

# Communicating Research to the General Public

At the March 5, 2010 UW-Madison Chemistry Department Colloquium, Prof. Bassam Z. Shakhashiri, the director of the Wisconsin Initiative for Science Literacy (WISL), encouraged all UW-Madison chemistry Ph.D. candidates to include a chapter in their Ph.D. thesis communicating their research to non-specialists. The goal is to explain the candidate's scholarly research and its significance to a wider audience that includes family members, friends, civic groups, newspaper reporters, program officers at appropriate funding agencies, state legislators, and members of the U.S. Congress.

Over 50 Ph.D. degree recipients have successfully completed their theses and included such a chapter.

WISL encourages the inclusion of such chapters in all Ph.D. theses everywhere through the cooperation of Ph.D. candidates and their mentors. WISL is now offering additional awards of \$250 for UW-Madison chemistry Ph.D. candidates.



The dual mission of the Wisconsin Initiative for Science Literacy is to promote literacy in science, mathematics and technology among the general public and to attract future generations to careers in research, teaching and public service.

**UW-Madison Department of Chemistry**  
**1101 University Avenue**  
**Madison, WI 53706-1396**  
**Contact: Prof. Bassam Z. Shakhashiri**  
**bassam@chem.wisc.edu**  
**www.scifun.org**

# Structural, Spectroscopic, and Kinetic Investigation of Cysteamine Dioxygenase

By

Rebeca L. Fernandez

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

(Chemistry)

at the

UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON

2021

Date of final oral examination: 18 June 2021

The dissertation is approved by the following members of the Final Oral Committee:

Helen Blackwell, Professor, Chemical Biology  
Thomas C. Brunold, Professor, Inorganic Chemistry  
Andrew R. Buller, Professor, Chemical Biology  
Judith N. Burstyn, Professor, Chemical Biology  
Brian G. Fox, Professor, Biochemistry

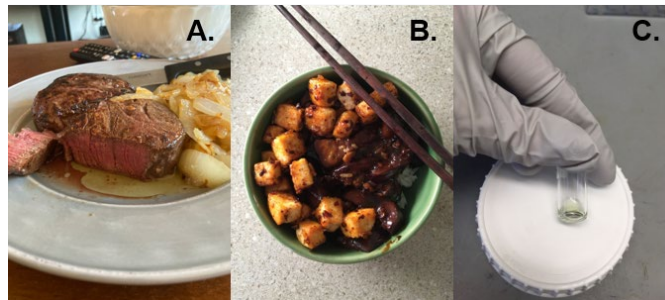
## Una investigación sobre cisteamina dioxigenasa

Escrito por Rebeca Fernández

Tengo la suerte de conocer muchos científicos cuya meta es la accesibilidad de los resultados científicos especialmente para gente que no estudia química. Para apoyar esta meta, el fideicomiso de la Wisconsin Initiative for Science Literacy at UW-Madison patrocina el desarrollo de un capítulo de mi tesis doctoral para que sea accesible al público en general. Agradezco mucho las correcciones y los fondos que WISL me ha dado para escribir este trabajo. Personalmente al ser hispano-hablante, quiero incluir una versión en español. La traducción fue editada por mi papá, el Profesor Salvador Fernández.

*¿Que son las proteínas y cómo las como?*

Al escuchar la palabra proteína, lo primero que se me viene a la mente es mi mamá al discutir lo que comerá para la cena. A ella le gusta comer algún tipo de proteína para cada comida. Su proteína favorita es filete miñón, pero como yo tengo un gusto vegetariano, como frijoles, soya, o nueces (**Imagen 8.1**).



