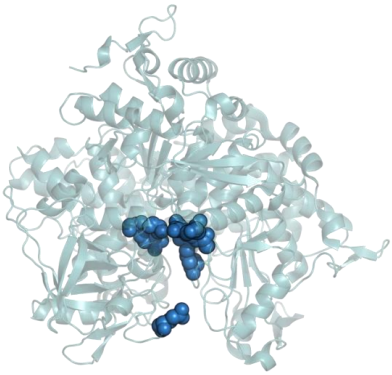


Figura 9 Aconitasa citosòlica on es s'hi mostren els residus que han estat mutats per dur a terme les simulacions de dinàmiques moleculars. Aquests residus es troben en la cavitat del centre d'obertura. La figura s'ha realitzat mitjançant PyMOL (DeLano, 2002).

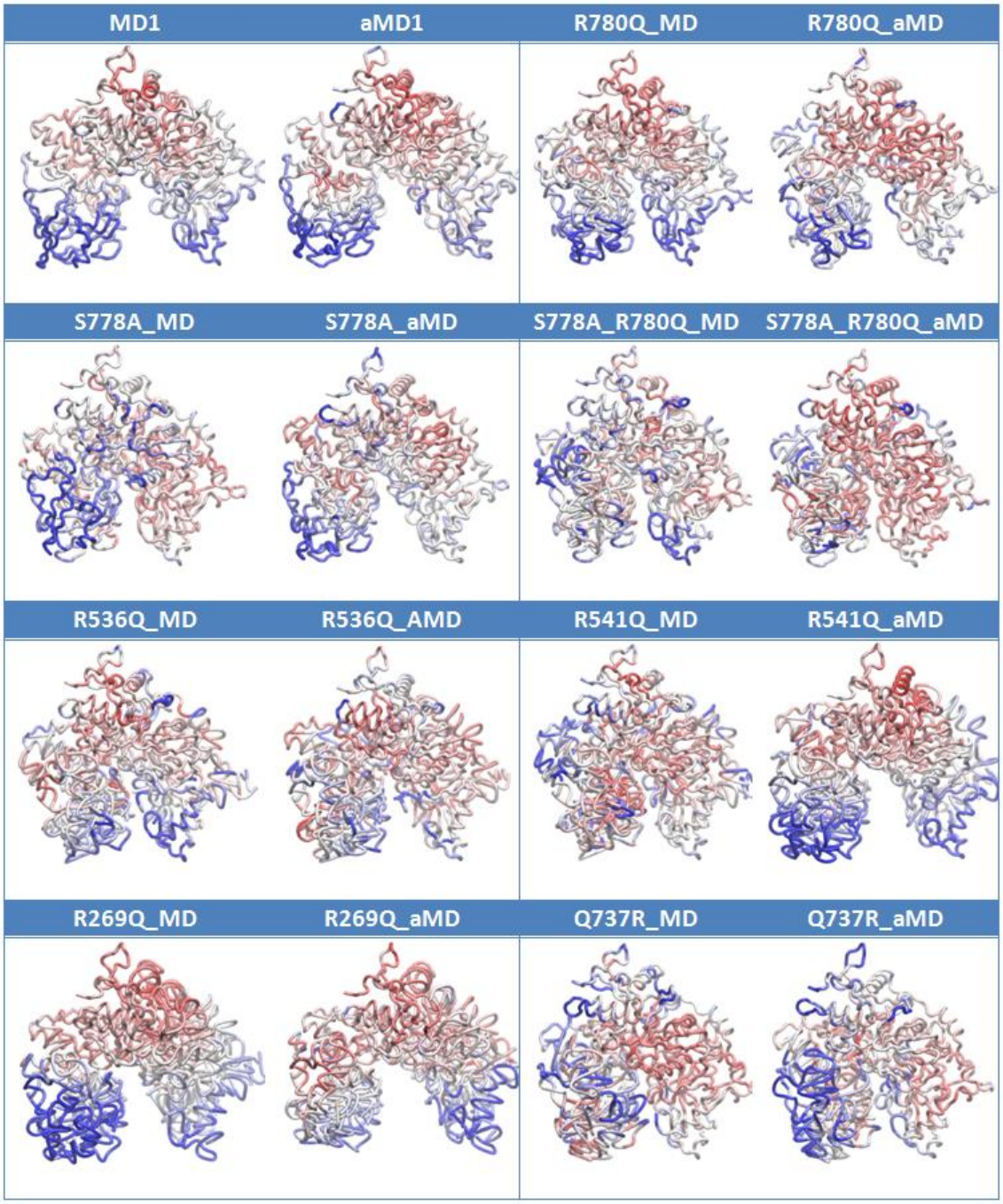
MD i aMD de l'apo-2B3Y i mutants

L'objectiu principal d'aquest treball és entendre el mecanisme per el qual l'aconitasa pot alterar la seva funció i passar d'una conformació tancada a una conformació oberta i comprendre quin és l'efecte de certes mutacions en aquest procés dinàmic. Per aquest motiu, s'han dut a terme les simulacions de dinàmica molecular (MD) del PDB 2B3Y tractat (tal i com s'ha descrit en l'apartat de metodologia)i de les mutacions descrites anteriorment en la forma apo. Les mutacions que s'han dut a terme són les presentades a la **Taula 1** de la Introducció, a més, però, se n'han proposat tres més: *R269Q*, *Q737R* i la doble mutació *S778A_R780Q* en base a l'anàlisi de l'estructura tridimensional de la proteïna aconitasa. Les simulacions de MD s'han realitzat per: la forma apo *wild type MD1* (2B3Y sense lligands), les mutacions *R780Q*, *S778A*, *R536Q*, *R541Q*, *R269Q*, *Q737R,* i la doble mutació *S778A_R780Q*. Cadascuna de les simulacions de MD s'ha realitzat fins aproximadament 100 ns (que equival a 10 dies de càlcul en el superordinador MinoTauro). Posteriorment, per tal d'observar canvis conformacionals que no són observables amb dinàmica molecular clàssica, s'ha realitzat les simulacions de dinàmica molecular accelerada (aMD) fins aproximadament 200 ns, a partir de les diferents estructures obtingudes amb MD. En total s'han realitzat 8 simulacions (*MD1* i les 7 mutacions descrites) de 200 ns cada una (equivalent a 80 dies de càlcul al superodinador MinoTauro del BSC-CNS).

