

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Inorgánica



PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**IONES METÁLICOS EN LA  
NEUROQUÍMICA DE  
FERRITINA Y FRATAXINA**

**Manuel José Sánchez del Castillo**

**Granada, Junio de 2018**



# **IONES METÁLICOS EN LA NEUROQUÍMICA DE FERRITINA Y FRATAXINA**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por  
**Manuel José Sánchez del Castillo**  
para aspirar al título de Doctor por la  
Universidad de Granada

Fdo. Manuel José Sánchez del Castillo

**D. José Manuel Domínguez Vera**  
Catedrático del Departamento de Química Inorgánica  
Instituto de Biotecnología  
Universidad de Granada

y

**D<sup>a</sup>. Natividad Gálvez Rodríguez**  
Profesora titular del Departamento de Química  
Inorgánica  
Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Manuel José Sánchez del Castillo  
ISBN: 978-84-9163-915-2  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52362>



El doctorando Manuel José Sánchez del Castillo y los directores de la Tesis José Manuel Domínguez Vera y Natividad Gálvez Rodríguez garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Junio de 2018

**El Doctorando**

Fdo.: Manuel José Sánchez del Castillo

**Los Directores de la Tesis:**

Fdo.: José Manuel Domínguez Vera

Catedrático del Departamento de  
Química Inorgánica.  
Instituto de Biotecnología  
Universidad de Granada.

Fdo.: Natividad Gálvez Rodríguez

Profesora titular del  
Departamento de Química Inorgánica.  
Universidad de Granada.



Los resultados del trabajo de investigación realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

- Manu Sánchez, Òscar Palacios, Celeste Buchensky, Laura Sabio, Diego Fabian Gomez-Casati, Maria Ayelen Pagani, Mercè Capdevila, Silvia Atrian and Jose M. Dominguez-Vera (2018). Copper Redox Chemistry of Plant Frataxins, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 180, 135-140.

#### **INDICIOS DE CALIDAD:**

Datos del Journal Citation Reports

- Impact Factor: 3.348
- Categorías (incluyendo N<sup>o</sup> de revistas y posición revistas): CHEMISTRY, INORGANIC & NUCLEAR, 46 revistas, posición 10
- Cuartil: Primer cuartil



*A los que están,  
y a los que ya se fueron.*

*“Cerca de la cima  
siempre hay mil excusas para bajarse  
y una sola para subir.”*

*Ramón Portilla*



Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, gracias a un contrato de investigación de la Junta de Andalucía, en el grupo BioNanoMet (FQM-368).

Por fin ha llegado el día de escribir estas palabras de agradecimiento (lo he dejado para el final), y no me refiero a ganas de acabar la Tesis, son ganas de agradecer a las personas que en los momentos más difíciles de estos 4 años de mi vida han estado ahí, porque también han pasado cosas buenas, pero es en la dificultad, cuando se ve a las personas como son, y yo he tenido el placer de compartir este tramo de mi vida con gente maravillosa, GRACIAS.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Josema y Nati, que confiaran en mi para realizar esta Tesis; porque cuando me conocieron en todo momento fueron sinceros conmigo y me han enseñado muchísimo durante este tiempo, no ha sido un camino de rosas, pero entre los tres lo hemos conseguido. Estoy encantado de haberos tenido como Directores de Tesis, pero sobre todo, de haber disfrutado de esto en vuestra compañía.

Josema, GRACIAS, pese a que la vida no ha sido nada fácil para nosotros en estos años, solo tengo palabras de agradecimiento hacia ti. Porque sin tu ayuda, esta Tesis no existiría, se que has puesto TODO de tu parte para que saliera adelante.

Nati, GRACIAS, por tu disponibilidad, amabilidad y cercanía, contarte un problema siempre fue una buenísima solución. Tu simpatía hace que todo sea más fácil en el labo.

En segundo lugar, me gustaría extender mis agradecimientos a dos personas que también han sido importantísimas para que se haya realizado la Tesis, las Dras. Mercè Capdevila (UAB) y Silvia Atrian (UB), GRACIAS a las dos. Nunca olvidaré lo bien que me habéis tratado. Silvia, aunque ya no estás físicamente entre

nosotros, esta Tesis es la prueba de que estas cerca nuestra. Para mí es un placer poder haber trabajado junto a vosotras.

También me gustaría agradecer al grupo del CEFOTI en Rosario (Argentina) por confiar en nosotros para trabajar con las frataxinas, en especial a Diego Casati, María Ayelén y a Celeste, a la cual conocí en Barcelona y estuvo con nosotros en Granada.

Pero como nadie es experto en todo y algunas veces necesitamos la ayuda de expertos en las técnicas instrumentales que utilizamos en investigación, me gustaría agradecer a los técnicos del CIC por su trabajo y dedicación, en especial a María José (TEM), María del Mar (HRTEM), Geli (Nanoquant), Nieves (Cultivos celulares), Miguel Ángel Salas (Dicroísmo), Yolanda (Masas). Pero no solo hemos trabajado en Granada, así que gracias Oscar (UAB, Masas), Sebas (UB), Lucia (U Zaragoza)...

Como decía anteriormente esta Tesis se ha llevado a cabo en el Departamento de Química Inorgánica de la UGR, compartiendo espacio con gente maravillosa, a la que da gusto encontrarse en el día a día. Por ello me gustaría agradecer a todas las personas que forman parte del Departamento su amabilidad, en especial a Enrique Colacio, Puri, Antoñillo, PacoPepe, ... Pero no solo los profesores conforman el Departamento, así que GRACIAS Antonio y Mari Carmen, porque sin vosotros todo sería un caos.

Durante estos 4 años, muchos son los Doctores que se han formado (o están en ello) en el Departamento, todos ellos bellísimas personas, GRACIAS: Calahorro, Víctor (Abdelkader), Fran (Radioquímica), Sara, Kiko, Rodri, Carlos, Méndez, Ismael, Nacho, Virginia por las cervezas, los ánimos, los consejos, los partidos de padel... Un placer haber coincidido con cada uno de vosotros, esperemos que lo volvamos a hacer en el futuro.