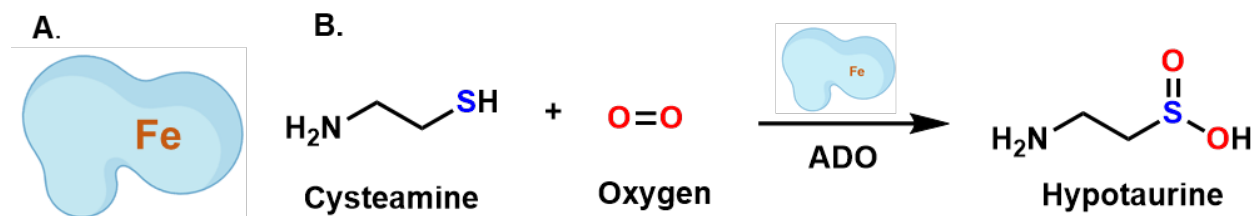
**Imagen 8.1** Tres diferentes tipos de proteína. A. La carne es un recurso común de proteína (Fotografía de Liz Laudadio). B. El tofu, las nueces, y los frijoles también proveen proteínas. C. ADO es mi proteína favorita.

¿Cómo es que en estas dos cenas tan diferentes pueden tener proteína? Las proteínas se hacen de aminoácidos. Como un collar que tiene perlas y cuentas de muchos colores, los aminoácidos integran la cadena de cada proteína. En total hay veinte aminoácidos. De esos veinte, podemos obtener nueve de ellos al comer ciertas comidas. Por lo tanto, los tipos de aminoácidos determinan los diferentes tipos de proteína. Es por eso que tenemos que comer una variedad de proteínas para alimentarnos con los nueve aminoácidos que vienen de nuestra comida.

También tenemos proteínas en nuestro cuerpo. La proteína más abundante que tenemos se llama colágeno y se puede encontrar en tejidos que conectan partes del cuerpo como el cartílago, los huesos, y los ligamentos. ¡El colágeno te mantiene el cuerpo sano y flexible! Mientras que algunas proteínas conectan tejidos, otras pueden crear cosas. Las proteínas que hacen productos se llaman enzimas. De hecho, la función de las enzimas se asemeja al cocinar. Para cocinar un pozole rico se mezclan los ingredientes necesarios, los pones a fuego lento (o energía) por unas horas y después de un tiempo tienes un almuerzo riquísimo. Son las especias como el comino, el orégano y los chiles que hacen el pozole tan rico. En cuanto a las enzimas, éstas tienen una función similar a las especias. Casi un tercio de las enzimas usan un metal para hacer que las reacciones ocurran más rápido y con una mayor frecuencia. Los metales como hierro, cobalto, níquel, y zinc son unos de los más comunes que se encuentran en el cuerpo.

Es aquí donde encajan mis investigaciones: yo estudio una enzima, llamada cisteamina dioxigenasa (ADO), que contiene un hierro (Fe) en su centro (**Imagen 8.2A**). Se llama así porque

cuando los científicos descubrieron esta proteína, descubrieron que ADO incorpora dos oxígenos en la molécula cisteamina (**Imagen 8.2B**). O sea, cambia un azufre a un azufre con dos oxígenos.



**Imagen 8.2.** ADO es una proteína con un hierro. A. Esta es imagen de una mancha genérica con un hierro. Cuando empecé mi programa de investigación doctoral no sabíamos cómo se miraba ADO. Solo entendíamos que la enzima incorporaba un átomo de hierro. B. También sabíamos que ADO combinaba la cisteamina y el oxígeno para construir la hipotaurina.

*¿Por qué nos importa el azufre?*

Es importante tener el propio equilibrio de moléculas que contienen azufre en tu cuerpo. La cisteína es un aminoácido y una de las moléculas que tienen un azufre. El desequilibrio de la cisteína puede afectar la función cerebral y contribuir a enfermedades como el Alzheimer y Parkinson. ADO regula otras moléculas que tiene azufre, como la cisteamina, que en torno afecta el nivel de cisteína en tu cuerpo. ¡De verdad no sabemos nada sobre cómo funciona ADO! Pero es por eso que estas investigaciones son tan conmovedoras. ¡Y complicadas! ADO controla el equilibrio de tantos sistemas en tu cuerpo, aunque solamente sabemos las cosas más básicas de esta proteína.