Per analitzar les simulacions de dinàmica molecular s'ha utilitzat la tècnica matemàtica dels components principals. En la **Taula 3** es mostra el component principal 1 (PC1) de cadascuna de les estructures obtingudes separades segons la simulació de les trajectòries MD i aMD. Les figures estan acolorides amb el mètode *Beta* del programa *VMD*. L'escala de colors va de blau fosc representant aquells àtoms més mòbils al llarg de la simulació, fins a vermell fosc corresponents a aquells àtoms més estàtics respecte l'estructura inicial. En general, es pot observar que les zones més mòbils formen part del domini 3 i 4. Els dominis 3 i 4 són els implicats en el procés d'obertura (veure **Introducció**). No obstant això, no succeeix el mateix amb les simulacions *S778A_R780Q* i *R536Q* on els dos mètodes de dinàmica molecular (MD i aMD) mostren com el moviment de la dinàmica es veu centrat en la zona del *linker* (part

posterior de la proteïna). Així doncs, es demostra que començant per una conformació tancada sense el clúster [4Fe-4S], l'enzim desenvolupa la capacitat d'obrir-se notablement. Aquest fet li permet alternar entre les dues funcions descrites a la introducció: actuar com aconitasa citosòlica i com proteïna IRP1. A més a més, es demostra que l'obertura de la proteïna pot ser regulada a partir de mutacions.

Taula 3 Principal component 1 (PC1) de cadascuna de les estructures obtingudes separades segons la simulació de les trajectòries MD i aMD. Les figures estan acolorides amb el mètode *Beta* del programa *VMD* (Humphrey et al., 1996). L'escala de colors és de blau fosc representant aquells àtoms més mòbils fins a vermell fosc corresponents a aquells àtoms més estàtics respecte l'estructura inicial.



Per tal de determinar quantitativament si la proteïna aconitasa canvia de conformació, s'ha mesurat l'angle d'obertura de cada estructura (*MD1, R780Q*, *S778A*, *S778A_R780Q*, *R536Q*, *R541Q*, *R269Q* i *Q737R*) al llarg de tota la simulació. A la **Figura 10**, es mostra aquest angle a l'inici de la simulació (al voltant de 30º) i en comparació amb el fotograma de la simulació corresponent al màxim angle. Aquest angle està definit entre els residus ARG269, CYS503 i GLU801. S'ha escollit aquest angle ja que l'ARG269 pertany a l'extrem del domini 3, la CYS503 del domini 3 situant-se al centre de l'enzim i la GLU801 a l'extrem del domini 4. A la **Figura 10**, en general, s'observa una diferència destacable entre l'angle màxim obtingut a la simulació (valors propers a 70º) respecte l'angle inicial corresponent a l'estructura cristal·logràfica. Aquest fet demostra el clar canvi de conformació que experimenta la proteïna al llarg de la simulació. Tot i això, en el cas de la doble mutació *S778A_R780Q* no es presenta una obertura de la proteïna destacable (el valor màxim observat al llarg de la simulació ha estat 36,7º). Aleshores, es pot assumir que els residus 778 i 780 tenen un paper molt rellevant per a la transició de l'aconitasa citosòlica a IRP1. Pel que fa l'estructura *R536Q* que a la **Taula 3** semblava ser una mutació important, a partir de la **Figura 10** es pot desmentir ja que permet l'obertura de la proteïna.

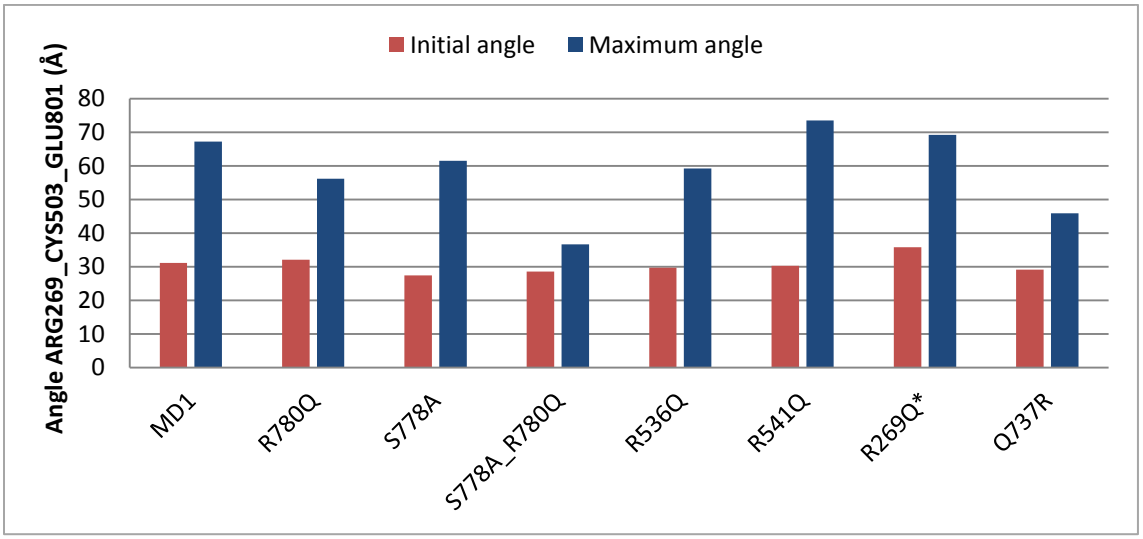


Figura 10 Mesura de l'angle ARG269_CYS503_GLU801 inicial i màxim de les estructures *MD1, R780Q*, *S778A*, *S778A_R780Q*, *R536Q*, *R541Q*, *R269Q* i *Q737R*. *Es destaca que l'estructura R269Q no correspon a l'angle esmentat, sinó a GLN269_CYS503_GLU801.

En base a aquests resultats, l'estudi posterior s'ha centrat en l'anàlisi detallat de la simulació MD i aMD de *MD1* i *S778A_R780Q.* En el vídeo *Molecular dynamics simulations of apo-2B3Y* es representa la simulació de la dinàmica molecular MD i aMD de *MD1* (Prat Ferer, 2015a). I en el vídeo *Molecular dynamics simulations of apo-S778A_R780Q* es representa la simulació de la dinàmica molecular MD i aMD de la doble mutació *S778A_R780Q* (Prat Ferer, 2015b). En aquests vídeos s'observa la clara obertura de l'apo-aconitasa citosòlica en el cas de *MD1* amb un clar moviment del domini 4 respecte els altres, i la immobilització de la cavitat d'obertura de la mateixa proteïna amb la doble mutació en *S778A_780Q*.