Pero si el ir a trabajar cada día ha merecido la pena, es principalmente por la gente del labo, el buen rollo y el compañerismo han hecho que todos nos sintiésemos como en casa,

porque sin duda más que mis compañeros, sois parte de mi familia. Así que GRACIAS Fer y Miguemite por enseñarme a manejar en el laboratorio. Las visitas al Patio de las Leonas, los desayunos, las cervezas con vosotros son sin duda de los mejores momentos. Y qué decir de mis compañeras, con las que he compartido cada día desde que entré al labo, Ro y Ana, tan distintas y a la vez tan bellísimas personas. GRACIAS por aguantarme, ayudarme, cuidarme ... pero sobre todo por estar ahí siempre, porque nunca me habéis faltado en los peores momentos. Ro (y Mola), se que nos quedan muchos festivales por visitar, sois muy especiales, os deseo lo mejor, siempre estaré ahí para lo que necesitéis. Ana, deseo que junto a tu Dani seas todo lo feliz que te mereces, nos veremos por ... Australia? GRACIAS Vitorino por tu "vivir es compartir", por tu "es bien", por tus palabras de ánimo, porque hacia falta el payasete que llevas dentro para crear ese buen rollo del labo. Se que junto a tu Clara, seréis felices *forever and ever*. GRACIAS también a ti, Natalie, espero que la vida te devuelva por lo menos la mitad de las buenas cosas que tu haces por los demás, en Granada siempre tendrás tu hueco, porque esta ciudad necesita más gente como tu. GRACIAS también a los más nuevos, Dani, Félix, Carmen, José Manuel, Gloria, porque entre todos habéis rejuvenecido tanto el labo como el Departamento, y es que sois muy buena gente.

También me gustaría acordarme de los amigos, que aunque algunos ya no están aquí en Granada, desde la lejanía han sido un gran apoyo: Franky, Caste, Rafa, Luka, Gordo... Familia escaladora: Pablo, Noé, Ismael, Thais, Elena, Raúl, Eva, ... almuñequeros y almuñequeras, a todos GRACIAS por estar ahí.

Y no, bichín, no me olvido de ti, aunque ya casi ni me acuerdo de cuando empezaste en el labo en la muy entretenida tarea de reconstituir ferritinas... Muchas GRACIAS por ser tu, cada día, espero que siempre felices, sigamos recorriendo juntos el camino de la vida, porque las aventuras y desventuras no cesaran, pero contigo cerca, me siento capaz de superarlas todas.

Por último (los últimos serán los primeros), toca acordarse de la familia; GRACIAS a mis titos, Antonio, Inma, Pepe, Juani, Zeque, a mi abuela Teresa, a mi abuelo Matías, que nos dejó durante la Tesis, pero que me acogió para que estudiase el Máster. Y sobre todo a los de casa, a Mamá, a María muchas GRACIAS de corazón, porque nosotros más que nadie hemos sufrido en estos años, pero siempre habéis tenido palabras de ánimo y me habéis motivado para seguir adelante. Enano, Papá, os llevo conmigo siempre, porque las personas no mueren hasta que se pierden sus recuerdos, y el vuestro perdurará más vivo que nunca en mí. Gracias a vosotros (a los 4) estoy hoy aquí, porque me habéis enseñado tanto en esta vida, que no hay palabras que puedan expresarlo.



**RESUMEN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS  
DOCTORAL**



La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de las propiedades de dos metaloproteínas fundamentales en el metabolismo del Fe en los organismos vivos: la ferritina (principal almacén de Fe) y la frataxina (Fe mitocondrial).

Los resultados experimentales obtenidos y la discusión de los mismos se presentan en esta memoria divididos en 5 capítulos.

En el **primer capítulo**, la **introducción**, se pone de manifiesto la importancia que tiene el Fe en distintos procesos vitales para los organismos vivos, y como éstos han sido capaces de adaptarse para solventar de una manera realmente eficiente los inconvenientes químicos que presenta el Fe, principalmente la baja solubilidad del Fe (III) y la formación de radicales tóxicos  $\text{OH}\cdot$ . Posteriormente se presentan las proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral: ferritina y frataxina, haciendo hincapié en las controversias existentes en torno a sus propiedades, sus funciones y su papel cada vez más importante en neuroquímica. Finalmente, se concluye el capítulo con los objetivos que se han pretendido alcanzar en esta Tesis Doctoral.

En el **segundo capítulo**, se analiza una primera controversia en relación a las propiedades de la ferritina. En concreto se abordan las posibilidades de utilizar la ferritina como un fotocatalizador capaz de foto-oxidar moléculas orgánicas y transferir electrones a aceptores de electrones

externos cuando se irradia con luz UV-visible. Experimentos con un quelante de Fe (II), un indicador electrocrómico y ferritinas recombinantes indican que los electrones excitados en la banda de conducción del núcleo de ferritina no cruzan la cubierta proteica, como había sido establecido, sino que lo que en realidad lo que tiene lugar es un proceso de autofotocatálisis por medio del cual el núcleo de ferrihidrita es reducido, liberando Fe (II) al medio.

En el **tercer capítulo**, nos centramos en resolver algunas de las controversias existentes en bibliografía en torno al funcionamiento de la ferritina: cómo adquiere Fe para almacenarlo, cómo se forma el núcleo de hierro y cómo se libera. Hemos concluido que son únicamente los centros ferroxidasas de los canales de ferritina los que se encargan de oxidar Fe (II) a Fe (III). Esta conclusión descarta la vía de oxidación catalítica Fe (II) a Fe (III) en la superficie del mineral de ferrihidrita, una ruta que había sido aceptada. Asimismo hemos concluido que la ruta de entrada y salida del Fe es exactamente la misma, concretamente a través de los canales hidrofílicos, aunque la liberación de hierro no conlleve la interacción con el centro ferroxidasa, que tiene lugar en el proceso de entrada.