Hay muchas abreviaciones en mis investigaciones, pero quiero que recuerden esta:

ADO: Cisteamina dioxigenasa, es la enzima con la cual trabajo y Mami, Papi, esta es la proteína que me apasiona.

*¿Cómo hago estas “investigaciones”?*

A mí me encanta trabajar en el mundo académico haciendo investigaciones. Significa que en una semana puedo leer artículos, platicar con y preguntarle cosas a mis compañeros, realizar experimentos, pasar tiempo en la bici y hasta enseñarles a mis compañeros como desarrollar una nueva habilidad. ¿Pero, qué hacemos en el laboratorio? Nosotros somos “espectropistas bioinorgánicos.” Esto significa que usamos la luz (espectropía) para mirar moléculas grandes con metales de importancia para el funcionamiento biológico (bioinorgánico). En mi caso yo investigo la ADO, una proteína que contiene hierro.

Mi proyecto es especial porque hago mi propia proteína. ¡Este proceso es difícil, pero me encanta! Cultivo mi ADO en *E. coli* y lo purifico. El proceso de crecer proteína se parece a cocinar la capa superior de barras de limón, donde lo cocinas añadiendo ingredientes (huevos, limón, mantequilla, azúcar) y luego colas la mezcla para hacer que todo sea una textura. Para crecer ADO, añades tus células (que llevan la proteína) a un consomé lleno de sustancias nutritivas. Calientas y mezclas tu sustancia añadiendo más consomé y células por tres días. Cuando termina de crecer, tienes que purificar la proteína con coladores bien finos para separar el puro ADO.

Ya entendemos cómo crecer ADO, pero ¿por qué necesitamos tanta proteína? Antes mencioné que no sabemos mucho sobre ADO. Cuando empecé este proyecto, lo único que teníamos era una receta para crecer ADO. Por lo tanto, en esta etapa mi trabajo era mejorar su sabor. No es una broma, yo tenía que descubrir que hacía y cómo funcionaba. Hay un concepto esencial en la bioquímica definido por las relaciones entre estructura y función. Esta idea explica

que cómo algo funciona se puede controlar por su estructura. En el caso de ADO, no sabíamos ni cómo se miraba. Entonces, para empezar a entender como funcionaba, tenía que tomarle una foto.

### ¿Qué uso para ver a ADO?

Mis colegas y yo normalmente usamos la luz para investigar a las proteínas. Una de las técnicas espectroscópicas que se usa se llama dicroísmo circular magnético, o DCM (**Imagen 8.3**). Para que sepan, el DCM es una técnica increíblemente especializada. No más hay aproximadamente 4 de estos instrumentos en el EE.UU. Déjenme explicarles que significa DCM.

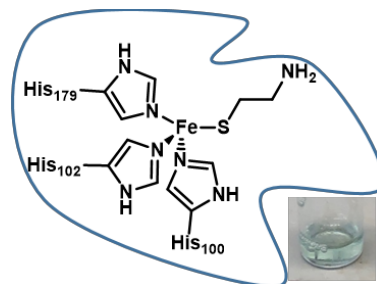
- Dicroísmo circular. La luz pasa como una ola en el océano o en un lago con mucho viento. La luz también puede ser polarizada en dos direcciones, a la izquierda y a la derecha. En este caso, viaja como un remolino o en una dirección de sacacorchos.
- Magnético. La parte más cara del DCM (\$208K) es el criostato magnético que tiene un imán hecho de metales superconductores. La superconducción es una propiedad de un metal que hace que cuando el metal se enfría a 4.5 K (o  $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y al darle energía eléctrica se queda a 90.92 amps de corriente para siempre. Para que sepas, algo como 15 amps sale de un enchufe. ¡Dicroísmo circular magnético!



**Imagen 8.3.** Foto de la nueva DCM instalada en Feb 2021. Una DCM tiene tres partes importantes, la caja que genera la luz polarizada (blanca, a la izquierda), el imán donde queda tu muestra (también blanca, en el medio) y el detector que captura la luz transmitida (adentro de la caja a la derecha). En esta técnica, a lo más básico uno observa el color de la solución, en la presencia de un campo magnético, a temperaturas súper frías ( $4.5\text{ K} = 269\text{ }^{\circ}\text{C} = -452\text{ }^{\circ}\text{F}$ ).