A la **Figura 11** es mostren les fluctuacions atòmiques que proporcionen amplituds del moviment atòmic absolut al llarg de la simulació. La magnitud de la fluctuació es visualitza amb la representació de *Tube* des de prim a gruixut amb colors blaus (baixa fluctuació), verds

(fluctuació moderada) i vermells (alta fluctuació). En el cas de *MD1*, els residus de la posició al voltant de 400 i 800 corresponents al domini 3 i el domini 4, respectivament, presenten regions de més alta mobilitat. Aquí es pot concloure que el moviment de la proteïna generat al llarg de la simulació involucra principalment el domini 4. D'altra banda, en el cas de la simulació per *S778A_R780Q* el moviment principal es troba localitzat al domini 4 (tot i que en menor mesura que *MD1*) i també a la zona del *linker*. Així doncs, en la simulació de la doble mutació presenta un moviment característic clarament diferent a l'apo de l'aconitasa citosòlica.

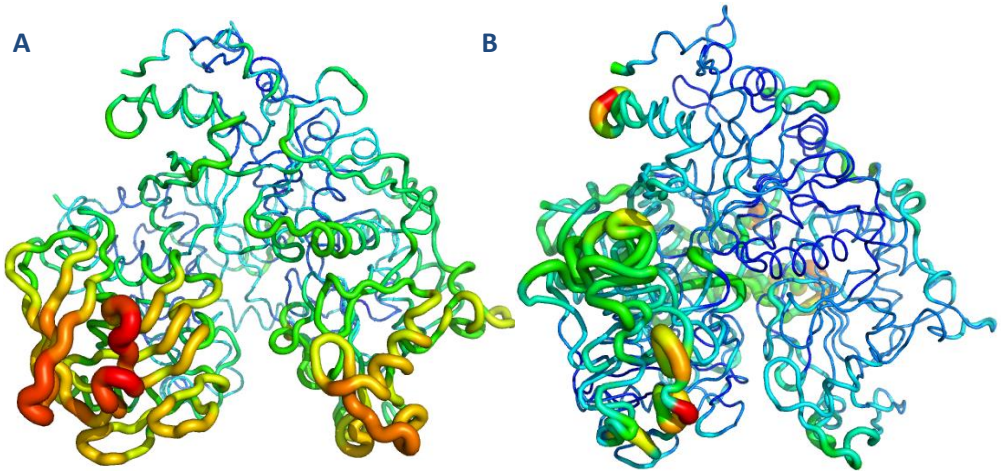


Figura 11 Comparació visual de les fluctuacions atòmiques entre *MD1* (**A**) i *S778A_R780Q* (**B**). La magnitud de la fluctuació es visualitza amb la representació de *Tube* des de prim a gruixut amb colors blaus (baixa fluctuació inferiors), verds (fluctuació moderada i vermells (alta fluctuació). Les figures s'han realitzat mitjançant PyMOL (DeLano, 2002).

PCA de MD i aMD

Un cop determinades les parts més mòbils de la proteïna cal comprovar si la direcció del moviment al llarg de la simulació ens porta cap a la conformació oberta representada pel PDB 3SNP. L'anàlisi dels components principals de les estructures homòlogues al PDB 2B3Y representades a la **Figura 7** serveixen de referència per a la superposició de les simulacions de MD i aMD. A la **Figura 12** s'han superposat les simulacions de les trajectòries de *MD1* (blau) i *S778A_R780Q* (vermell) dins l'espai dels components principals definit a partir de les estructures cristal·logràfiques homòlogues. S'han examinat les relacions entre les diferents conformacions al llarg de la trajectòria. El PCA és un mètode que agafa la trajectòria d'una simulació de MD o aMD i extreu els modes dominants en el moviment de la molècula. És una eina que permet estudiar els canvis conformacionals més rellevants de la proteïna. Aquests moviments pronunciats corresponen a modes vibracionals correlacionats o moviments col·lectius de grups d'àtoms en modes normals d'anàlisis (Haider et al., 2008).

La **Figura 12 A** mostra la simulació de la trajectòria de la MD. La trajectòria de *MD1* (punts blaus) evidencia la direcció del moviment té lloc cap a la conformació oberta del PDB 3SNP mentre que *S778A_R780Q* (punts vermells) es queda en moviment en la zona de la conformació tancada del PDB original 2B3Y. No obstant això, el fet de realitzar una MD es podria creure que la simulació de la doble mutació es trobés atrapada en algun pou d'energia potencial. Aleshores, després de 100 ns es canvia de mètode utilitzant l'aMD per tal que el

potencial d'energia es vegi alterat per l'addició d'un potencial de biaix per augmentar les possibilitats d'escapar dels pous d'energia potencial, el que accelera i estén l'escala de temps en simulacions de dinàmica molecular (Hamelberg et al., 2004). La **Figura 12 B** mostra la simulació de la trajectòria de l'aMD i es comprova que presenta característiques similars a la MD, és a dir, la proteïna roman en la conformació tancada. Aquest fet conclou que la manca dels residus S778 i R780 no permet la transició a una conformació oberta de l'aconitasa citosòlica, així romanent en la conformació original. Per altra banda, la conformació semi-oberta de *MD1* sembla no avançar més durant la simulació de l'aMD donant lloc a fluctuacions entre el punt d'original i el final del de MD, fet que indica que l'obertura i tancadament de la proteïna és reversible. El fet que *MD1* vagi fluctuant i no avanci més cap a la direcció on es troba els PDBs de la conformació oberta, també pot ser degut a que necessita la interacció de l'ARNm durant aquesta transició per estabilitzar-se a la conformació completament oberta.

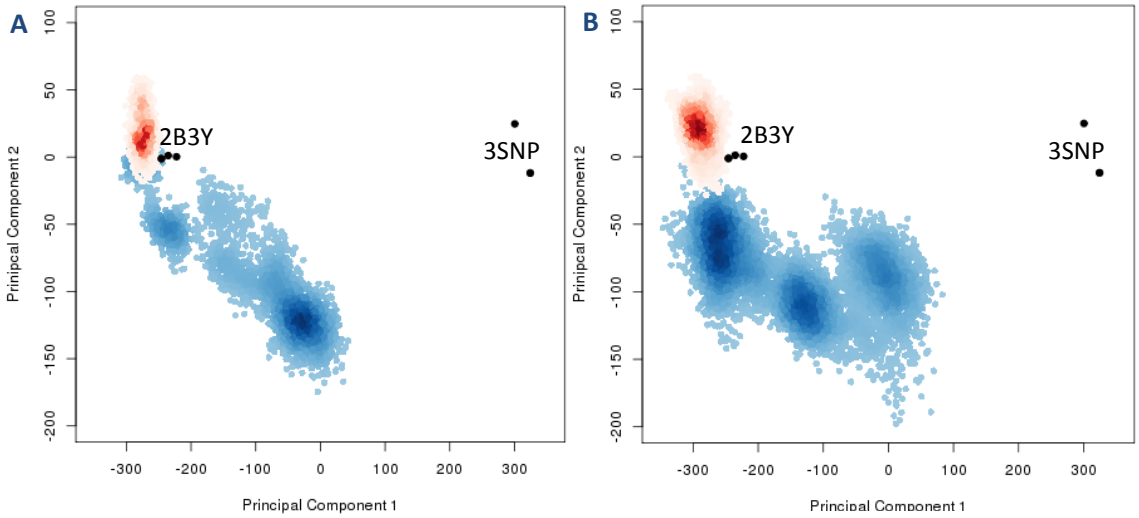


Figura 12 Projecció de les conformacions observades al llarg de la simulació de la trajectòria *MD1* (punts blaus) i *S778A_R780Q* (punts vermells) en l'espai PC proporcionant una representació bidimensional de la presa de mostres de les conformacions al llarg de la simulació. **A.** Simulació de la trajectòria de MD. **B.** Simulació de la trajectòria d'aMD.