El **cuarto capítulo** está dedicado a la caracterización estructural y al estudio de las propiedades redox de algunas frataxinas de plantas, en concreto de *Zea mays* (ZmFH-1 y ZmFH-2) y *A. thaliana* (AtFH). Mientras que en eucariotas no fotosintéticos, la frataxina está codificada por un solo gen, y se localiza en la

mitocondria en *Zea mays* existen dos isoformas funcionales de frataxina, ZmFH-1 y ZmFH-2, de las cuales se ha confirmado una localización dual en mitocondria y cloroplastos. Además, se evidencian características específicas de las frataxinas de plantas: su tendencia a sufrir cambios conformacionales bajo la exposición al oxígeno y su capacidad para formar dímeros mediante puentes disulfuro entre residuos cisteína presentes en la secuencia aminoacídica C-terminal.

En el **quinto capítulo**, abordamos los primeros estudios de *binding* de Fe a frataxinas de plantas. En particular, trabajamos en la química del hierro de las frataxinas pertenecientes a *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*, estableciendo un escenario básico para avanzar en el conocimiento de la química de las frataxinas vegetales.

Por último, en las **conclusiones** hacemos un resumen del trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral, extrayendo y comentando los resultados obtenidos más significativos.



## **Abreviaturas**

AA, aminoácidos.

AD, enfermedad de Alzheimer.

AuNP, nanopartículas de oro.

Bipy, 2,2'-Bipiridina.

CD, dicroísmo circular.

cDNA, ácido deoxirribonucleico copia.

CyaY, frataxina bacteriana.

Cys, cisteína.

DAHK, péptido aspartato-alanina-histidina-lisina.

DcytB, citocromo B duodenal.

DFC, complejo peroxo-diférrico.

DFO, desferrioxamina.

DMT1, transportador de metales divalentes 1.

EDX, espectroscopia de dispersión de energía de rayos X.

EELS, espectroscopia de pérdida de energía de electrones.

ESI-MS, espectroscopia de masas, ionización mediante electrospray.

ESI-TOF-MS, espectroscopia de masas, detección por tiempo de vuelo, ionización mediante electrospray.

FC, centro ferroxidasa.

FPLC, cromatografía de líquidos rápida de proteínas.

FRDA, ataxia de Friedreich's.

Ftmt, ferritina mitocondrial.

Fz, ferrozina.

Glu, glutamato.

GFP, proteína fluorescente verde.

GOE, "crisis del oxígeno".

GST, glutatión -S- transferasa.

HAADF-STEM, microscopio electrónico en modo barrido-transmisión, con anular de alto ángulo trabajando en campo oscuro.

HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico.

His, histidina.

HMW, alto peso molecular.

HPLC, cromatografía de líquidos de alta resolución.

HuFH, frataxina humana.

HuFtH, ferritina humana H.

HuFtL, ferritina humana L.

IPTG, isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

ISC, clústeres hierro azufre.

IscU, enzima de ensamblaje de clústeres hierro-azufre.

ISD11, factor de ensamblaje de clústeres hierro-azufre.

LED, diodo emisor de luz.

MES, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

MOPS, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.

mRNA, ácido ribonucleico mitocondrial.

MW, peso molecular.

MWCO, corte de peso molecular.

MWM, marcador de peso molecular.

Nfs1, enzima cisteína desulfurasa.

OD, densidad óptica.

PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida.

PBS, tampón fosfato salino.

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

PD, enfermedad de Parkinson.

PDB, banco de datos de proteínas.

POM, polioxometalato  $[P_2Mo^{VI}_{18}O_{62}]^{6-}$

PPD, enfermedad de la proteína priónica.

PPIX, protoporfirina IX.

ROS, especies reactivas de oxígeno.

SOD2, superoóxido dismutasa 2.

SDS, dodecilsulfato sódico.

SUF, factor de utilización del azufre.

TEM, microscopía electrónica de transmisión.

Tf, transferrina.

TGA, ácido tioglicólico.

TRIS, tris(hidroximetil)aminometano.

Trp, triptófano.

UV-Vis, ultravioleta-visible.

WI solution, disolución de lavado e incubación.

YFH1, frataxina de levadura.

ZmFH-1, frataxina 1 de *Zea mays*.

ZmFH-2, frataxina 2 de *Zea mays*.





**ÍNDICE**



## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

<b>1.1. ¿Por qué el hierro?</b> .....	<b>35</b>
<b>1.2. El hierro en el cerebro</b> .....	<b>43</b>
<b>1.3. Ferritina, almacén de Fe en los organismos vivos</b> ...	<b>45</b>
<b>1.3.1. Implicaciones de la ferritina en neuroquímica</b> .....	<b>46</b>
<b>1.3.2. Controversias entorno a la ferritina.</b> .....	<b>50</b>
<b>a) Centro catalítico ferroxidasa.</b> .....	<b>50</b>
<b>b) ¿Cómo llega el Fe (II) a la ferritina?</b> .....	<b>52</b>
<b>c) Nucleación y mineralización en la ferritina</b> .....	<b>53</b>
<b>d) Propiedades fotorreductoras del núcleo ferrihidrita de la ferritina.</b> .....	<b>55</b>
<b>e) ¿Cómo se libera Fe de la ferritina?</b> .....	<b>57</b>
<b>1.4. Frataxina, una proteína en busca de una función</b> .....	<b>59</b>
<b>1.4.1. Implicaciones de la frataxina en neuroquímica</b> .....	<b>60</b>
<b>1.4.2. Controversias entorno a la función de la frataxina</b>	<b>62</b>
<b>a) Frataxina como almacén de Fe.</b> .....	<b>64</b>
<b>b) Frataxina como chaperona de Fe.</b> .....	<b>65</b>
<b>c) Frataxina, sensor/regulador negativo de Fe</b> .....	<b>66</b>
<b>1.5. Objetivos</b> .....	<b>67</b>
<b>1.6. Referencias.</b> .....	<b>69</b>