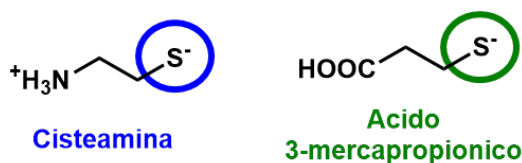
### ¿Qué descubrí?

La DCM nos puede dar información sobre como el hierro al centro de la proteína está unido a otros átomos. Para que pueda funcionar la ADO, una molécula reactiva (la cisteamina) tiene que unirse al hierro. Le llamamos esta molécula reactiva un sustrato. Este es el primer paso en un proceso que honestamente no entendemos muy bien. Pasé un año y medio creciendo ADO para verificar que sí establecía una ligadura con el azufre de la cisteamina. ¡Yo descubrí esto! Yo hice una receta extraordinaria para crecer ADO, unas porciones de proteína deliciosas y de una gran calidad. ¡Fui la primera persona en todo el mundo que investigó a fondo la ADO! Lo importante de mi descubrimiento es que ADO se une con el azufre, y únicamente con el azufre. **Imagen 8.4** es una foto de cómo se ve el centro de la proteína. El frasco de vidrio es una mezcla de la cisteamina y la ADO. ¡y su color es un azul celeste!



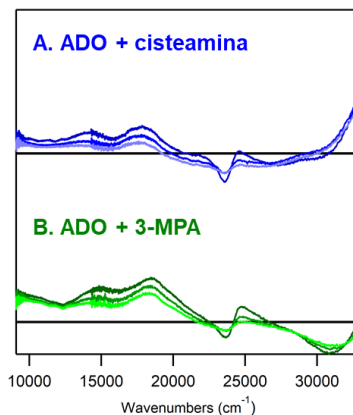
**Imagen 8.4.** ADO unida a la cisteamina. El azufre de la cisteamina se une al hierro al centro de ADO.

Déjame explicar los experimentos que produjeron la evidencia necesaria para demostrar la existencia de este vínculo. Básicamente, mezclé unos elementos y encontré las semejanzas y diferencias entre los datos que coleccioné. Este experimento se asemeja a cocinar pozole, pero con distintas salsas. Mezcle ADO (el consomé) con dos reactantes (las salsas): la cisteamina (salsa de chiles anchos) y el ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA, salsa de tomatillos). Estas dos son moléculas que se parecen a la cisteamina, pero tienen unas diferencias importantes que nos ayudan a identificar qué sustancia se une a otra. La cisteamina tiene un nitrógeno y un azufre mientras que el 3-MPA tiene un oxígeno y un azufre (**Imagen 8.5**).



**Imagen 8.5.** Las estructuras de cisteamina y 3-MPA. Un sustrato es el ingrediente (o reactante) que se une a ADO. Algunas veces rápidamente se convierte en un producto (¡como el pozole!). Otras veces lentamente hace el producto o solamente se une al hierro.

En estos dos casos la molécula se unió al ADO (¡yay!). Sabemos que pasó esto porque los datos del DCM se ven diferentes cuando los comparas a los datos de ADO sin otras moléculas presentes. Pero aún más importante, los gráficos (o espectra) de ADO unidos a cisteamina y 3-MPA se ven igual (**Imagen 8.6**). Como el azufre es la única sustancia que tienen en común la cisteamina y el 3-MPA, descubrimos que ADO se une al sustrato con solo un vínculo, al azufre. Esta afirmación es de gran importancia. No solo no es común, pero nos indicó por primera vez la pista de cómo se ve ADO.



**Imagen 8.6.** Cisteamina y 3-MPA unidos a ADO. Las semejanzas en los gráficos de cisteamina unida a ADO (A) y 3-MPA unido a ADO (B) nos enseña que estas moléculas se unen al hierro a través del azufre.