Estabilitat estructural

La **Figura 13** compara el RMSD de les trajectòries de *MD1* i *S778A_R780Q* durant el curs de la simulació respecte l'estructura de referència inicial (conformació tancada corresponent al PDB 2B3Y). S'inclouen les simulacions amb MD a l'àrea de fons blanc i aMD a l'àrea de fons blau clar. S'observa un salt en el RSMD ja des del primer nanosegon, el qual és conseqüència de la relaxació del model de partida. La trajectòria és estabilitzada durant el temps amb relativament petites fluctuacions en els dos models. Aquesta estabilització és causada per la formació de nous enllaços d'hidrogen fins a esdevenir una estructura estable sense el clúster de [4Fe-4S]. La hipòtesi és que les simulacions en les quals la proteïna s'obri, el RMSD augmentarà considerablement, mentre que les simulacions en les quals la proteïna es mantingui en la conformació tancada, el RMSD serà baix.

El RMSD de *MD1* arriba fins aproximadament 7,5 Å essent un valor alt degut a la distorsió de l'estructura a partir de la seva conformació de partida. L'increment de RMSD pot correspondre a les obertures transitòries del moviment del domini 4. D'altra banda, el RMSD de

S778A_R780Q arriba fins aproximadament 3 Å suggerint una baixa mobilitat de tots els àtoms individuals. Així doncs, sembla que la doble mutació és capaç de retenir la proteïna en una conformació similar a l'estructura cristal·logràfica de partida.

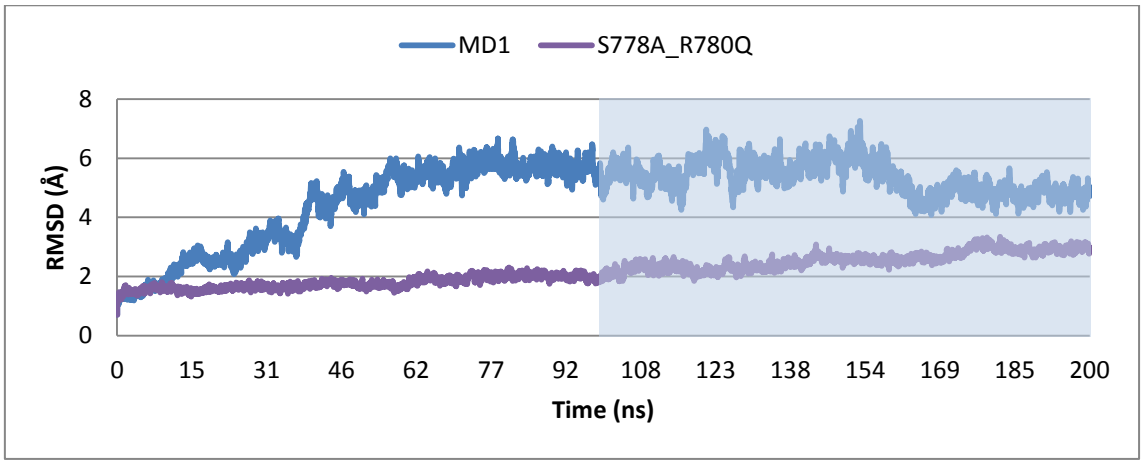


Figura 13 Estabilitat de les simulacions de les trajectòries de *MD1 i S778A_R780Q* durant la simulació de la dinàmica molecular. Els gràfics RMSD fan referència a l'estructura inicial de l'aconitasa citosòlica. L'àrea de fons blanc fa referència a MD i la de blau clar a aMD.

Interaccions dels residus per a l'obertura de la cavitat

Una vegada analitzada la simulació de dinàmica molecular de la doble mutació *S778A_R780Q* i observar la seva estabilitat en la conformació tancada, s'ha realitzat l'anàlisi dels enllaços d'hidrògens formats durant la trajectòria per tal de comprendre perquè aquesta doble mutació és capaç de retenir la proteïna en la conformació tancada. A la **Figura 14** s'assenyalen els enllaços d'hidrogen entre els residus GLU801, ARG269, GLU773, GLN377, SER674 i ARG375 que es troben en la cavitat de l'estructura de màxim angle d'obertura de la simulació *S778A_R780Q.* Les línies negres discontinues mostren els enllaços d'hidrogen representats pel programari PyMOL, i les línies discontinues grises s'han afegit manualment ja que la distància de l'enllaç entre el residu GLU801 i ARG269 ha estat un paràmetre per mesurar l'obertura de la proteïna i també una de les mutacions realitzades (R269Q).

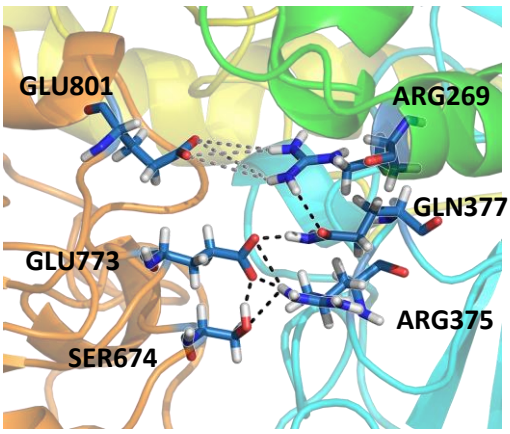


Figura 14 Enllaços per enllaç d'hidrogen entre els residus GLU801, ARG269, GLU773, GLN377, SER674 i ARG375 que es troben en la cavitat de l'estructura de màxim angle de *S778A_R780Q.* Els enllaços determinats pel programa PyMOL (DeLano, 2002) estan acolorits en negre. Els enllaços entre els residus GLU801 i ARG269 estan acolorits en gris i s'han afegit manualment.