## **CAPÍTULO 2. PROPIEDADES AUTO(FOTOCATALÍTICAS) DE LA FERRITINA**

<b>2.1. Introducción</b> .....	<b>81</b>
<b>2.2. Resultados y discusión</b> .....	<b>83</b>

2.3. Conclusiones.....	91
2.4. Materiales y métodos.....	92
2.5. Referencias.....	94

### **CAPÍTULO 3. INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE FE DE LA FERRITINA**

3.1. Introducción.....	101
3.2. Resultados y discusión.....	104
3.3. Conclusiones.....	113
3.4. Materiales y métodos.....	114
3.5. Referencias.....	116

### **CAPÍTULO 4. QUÍMICA REDOX EN FRATAXINAS DE PLANTAS**

4.1. Introducción.....	123
4.2. Resultados y discusión.....	126
4.3. Conclusiones.....	154
4.4. Materiales y métodos.....	156
4.5. Referencias.....	164

### **CAPÍTULO 5. ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?**

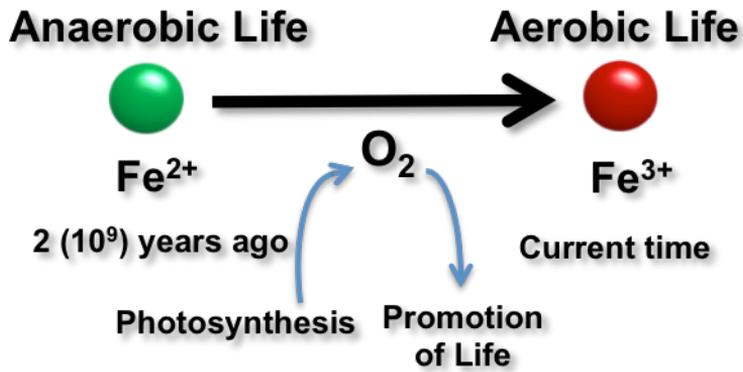
5.1. Introducción.....	173
5.2. Resultados y discusión.....	173
5.3. Conclusiones.....	182
5.4. Materiales y métodos.....	183
5.5. Referencias.....	187

### **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES..... 191**





## Evolutionary Time Line



# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. ¿Por qué el hierro?

El hierro es un elemento esencial para la vida. Una inmensa mayoría de los organismos en la Tierra lo necesitan para llevar a cabo un gran número de procesos vitales, tales como la respiración celular, el transporte de oxígeno, la fotosíntesis, el transporte de electrones, etc <sup>1</sup>.

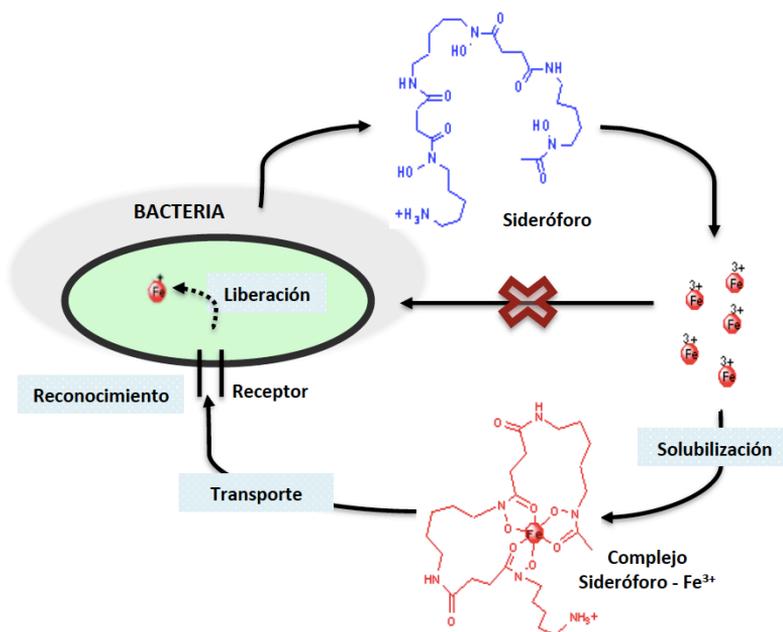
Para llevar a cabo dichos procesos, los organismos vivos utilizan la extraordinaria capacidad de los dos principales estados de oxidación del hierro, Fe (II) hierro ferroso y Fe (III) hierro férrico, para actuar como dador y aceptor de electrones, ya que los dos son termodinámicamente estables y cinéticamente reactivos. La versátil química de coordinación que posee el hierro en sus dos estados de oxidación, lo han convertido en el actor fundamental en los procesos *redox* y de transporte electrónico que tienen lugar en el metabolismo de los seres vivos. Pero no todo son facilidades, los organismos vivos han tenido que solventar a lo largo de la evolución algunas desventajas o inconvenientes químicos que presenta el hierro:

- La insolubilidad del Fe (III) y su consecuente baja biodisponibilidad
- La formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo OH• (reacción de Fenton).

Aunque la vida se originó en una atmósfera reductora donde el Fe (II) estaba disponible, la “crisis del oxígeno” (GOE, *Great Oxidation Event*) provocó un cambio drástico en la atmósfera y la

## CAPÍTULO 1

consecuente oxidación del Fe (II) a Fe (III). Esto condujo a que el hierro presente en mares precipitase y dejase de estar disponible. De hecho, a pH 7.4 y a la presión fisiológica de oxígeno, el hierro (II) relativamente soluble, se oxida fácilmente a hierro (III), que después de sufrir hidrólisis forma hidróxidos férricos insolubles. Como resultado de esta insolubilidad, el hierro (III) en los organismos vivos debe estar constantemente ligado a una molécula que lo solubilice. En consecuencia, los pocos organismos que lograron sobrevivir a esta “crisis de oxígeno” (se cree que menos del 1%) evolucionaron sintetizando y excretando moléculas con gran afinidad por Fe (III), los denominados sideróforos <sup>2,3</sup>, capaces de captar, solubilizar e internalizar el hierro (Fig. 1). La existencia de sideróforos es una prueba de la importancia que el hierro tiene en la vida <sup>3,4</sup>.