*¿Por qué importa?*

Aunque no sabemos mucho sobre esta sustancia, ni se menciona cuando platicamos, el enzima con que trabajo es importante para la función de los mamíferos. No sabemos exactamente cómo ADO te puede dañar o ayudar, pero sí sabemos su importancia. Lo estudiamos para que un día sea más fácil diseñar una medicina que ayude a ADO funcionar mejor en nuestro cuerpo. Esta idea caracteriza a las investigaciones fundamentales, como las mías. De hecho, pocos van a leer las investigaciones que hice durante mis estudios posgraduados, pero creo que un día el saber cómo se mira ADO y cómo se une a la cisteamina, le ayudará a otra investigadora entender cómo funciona.

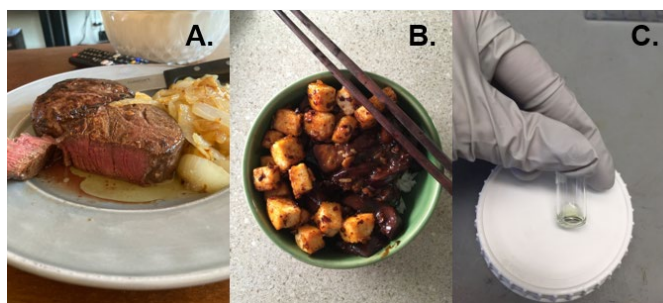
## Looking at Cysteamine Dioxygenase

By Rebeca Fernandez

I am lucky enough to be surrounded by scientists that seek to make their science accessible to a broad audience. In support of this mission, the Wisconsin Initiative for Science Literacy (WISL) at UW-Madison sponsors the writing of a thesis chapter that explains a student's research to a lay audience. I appreciate the edits and financial support that WISL provided during the writing of this chapter. As a native Spanish speaker looking to make her work more accessible, I included a Spanish version of the following work, translated by my father Professor Salvador Fernández.

### *What are proteins and how do I eat them?*

When I hear the word protein what comes to mind is my mom talking about what she will eat for dinner. She likes to have some kind of protein with every meal. While her favorite protein source is a filet mignon, I lean towards being a vegetarian and eat beans, soy, and nuts (**Figure 8.1**).



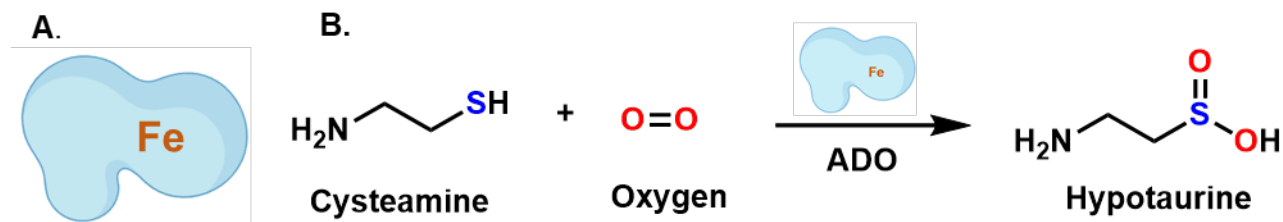
**Figure 8.1.** Three different types of proteins. A. Meat is a common protein source (Photo credit to Liz Laudadio). B. Tofu, nuts, and beans can provide protein as well. C. This is my favorite kind of protein, ADO.

How can these very different meals both contain this thing called protein? Proteins are made up of amino acids. Like a necklace that has different colorful beads that make a pretty chain, proteins form chains with amino acids. There are 20 total amino acids; nine of the 20 we can only replenish through the food that we eat. Protein sources vary in what amino acids they provide, so we have to eat a variety of protein to get all nine of the food-based amino acids.

We also have proteins in our body. The most abundant protein is collagen, and it is found in connective tissues such as cartilage, bones, and ligaments. It keeps you young and stretchy. While some proteins just connect things, others actually make things! The proteins that make things (products) are called enzymes. Think of making pozole (a.k.a. Mexican hominy soup): you take raw ingredients, give it time and a little heat (or energy), and you've made your delicious breakfast. Approximately 1/3 of enzymes use a metal to make reactions happen more quickly and more often. They are the spices like cumin, oregano, and chiles that stand out. Metals like iron, cobalt, nickel, and zinc are some of the most commonly found in the body.