A continuació, s'han mesurat les distàncies d'aquests enllaços al llarg de cadascuna de les simulacions per tal de determinar aquells que suggereixin tenir un paper important en l'estabilitat de la conformació tancada. No obstant això, no es mostren els resultats de totes les distàncies dels diferents enllaços presentats a la **Figura 14**. S'ha destacat especialment l'enllaç ARG375 HH11 - SER674 OG, entre l'hidrogen de l'arginina i l'oxigen de la serina. En la **Figura 15** es comparen les distàncies dels enllaços ARG269 HH12 - GLU801 OE1 i ARG375 HH11 - SER674 OG durant la simulació de la trajectòria de *MD1* i *S778A_R780Q* pels dos mètodes de dinàmica molecular. La **Figura 15 A i C** representa la simulació de MD. Per ambdós enllaços, la distància de l'enllaç en la simulació de *MD1* augmenta fins aproximadament 20 Å al llarg del temps, mentre que pel model *S778A_R780Q* la distància de l'enllaç es manté força estable a una distància d'aproximadament 3 Å. Les distàncies mitjanes donador-acceptor dels enllaços d'hidrogen en proteïnes d'elements d'estructura secundària són propers a 3 Å, igual que l'aparellament de bases de Watson-Crick (Jeffrey, 1997). Aleshores, el trencament d'aquests enllaços poden estar relacionats amb l'obertura de la proteïna en la simulació de *MD1*. La **Figura 15 B i D** representen la simulació d'aMD. En aquest cas, s'observen majors fluctuacions durant la trajectòria tal i com és característic per aquest tipus de mètode. A més, la tendència de desplaçament dels enllaços és similar a MD.

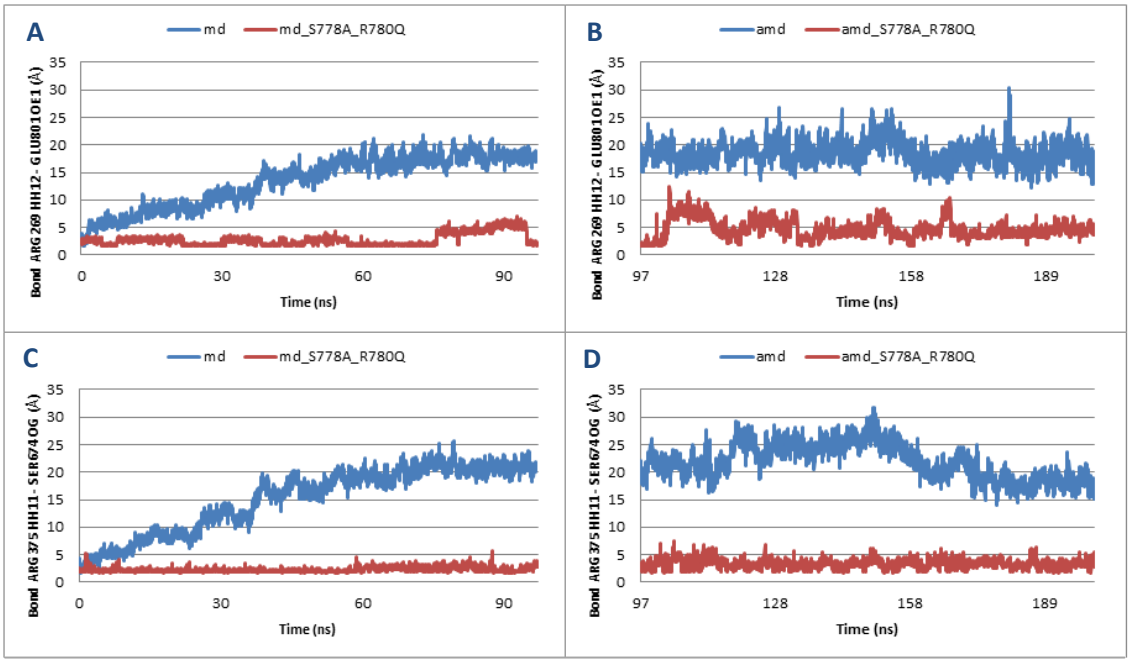


Figura 15 Distància dels enllaços ARG269 HH12 - GLU801 OE1 (**A** i **B**) i ARG375 HH11 - SER674 OG (**C** i **D**) durant la simulació de la trajectòria de *MD1* i *S778A_R780Q*. **A** i **C.** Simulació de la trajectòria de MD. **B** i **D.** Simulació de la trajectòria d'aMD.

I per què es manté l'enllaç entre els residus ARG375 i SER674 quan es muta S778A i R780Q permetent la conformació tancada? Els residus de la cavitat d'obertura es troben en una zona hidrofílica i rica en arginines. A la **Taula 4** es mostren les característiques dels dos aminoàcids mutats en *S778A_R780Q*. La serina és un aminoàcid polar sense càrrega que és mutada per una alanina que és hidrofòbica. En canvi, l'arginina és un aminoàcid de gran volum i polar amb càrrega positiva que és mutat per una glutamina que és polar i sense càrrega. S'ha observat

que en cap de les simulacions de dinàmica molecular d'aquestes mutacions individuals impedeix l'obertura de l'enzim, tot i això, no ho fan de manera tant exagerada com *MD1.*

Taula 4 Característiques dels residus mutats per a les simulacions de la dinàmica molecular *S778A_R780Q.*

Residu	Aminoàcid (*wild type)*	Característiques de l'aminoàcid *wild type*	Aminoàcid (mutant)	Característiques de l'aminoàcid mutant
778	Serina (Ser, S)	Petit, possessió d'un grup OH^-, polar sense càrrega.	Alanina (Ala, A)	Petit, apolar, hidrofòbic
780	Arginina (Arg, R)	Gran, cadena alifàtica llarga, possessió del grup NH_2, polar, càrrega positiva	Glutamina (Gln, Q)	Mitjà, cadena alifàtica llarga, possessió del grup NH_2, polar, sense càrrega

Els residus 778 i 780 són molt propers dins l'estructura secundària de l'aconitasa citosòlica. A més, aquest residus realitzen contactes amb els fosfats de l'ARN en el PDB 3SNP participant en el reconeixement de l'ARNm. Els residus d'arginina han estat prèviament identificats com importants en diverses interaccions d'unió a ARN a causa de la seva càrrega, la seva capacitat per participar en les formacions com a "base triple", i la seva capacitat a imitar la guanosina. Canvis en la posició 780 resulten d'una pèrdua completa de l'alta afinitat d'unió (Philpott et al., 1994). L'ARG780 és localitzada en el quart domini, i el requeriment d'aquesta arginina per a la unió d'ARNm suggereix que la transició de l'enzim a la proteïna d'unió a ARN ha d'involucrar l'obertura de la cavitat per tal d'acomodar els IREs. Per tant, el quart domini ha d'assumir una nova orientació per tal que la proteïna pugui participar en la unió d'ARN. Per altra banda, el residu SER778 en l'aconitasa citosòlica sembla funcionar com la base crítica catalítica. El reemplaçament d'aquest residu en l'aconitasa mitocondrial resulta en una reducció en l'activitat enzimàtica, a través de la mutació no sembla tenir efecte la unió del substrat o en l'enllaç del clúster (Philpott et al., 1994).