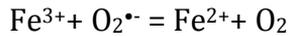
**Fig. 1:** Proceso de captación, solubilización e internalización de Fe en microorganismos.

Por otra parte, la presencia de iones metálicos libres (especialmente hierro y cobre) favorecen reacciones *redox* en las que pueden producirse ROS. Estas reacciones *redox* se ven afectadas por la acción de dos proteínas fijadoras de hierro: las superóxido dismutasas y las catalasas. Las primeras catalizan la dismutación del ion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en  $O_2$  y  $H_2O_2$  <sup>5</sup> y las catalasas catalizan la descomposición de  $H_2O_2$ , en  $H_2O$  y  $O_2$  <sup>6</sup>.

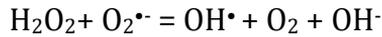
El Fe (II) libre promueve la formación de ROS a través de distintas vías. Dentro de estas reacciones indeseables, la más común es la conocida como reacción de Fenton <sup>7</sup>. En 1894, Fenton describió las fuertes propiedades oxidantes de una mezcla de Fe (II) y  $H_2O_2$ . La especie activa fue posteriormente identificada por Haber & Weiss como el radical hidroxilo  $OH^{\bullet}$ , formado por transferencia de un electrón de Fe (II) a  $H_2O_2$  <sup>8</sup>.



Esta reacción no se produce directamente con Fe (III) libre, que no es una especie capaz de producir la reducción de un electrón de  $H_2O_2$  a  $OH^{\bullet}$ . Sin embargo, la producción de radicales  $OH^{\bullet}$  no debe considerarse exclusivamente en base a la reacción de Fenton, ya que las trazas de Fe (III) no protegidas, existentes en muchos sistemas biológicos, también pueden ser suficientes para generar radicales  $OH^{\bullet}$  si el Fe (II) se forma por la siguiente reacción de reducción de un electrón:



La combinación de las dos ecuaciones anteriores es la llamada reacción de Haber-Weiss:



Por lo tanto, las especies de hierro libres, tanto Fe (II) como Fe (III), pueden generar radicales hidroxilo a partir de una molécula de peróxido de hidrógeno y de una de superóxido. La formación de  $\text{OH}^{\bullet}$  puede tener lugar siempre que se produzcan  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en ausencia de niveles adecuados de catalasa y superóxido dismutasa.

El radical hidroxilo tiene una vida media *in vivo* muy corta y una alta reactividad. Estas características hacen de esta especie un compuesto muy peligroso para los organismos. Los radicales hidroxilos reaccionan con prácticamente todos los tipos de biomoléculas: carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos. Estas reacciones dentro de una célula causan daño celular irreversible, lo que lleva al fallo orgánico y, finalmente, a la muerte <sup>5,9</sup>. Además, a diferencia de los superóxidos, que pueden ser eliminados por la superóxido dismutasa, el radical hidroxilo no puede eliminarse mediante una reacción enzimática.

Por lo tanto, los organismos se han visto obligados a desarrollar mecanismos para evitar la formación de ROS, diseñando estrategias brillantes para evitar las reacciones de Fenton, es decir, para evitar la presencia de hierro libre. La síntesis de ferritina, una proteína de almacenamiento de hierro, es una de estas estrategias. La proteína es capaz de encapsular miles de

átomos de Fe como un mineral Fe (III) <sup>10,11</sup>. La ferritina captura y oxida iones Fe (II) y luego almacena los átomos de Fe (III) en su cavidad <sup>12</sup>. Una vez almacenado en la ferritina, el hierro no participa en la química de Fenton pero permanece disponible para cuando la célula lo requiere <sup>13</sup>.

Los organismos vivos también pueden evitar las reacciones de Fenton modulando el potencial *redox* Fe (III)/Fe (II) gracias a la coordinación de diferentes biomoléculas. Los compuestos de hierro catalizarán la química de Fenton cuando se cumplan dos condiciones simultáneamente: (i) si una especie Fe (III) puede reducirse mediante  $O_2^{\bullet}$  y (ii) si la especie Fe (II) tiene un potencial de oxidación tal que puede transferir un electrón a  $H_2O_2$ . Por lo tanto, además de Fe (II) y Fe (III) libres, otras especies de hierro que tienen potenciales *redox* "inadecuados" también pueden generar radicales  $OH^{\bullet}$ . Como la semirreacción de  $O_2^{\bullet}/O_2$  tiene un potencial de +0.16 V, solo las especies Fe (III) con un potencial *redox* Fe (III)/Fe (II) por debajo de -0.16 V evitarán la reducción de Fe (III) por  $O_2^{\bullet}$  (Fig. 2).