This is where my research fits in: I study an enzyme, called Cysteamine dioxygenase (ADO), with an iron (Fe) at its center (**Figure 8.2A**). It's named this way because when scientists discovered this protein, they saw that ADO incorporated two oxygens into the molecule cysteamine (**Figure 8.2B**). More simply, it turns a sulfur into a sulfur with two oxygens attached to it.





**Figure 8.2.** ADO is an Fe protein. A. When I started graduate school, we did not know what ADO looked like, only that the enzyme bound one Fe atom. This is a picture of a generic protein blob with one Fe atom. B. We also knew that ADO combined cysteamine and oxygen to make hypotaurine.

#### *Why do we care about sulfur?*

It is important to have the right balance of sulfur containing compounds in your body. Cysteine is an amino acid and one of many sulfur-containing molecules. A lack of cysteine regulation has been shown to affect brain function and can contribute to brain diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. ADO regulates other sulfur-containing molecules, like cysteamine, which affects the amount of cysteine in your cells. We actually don't know very much about ADO or how it works! That's why this research is so exciting. And complicated! ADO can affect the levels of so many different systems in your body and we are just starting to learn the most basic things about it.

There are too many abbreviations in my research, but let's keep this one straight:

ADO: Cysteamine dioxygenase, the one that I work with (Mami, Papi, this is the exciting one)

#### *How do I "do research"?*

I love doing research in academia. It means that my week can consist of reading scientific papers, asking people questions, performing experiments, leaving work early to bike, and working with my labmates to teach them a new skill. But what do my labmates and I do? We are "bioinorganic spectroscopists." This means that we look at big molecules that are relevant to biological function (bioinorganic) with light (spectroscopy). In my case, I look at the Fe-containing protein ADO.

My project is special because I make my own protein. This is difficult, but fun! I grow my ADO protein in *E. coli* and purify it. The process of growing protein can be compared to making the top of lemon bars, where you heat and stir the ingredients (eggs, lemon, butter, sugar), then strain the mixture to make it all one texture. In growing ADO, you add your cells (that hold your protein) to a broth full of nutrients. You heat and stir your batch in increasing quantities for three days, adding nutrients at certain points. Once it's done growing, you have to purify out your protein with finer and finer strainers to get the pure ADO.

The real question is, why do I need to grow gobs of protein? I mentioned earlier that we don't know very much about ADO. When I started this project, all we had was a recipe for making ADO. My job was to find out what it tasted like. Just kidding, my job was to figure out what it did and how it worked. There's a fundamental concept in biochemistry called structure/function relationship. It means that how something works is defined by what it looks like. For ADO, we had no idea what it looked like so to even start to figure out how it worked, I needed to get a picture.

#### *What do I use to see ADO?*

Our research group tends to investigate proteins with light. One of the spectroscopic techniques that I used is called magnetic circular dichroism, or MCD (**Figure 8.3**). For context,

MCD is an incredibly specialized technique. There are only ~4 other MCD instruments in the entire US! Let's dig a little deeper into the name.

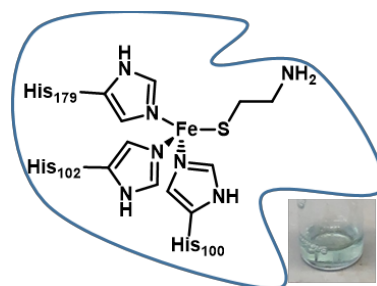
- **Magnetic.** The most expensive part of the MCD is a magnetocryostat (\$208K to be exact) that has a magnet made out of superconducting metals. Superconducting means that when these metals are cooled to 4.5 K (or -452 °F !!!!!) and powered, it will remain at this 90.92 amps of current indefinitely. For context, about 15 amps come out of a wall socket.
- **Circular dichroism.** Light typically travels in a wave, like on the ocean or a windy lake. Light can also be circularly polarized in two directions left and right, in which case it travels like a whirlpool in a corkscrew direction. Magnetic circular dichroism!