A partir de les simulacions de la dinàmica molecular, s'ha estudiat les causes que provoca la doble mutació per a mantenir la conformació tancada. A l'inici de la simulació de l'apo-2B3Y, ARG780 es troba proper a ARG541 (veure **Figura 16 A**). Durant el transcurs de la dinàmica *MD1*, les càrregues positives d'aquests residus estan molt properes de manera que la repulsió fa que les arginines se separin per evitar impediments estèrics, tendint a obrir la cavitat d'obertura. D'altra banda SER778 ha realitzat un enllaç d'hidrogen amb ASP241 del domini 1 (veure **Figura 16 B**). Aquests dos fenòmens poden provocar canvis al·lostèrics a la proteïna i provocar-ne el canvi de conformació.

En canvi, en el cas de la doble mutació (veure **Figura 16 E**), el residu GLN780 per la qual s'ha mutat ARG780 no presenta possibles impediments estèrics ja que és un aminoàcid polar i sense càrrega. La glutamina no presenta canvis rotacionals durant la simulació ja que està en un ambient adient degut a la seva naturalesa neutra. D'altra banda, el residu mutant ALA778 no permet l'enllaç d'hidrogen amb ASP241 del domini 1 el qual era possible que realitzés un canvi al·lostèric en la proteïna. A més, en aquest cas es crea un enllaç d'hidrogen entre la GLN780 i ALA778 que pot causar l'estabilitat en les seves conformacions. Aleshores, s'evita l'obertura de l'enzim tant a causa d'aquesta connexió o per la inhibició dels canvis al·lostèrics observats a *MD1* que en provoquen l'obertura.

Pel que fa les mutacions individuals, *S778A* té present el residu ARG780 que realitza l'impediment estèric per a l'obertura de la cavitat (veure **Figura 16 D**). I *R780Q* presenta el residu SER778 el qual pot provocar un canvi al·lostèric a la proteïna fent que la cavitat s'obri (veure **Figura 16 C**). Es destaca l'enllaç del residu SER778 ja que ha d'estar implicat en l'estabilització de la conformació tancada, perquè sinó amb la mutació individual de R780Q s'observarien els efectes d'obertura. Probablement, les dues mutacions provoquen canvis al·lostèrics, és a dir, un canvi d'aminoàcid del domini 4 provoqui un canvi en altres residus que fa que realitzin un enllaç en la cavitat d'obertura com és el cas de ARG375 HH11 - SER674 OG.

En resum, el residu ARG780 de *MD1* provoca impediments estèrics degut al volum d'aquest aminoàcid i a la zona rica en arginines del seu voltant, i el residu SER778 s'enllaça amb ASP241 del domini 1 el qual causa canvis al·lostèrics en la proteïna. Així doncs, la doble mutació *S778A_R780Q* impedeix el desenvolupament de l'aconitasa citosòlica a una conformació oberta.

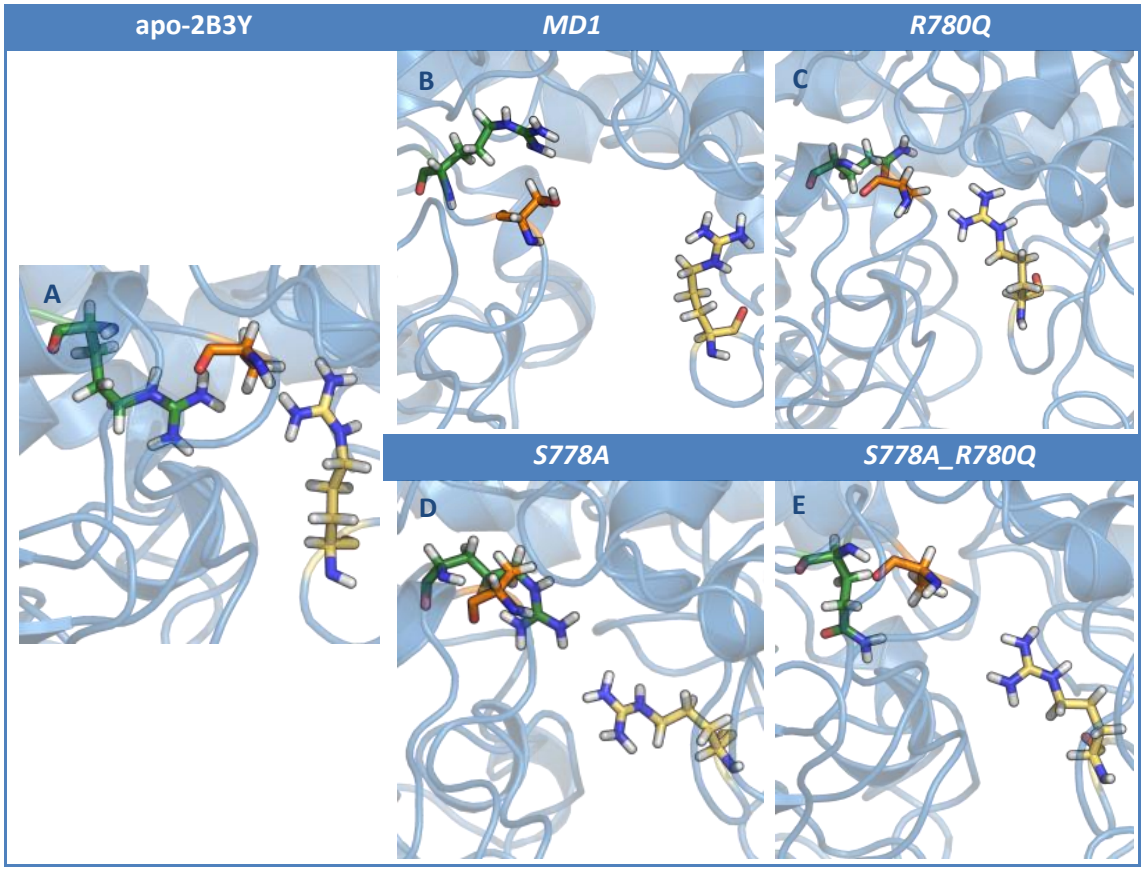


Figura 16 Visualitzacions de les diferents conformacions dels residus 780, 778 i 541 en 4 models diferents de la dinàmica molecular (MD). El residu 780 està acolorit en verd; el residu 778 de color taronja; i el residu 541 en groc. **A.** Es representa la conformació inicial d'apo-2B3Y **B.** Conformació dels residus en la simulació de *MD1.* **C.** Conformació dels residus en la simulació de *R780Q.* **D.** Conformació dels residus en la simulació de *S778A.* **E.** Conformació dels residus en la simulació de *S778A_R780Q.*