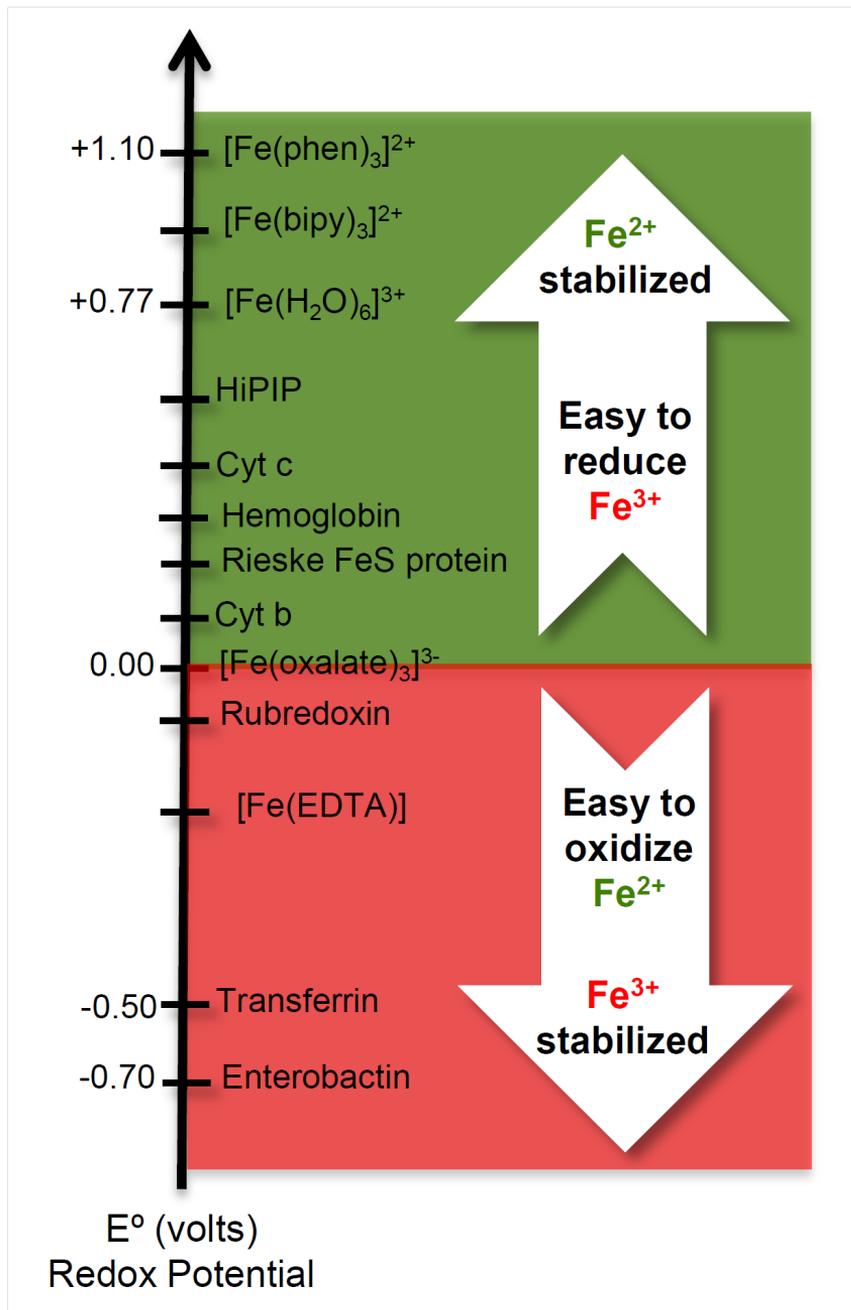
Asimismo, la semirreacción de  $H_2O_2/OH$  tiene un potencial de +0.46 V, y solo las especies de Fe (II) con un potencial *redox* Fe (III)/Fe (II) por encima de 0.46 V evitarán la formación de radicales hidroxilo. Por lo tanto, las especies de hierro con potenciales *redox* Fe (III)/Fe (II) en el rango de 0.46 a -0.16 V conducirán a radicales hidroxilo ya que Fe (III) se reduce a Fe (II) por  $O_2^{\bullet}$  y luego, Fe (II) puede reducir  $H_2O_2$  a  $OH^{\bullet}$ .

Los organismos vivos manejan esta situación utilizando ciertas biomoléculas para unirse al hierro y poder usarlo así de muchas

## CAPÍTULO 1

---

maneras sin el riesgo de sufrir reacciones de Fenton. Por ejemplo, la transferrina reduce el riesgo de reacciones de Fenton durante el transporte de hierro. La transferrina, la proteína de transporte de hierro en los mamíferos, exhibe una alta afinidad por Fe (III) ( $K = 10^{20}$ )<sup>14,15</sup>. Dos átomos de Fe (III) están unidos por la proteína, lo que resulta en una disminución del potencial *redox* Fe (III)/Fe (II) a -0.50 V. Este valor por debajo de -0.16 V permite a la transferrina transportar hierro de manera segura a través del plasma a todas las células sin riesgo de conducir a la formación de ROS.



**Fig. 2:** Potenciales redox a pH 7(en voltios) de algunas especies de hierro relevantes.

Los dos inconvenientes de las características químicas del hierro, es decir, la insolubilidad del Fe (III) y la producción de radicales tóxicos por el hierro libre, deben pues abordarse conjuntamente en algunos procesos biológicos, como el proceso de absorción de hierro por los enterocitos en el duodeno. El hierro es oxidado por los jugos gástricos estomacales, y la mayor parte del hierro alcanza el duodeno en la forma Fe (III) <sup>16</sup>. Como el estómago tiene un pH < 3, el Fe (III) permanece soluble hasta que pasa al duodeno, donde el pH es significativamente mayor. Por lo tanto, para entrar en el enterocito el Fe (III) debe reducirse a Fe (II). La absorción del Fe (II) debe hacerse rápidamente para evitar la formación de radicales hidroxilo. Para superar este inconveniente, los humanos hemos desarrollado un mecanismo muy eficiente basado en un par de proteínas. La transferencia del hierro a través de la membrana del enterocito ocurre debido a la actividad combinada de dos proteínas: el transportador de metales divalente 1 (DMT1) y el citocromo B duodenal (DcytB), el cual reduce Fe (III) a Fe (II) <sup>17</sup>. El par DcytB/DMT1 es necesario para la absorción de hierro ya que el hierro entra en el lumen del intestino delgado principalmente como Fe (III). Tras la reducción por parte de DcytB, el Fe (II) se transfiere a través de la membrana apical de los enterocitos mediante DMT1.

La química del hierro en la vida, es por lo tanto un ejemplo de cómo los organismos han evolucionado creando una compleja maquinaria molecular, mediante una serie de mecanismos homeostáticos que regulan la absorción, el transporte, el almacenamiento y la movilización del hierro celular, para superar

esas dificultades que presenta la química del hierro de una forma extraordinariamente elegante y eficiente <sup>1,2</sup>. En esta maquinaria, un sinnúmero de biomoléculas participan facilitando y modulando todo un ciclo de procesos químicos que tienen por finalidad el empleo de este metal para llevar a cabo una gran variedad de reacciones *redox* esenciales para los organismos vivos <sup>18,19</sup>.