**Figure 8.3.** Picture of the new MCD installed Feb 2021. An MCD has three main parts, the box that makes circularly polarized light (white, far left), the magnet where your sample sits (also white, middle), and the detector that captures the transmitted light (inside the box, right). In this technique you are essentially measuring the color of a solution in the presence of a magnetic field, at very low temperatures (4.5 K = -269 °C = -452 °F).

*What did I discover?*

MCD can give us information about how the iron center forms bonds with other atoms. For ADO to function, one reactant molecule (cysteamine) has to form a bond to the Fe. We call this reactant a substrate. This is the first step in a complex process that we actually do not understand well. I spent a year and a half trying to grow ADO and then proving that it did in fact bind the sulfur of cysteamine. I discovered this!! I made an incredible recipe to grow ADO. High quality, delicious batches of protein. Then I was the first person in the entire world to be able to study ADO in depth! The key finding is that ADO binds the sulfur, and only the sulfur. **Figure 8.4** is a picture of what the center of the protein looks like. The glass vial is what the mix of cysteamine and ADO look like irl (in real life). It's sky blue!



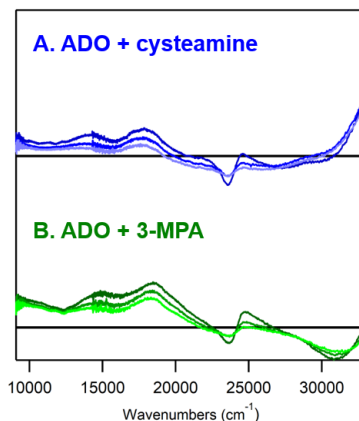
**Figure 8.4.** Cysteamine-bound ADO. The sulfur of cysteamine forms a bond with the Fe center of ADO.

Let's break down the experiments that provided the evidence for this bond. In the most basic terms, I mixed things together and compared and contrasted the data I collected. This is similar to making pozole, but with a different sauce. I mixed ADO (the "broth") with two different reactants ("sauces"): cysteamine ("red ancho chile") and 3-mercaptopropionic acid (3-MPA, "green tomatillo chile"). These are all molecules that are similar to cysteamine but have key differences that help us identify what is binding to what. Cysteamine has a nitrogen and a sulfur, and 3-MPA has an oxygen and a sulfur (**Figure 8.5**).



**Figure 8.5.** Structure of cysteamine and 3-MPA. A substrate is the ingredient (or reactant) that ADO binds to. In some cases, it quickly turns it into a product (like soup!). In other cases, it either very slowly turns it into a product, or simply binds it.

In the two cases, the molecule bound to ADO (yay!). We can tell this because the MCD data looks different when you compare them to ADO without any other molecule present (data not shown). Most importantly, the graphs (a.k.a. spectra) of ADO bound to cysteamine and 3-MPA looked the same (**Figure 8.6**). Since the only thing in common between these cysteamine and 3-MPA was a sulfur, we discovered that ADO binds its substrate with only one bond, to the sulfur end. This was huge. Not only is this rare, but this was the first time we had a hint to what ADO could look like.



**Figure 8.6.** Cysteamine and 3-MPA coordinated to ADO. The similarities in the graphs of cysteamine bound to ADO (A) and 3-MPA bound to ADO (B) show us that these molecules bind to the Fe via the sulfur.

*Why does it matter?*

Although it's not something we know very much about, or even mention in conversation, the enzyme that I work with is important to mammalian function. We don't know exactly in what ways ADO could damage or help you, but we do know it's important. We study it so that hopefully one day it will be that much easier to design medicine that could help ADO function in your body. This is called fundamental research. The research that I did during graduate school will likely be read by few people. However, hopefully understanding what ADO looks like and how it binds cysteamine will help a future chemist understand how it works.