Conclusions

Iron is an essential element for many biological life forms as part of a large number of prosthetic groups of proteins involved in central cellular processes. The maintenance of cellular iron homeostasis is achieved through coordinated regulation of iron absorption, storage and export by mainly protein IRP1. This protein plays a post-transcriptional regulation by promoting and preventing the translation of proteins involved in iron recruitment, abduction (ferritin) and export (ferroportin) depending on the needs of human body. IRP1 has dual functionality regulated by the presence of a cluster [4Fe-4S] in the active site of the enzyme, in other words, it can also act as a cytosolic aconitase. The cytosolic aconitase is a key enzyme involved in the main pathway of energy production where it takes part in the tricarboxylic acid cycle, catalysing the isomerization of citrate to isocitrate in the cytoplasm (Dupuy et al., 2006). In its active form contains a cluster [4Fe-4S] in the active site (Volz, 2008). By comparing the sequences of IRP1 and cytosolic aconitase proteins, it can be seen that these two proteins, surprisingly, present the same amino acid sequence (Volz, 2008). This observation suggests that IRP1 and cytosolic aconitase are the same protein, but the mechanism that connects the two functions was still unknown. Furthermore, experimental studies show that under normal physiological conditions, the IRP1 seems to be present as a cytosolic aconitase in tissues (Meyron-Holtz et al., 2004).

In this work, we have studied through computational methods the mechanisms by which the apo-cytosolic aconitase can alter their function, passing from a closed conformation with a [4Fe-4S] cluster in the active site to an opened conformation without the iron-sulphur cluster. Molecular dynamics and accelerated molecular dynamics simulations of the mammalian cytosolic aconitase (PDB 2B3Y) have helped us to understand the conformational changes that take place. Unveiling the role of protein dynamics is crucial to understand protein function.

Molecular dynamics simulations of cytosolic aconitase in the apo-form (*MD1*) have shown that the most mobile parts of the enzyme are mainly domain 3 and 4 (see **Figure 11 A**). Along the MD simulation, the opening angle (defined between residues ARG269, CYS503 and GLU801 to capture the opening of aconitase) show a remarkable increase compared to the angle at the closed conformation. The analysis of the main principal components of the MD simulations (see **Figure 12**) confirms the opening of the apo-form towards a semi-opened conformation that is quite similar to the opened conformation (PDB 3SNP). Finally, the analysis of structural stability by means of RMSD, which reaches a maximum value of 7.4 Å along the MD simulation, reveals the opening motion of domain 4. Therefore, these results show the connection between a closed conformation (aconitase function) and an opened conformation (IRP1 function). The study of this connection mechanism is possible by means of molecular dynamics simulations.

Thus, our results, confirm that both proteins have the same amino acid sequence and that the IRP1/aconitase protein present a dual functionality (Volz, 2008) This protein is able to perform two functions: in low iron environment the [4Fe-4S] cluster is not present and the protein opens and binds to IREs mRNA to regulate iron levels, while in high iron environment it assembles a [4Fe-4S] cluster acting as cytosolic aconitase, catalysing the conversion of citrate to isocitrate in the first steps of the tricarboxílic acid cycle. Moreover, our results show that the

apo form of cytosolic aconitase is extremely dynamic and flexible in the direction of the structural transition between IRP1:IRE complex and the cytosolic aconitase. We clearly show how the apo form is less compact than cytosolic aconitase revealing a more opened conformation but not (yet) a fully opened conformation such a 3SNP (see *Molecular dynamics simulations of apo-2B3Y*). This statement is illustrated in **Figure 17** from the assumptions made in the objectives of this work. The conformational changes undergone by cytosolic aconitase from a closed to and opened conformation allow this protein to act as an IRP1 protein joining the IRE and becoming a regulator of the translation of mRNA coding proteins that are directly involved in iron homeostasis.

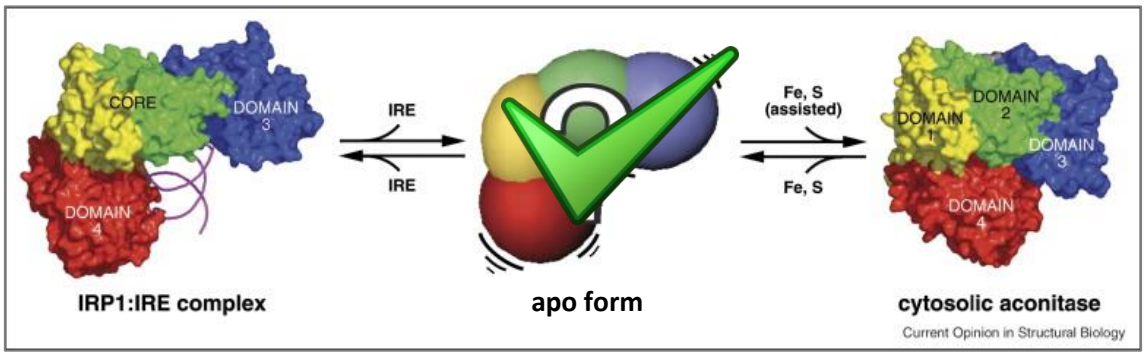


Figure 17 Structures of the two functional conformations of IRP1. Image modified and extracted by Volz, 2008. **Left:** complex IRP1: ferritin H IRE RNA (PDB 3SNP). **Centre:** cartoon of apo-IPR1, supporting a dynamic, opened conformation. **Right:** cytosolic aconitase (PDB 2B3Y). The Fe-S cluster is in the centre of the molecule, hidden from view, accessible by solvent channels between domain 4 and the other domains. Left and right figures done with PyMOL (DeLano, 2002).