### **1.2. El hierro en el cerebro.**

Como se ha indicado anteriormente, el hierro es esencial para la vida, y en el cerebro es importante para multitud de funciones, tales como el desarrollo neuronal, la expresión génica, la función enzimática, la síntesis de dopamina, del grupo hemo y de los clústeres hierro-azufre, así como en el transporte de electrones <sup>20-22</sup>.

Todavía se necesitan datos más rigurosos y definitivos para conocer el mapa exacto de la distribución del hierro y la ferritina en el cerebro. La gran cantidad de datos que se pueden encontrar en la literatura son a menudo contradictorios <sup>23</sup>. Sin embargo, se acepta que las cantidades de hierro en la *substantia nigra*, una pequeña estructura nerviosa de aproximadamente 500 mg localizada bilateralmente en el mesencéfalo, la cual produce el neurotransmisor dopamina, y en el hipocampo estarían cercanas a 200 ng/mg y 50 ng/mg, respectivamente. Ha sido aceptado que la enfermedad de Parkinson (PD) está causada por una degeneración progresiva de las células nerviosas ubicadas en la *substantia nigra*, mientras que la enfermedad de Alzheimer (AD) está provocada por la muerte de células nerviosas en el hipocampo. El motivo de la

degeneración de las neuronas en la *substantia nigra* en PD es todavía un misterio, aunque cabe destacar que grandes concentraciones de hierro, comparables a las del hígado, se encuentran en este compartimento cerebral en pacientes con PD.

De hecho, Youdim et al. formularon la hipótesis de que la PD fuera una progresiva siderosis de la *substantia nigra*, que potenciaría el estrés oxidativo <sup>24</sup>. La existencia de aproximadamente un orden de magnitud mayor entre los niveles de hierro medidos en los trastornos neurológicos y los controles de pacientes sanos ha sido revisada de manera excelente por Galazka-Friedman <sup>23</sup>. Como afirman los autores, es posible que el hierro esté involucrado en la patogénesis y los trastornos neurológicos, ya que incluso cambios menores en la cantidad y forma del hierro pueden iniciar procesos que conducen a la muerte celular. En cualquier caso, es sorprendente que el nivel de hierro en el cerebro humano aumenta linealmente con la edad, alcanzando un *plateau* en la *substantia nigra* a los cuarenta, siendo precisamente a esta edad cuando comienzan los episodios neuropatológicos.

Además, el exceso local de hierro se produce en el sitio donde se desarrolla la neurodegeneración y donde se produce la agregación de proteínas específicas. Esta evidencia sugiere que una mayor concentración de hierro, incluso sutil, en los tejidos contribuye a generar estrés oxidativo. Sin embargo, también es cierto que la cuestión de si la acumulación de hierro pudiera ser un factor de inicio de estas enfermedades o si se produce como consecuencia de la alteración de los procesos metabólicos aún no

ha encontrado una respuesta. Asimismo, la cuestión sobre el origen del exceso de hierro tampoco está clara del todo. Sin embargo, cualquiera que sea el origen, los altos niveles de hierro libre son tóxicos debido a la formación de ROS que finalmente conducen a la muerte neuronal <sup>25</sup>. Además, la agregación patológica de proteínas parece estar modulada por el hierro <sup>26-28</sup>.

### **1.3. Ferritina, el almacén de Fe en los organismos vivos.**

Los organismos han desarrollado un sistema para almacenar hierro constituido por la familia de proteínas de la ferritina. La ferritina es la principal proteína de almacenamiento del hierro en la mayor parte de los organismos vivos en el reino animal, vegetal y microbiano. Su localización es básicamente intracelular y su estructura, altamente conservada, está constituida por una cápside proteica formada por 24 subunidades. La apoferritina, es capaz de albergar en su cavidad una enorme cantidad de Fe (III) (hasta 4500 átomos de Fe) en forma de mineral principalmente de tipo ferrihidrita. Una vez almacenado, este hierro ferritínico sigue estando disponible para ser movilizado cuando la célula lo necesite.

La función de almacenamiento de hierro de la ferritina tiene un papel central en la homeostasis del hierro celular. También se ha observado que el nivel de expresión de ferritina y la cantidad de Fe (III) almacenada en la cavidad de ferritina se alteran en respuesta al estrés oxidativo. Además de su función de almacenamiento de hierro, estudios recientes han sugerido otros papeles para la

ferritina <sup>29</sup>, incluyendo un papel en la inmunidad y autoinmunidad <sup>30</sup> así como en el metabolismo lipídico.

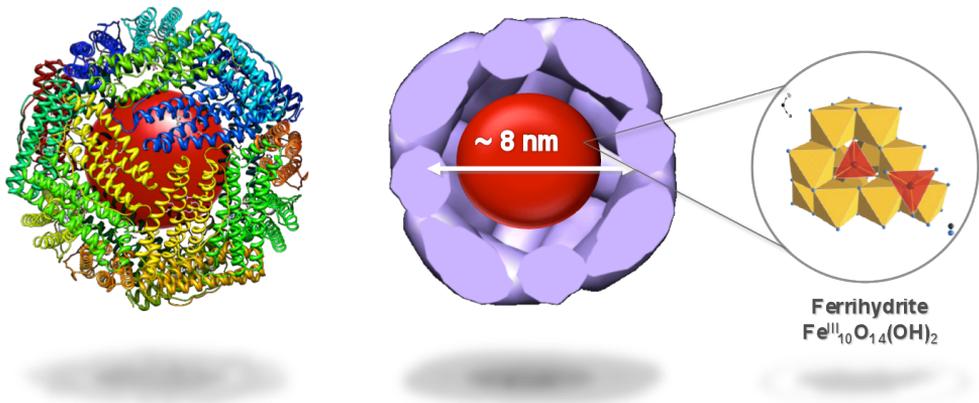
### **1.3.1. Implicaciones de la ferritina en neuroquímica.**

Trastornos en las funciones de la ferritina han sido comúnmente relacionados con las típicas enfermedades ligadas al metabolismo del hierro, como hemocromatosis o anemia, pero la ferritina adquiere cada vez más importancia como una molécula crucial en algunas patologías neurológicas, como el Parkinson (PD) o el Alzheimer (AD) <sup>36</sup>. Por lo tanto, conocer tanto como se produce la absorción de hierro en la ferritina, como los mecanismos de almacenamiento y liberación en detalle se convierte en un desafío para la comunidad científica con el fin de comprender la etiología de estos síndromes y, finalmente, acercarse al diseño de nuevos agentes terapéuticos basados en el metabolismo del hierro.