To study the effects of mutations on the aconitase conformational change, we have mutated several residues presented in the opening interface. None of them has shown a significant difference in comparison to the wild type apo form except *S778A_R780Q* double mutation. In this case, MD and aMD simulations show that the dynamic motion is focused on the area of the linker and slightly on the domain 4 (see **Figure 11 B**). Interestingly, the double mutation doesn't present a remarkable opening of the protein compared to the crystallographic cytosolic aconitase (see **Figure 10**). The opening angle between residues ARG269, CYS503 and GLU801 remains to the closed conformation. Thanks to the analysis of the principal components of the molecular dynamics simulations one can see that the protein remains in conformation similar to PDB 2B3Y (see **Figure 12**). The RMSD of *S778A_R780Q* reaches approximately 3 Å suggesting low mobility of all individual atoms. Thus, it appears that the double mutation is able to restrain the protein conformation to the closed conformation (see *Molecular dynamics simulations of apo-S778A_R780Q*). Therefore, we can assume that residues 778 and 780 play an important role for the transition from cytosolic aconitase (closed) to IRP1 (opened).

And what roles do the mutations of residues 780 and 778 to prevent the opening of the enzyme? The cytosolic aconitase has residues ARG780 and SER778. ARG780 is present in an area rich in arginines (positive charges) and SER778 bind to ASP241 by hydrogen bonding (see **Figure 16 A**) At the start of the molecular dynamics simulation, the positives charges surrounding ARG780 cause a steric hindrance forcing this residue to move away, and consequently, this leads to the displacement of the domain. SER778 also performs an

important role in the opening of the enzyme, but in this case has been classified as an allosteric change since individual mutation *R780Q* also shows the immobilization of aconitase. These two *wild type* residues can be the key factors by which the cytosolic can alter the structure to form the complex IRP1: IRE in the absence of the ligand [4Fe-4S]. Moreover, these mutations could be a critical factor in iron deficiency associated diseases. Mutations on the aconitase can alter iron homeostasis. A better understanding of how iron contributes to neurodegeneration is needed with the goal of developing safer and effective therapies to treat these disorders. In order to maintain optimal health, the concentration and distribution of iron must be tightly controlled to provide enough to meet cellular requirements while avoiding excessive levels that are toxic.

Future prospects

Despite these results, we have just shown the transition from cytosolic aconitase to the apo form and its reversible transition. However, the final step that leads to the fully opened conformation (PDB 3SNP) indicates that molecular dynamics simulation need to be extended. However, the fact that aMD simulation fluctuates between the closed and the semi-opened conformation but does not reach the fully opened conformation, it may be because the interaction of mRNA is required to stabilize the completely opened conformation. Molecular dynamics simulations of the different models should be extended in order to show if the apo form arrives to an opened conformation similar to PDB 3SNP.

Since our results proved that it is possible to prevent the opening of the cytosolic aconitase by mutation of residues SER778 and ARG780, more mutations can be carried out to analyse this observations in more detail. For example, the mutation of residues ARG375 and SER674, which are one of the links on the cavity that remained stable during molecular dynamics simulation, may be interesting to analyse in the future. Also, the arginine area surrounding ARG780 could be mutated to see if this steric hindrance is the driving force of domain 4 displacement. Because exposure of a hydrophobic surface to the solvent is thermodynamically unfavourable, the C-terminal appendix might serve as an anchor during the proposed movement of domain 4.

Finally, we propose to make the molecular dynamics simulation of the PDB 2B3Y and 3SNP with their corresponding ligands in order to observe the path undertaken in the presence of the [4Fe-4S] cluster and the IRE complex, respectively.

Referències

Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, *19*(2), 164–74. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3999603&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, *40*(Web Server issue), W537–41. doi:10.1093/nar/gks375

Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1823*(9), 1468–83. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.010

Beinert, H., Kennedy, M. C., & Stout, C. D. (1996). Aconitase as Iron−Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chemical Reviews*, *96*(7), 2335–2374. doi:10.1021/cr950040z

De Oliveira, C. A. F., Grant, B. J., Zhou, M., & McCammon, J. A. (2011). Large-scale conformational changes of Trypanosoma cruzi proline racemase predicted by accelerated molecular dynamics simulation. *PLoS Computational Biology*, *7*(10), e1002178. doi:10.1371/journal.pcbi.1002178

DeLano, W. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC. Retrieved May 7, 2015, from https://www.pymol.org/

Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H., & Shaw, D. E. (2012). Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annual Review of Biophysics*, *41*, 429–52. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155245

Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J.-M., & Fontecilla-Camps, J. C. (2006). Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure (London, England : 1993)*, *14*(1), 129–39. doi:10.1016/j.str.2005.09.009

Fleming, R. E., & Ponka, P. (2012). Iron overload in human disease. *The New England Journal of Medicine*, *366*(4), 348–59. doi:10.1056/NEJMra1004967

Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., ElSawy, K. M., McCammon, J. A., & Caves, L. S. D. (2006). Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *22*(21), 2695–6. doi:10.1093/bioinformatics/btl461

Haider, S., Parkinson, G. N., & Neidle, S. (2008). Molecular dynamics and principal components analysis of human telomeric quadruplex multimers. *Biophysical Journal*, *95*(1), 296–311. doi:10.1529/biophysj.107.120501

Hamelberg, D., Mongan, J., & McCammon, J. A. (2004). Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *The Journal of Chemical Physics*, *120*(24), 11919–29. doi:10.1063/1.1755656

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, *142*(1), 24–38. doi:10.1016/j.cell.2010.06.028

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5

Jeffrey, G. A. (1997). *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Retrieved from https://books.google.es/books/about/An_Introduction_to_Hydrogen_Bonding.html?id=ZRAFifo37QsC&pgis=1

Markwick, P. R. L., & McCammon, J. A. (2011). Studying functional dynamics in bio-molecules using accelerated molecular dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, *13*(45), 20053–65. doi:10.1039/c1cp22100k

Meyron-Holtz, E. G., Ghosh, M. C., & Rouault, T. A. (2004). Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5704), 2087–90. doi:10.1126/science.1103786

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084

Philpott, C. C., Klausner, R. D., & Rouault, T. A. (1994). The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(15), 7321–5. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Prat Ferer, C. (2015a). *Molecular dynamics simulations of apo-2B3Y*. Retrieved from https://www.youtube.com/watch?v=fTMlwBbOKZM&feature=em-upload_owner-smbtn

Prat Ferer, C. (2015b). *Molecular dynamics simulations of apo-S778A_R780Q*. Retrieved from https://www.youtube.com/watch?v=JZ4QPtbw-XI&feature=em-upload_owner

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Retrieved from https://books.google.es/books/about/Histology.html?id=FoSiGTXn6BUC&pgis=1

Skjærven, L., Yao, X.-Q., Scarabelli, G., & Grant, B. J. (2014). Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 399. doi:10.1186/s12859-014-0399-6

Tong, W.-H., & Rouault, T. A. (2007). Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *20*(3-4), 549–64. doi:10.1007/s10534-006-9047-6

Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(1), 106–11. doi:10.1016/j.sbi.2007.12.010

Wallander, M. L., Leibold, E. A., & Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1763*(7), 668–89. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.004