- *Estructura de la ferritina.*

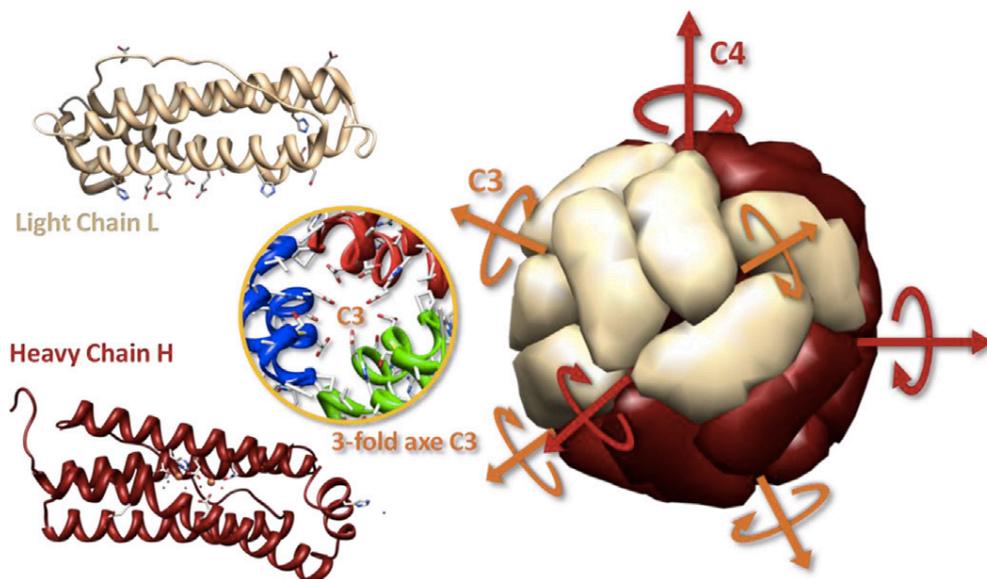
La estructura de multitud de ferritinas ha sido determinada mediante difracción de rayos-X en un amplio rango de organismos y tejidos biológicos, siendo evidente que se ha conservado una estructura común a través de la evolución. La ferritina más ampliamente estudiada es la de bazo de caballo, tradicionalmente considerada como el modelo de ferritina en mamíferos. Ésta consiste en una envoltura proteica hueca, compuesta por 24 subunidades ensambladas en una simetría cúbica que rodea una cavidad de 8 nm de diámetro, capaz de acomodar miles de átomos

de hierro como un mineral de Fe (III) de tipo ferrihidrita  $[\text{Fe}^{\text{III}}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$  (Fig. 1) <sup>10</sup>.



**Fig. 3:** Estructura de la ferritina.

La envoltura proteica de la ferritina genera dos tipos de canales, 6 de naturaleza hidrofóbica y 8 de naturaleza hidrofílica, que atraviesan la estructura de la proteína hasta el interior de la cavidad. Los ocho canales hidrófilos poseen aproximadamente 4-5 Å de diámetro con simetría  $C_3$  <sup>31</sup>, y se cree que son la vía de entrada de Fe (II) al interior de la cavidad así como de permitir la entrada y salida de agua, cationes y moléculas hidrofílicas de un tamaño adecuado <sup>32</sup>.



**Fig. 4:** Estructura de la cápside ferritínica. Imagen tomada de: F. Carmona *et al*, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, 257, 2752-2764.

En eucariotas, la ferritina es el producto del auto ensamblaje de dos tipos de subunidades o cadenas altamente homólogas, que se denominan en función de su peso molecular relativo: subunidades H (o cadenas pesadas) de 178 aminoácidos y 21 kDa, y subunidades L (ligeras) con 171 aminoácidos y 19 kDa de peso. Ambas subunidades están relacionadas en términos de estructura primaria (~53% de identidad en la secuencia proteica) y terciaria<sup>11,33</sup>. Sin embargo, estas subunidades tienen diferente funcionalidad. Las subunidades H juegan un papel crucial en la rápida detoxificación del hierro debido a que contienen el centro catalítico ferroxidasa, donde tiene lugar una oxidación catalítica de Fe (II). En cambio, las subunidades L están asociadas con la nucleación y mineralización del Fe (III) en la cavidad de la ferritina<sup>32</sup>. De acuerdo con esto, el ratio H/L en la cápside proteica de la

ferritina varía ampliamente en diferentes tejidos. Así, ferritinas ricas en subunidades L predominan en órganos de almacén de hierro como el hígado y el bazo, mientras que en los órganos en los que se requiere una rápida detoxificación de hierro, como el corazón y el cerebro, o leche materna, la ferritina es rica en subunidades H <sup>34,35</sup>.

El núcleo de ferritina se forma a partir de Fe (II) y no de Fe (III). Como se discutirá en las siguientes secciones, el Fe (II) se oxida y se almacena principalmente como mineral de Fe (III). Del mismo modo, cuando la célula requiere hierro de la ferritina, este se elimina como Fe (II). Si la proteína ferritina es puramente vista como un almacén de hierro, hay dos procesos que tienen que funcionar correctamente: uno, el rápido y eficiente almacenamiento, y dos, la liberación controlada de hierro. En un escenario biológico, cuando la ferritina pierde su capacidad de almacenamiento de hierro, el Fe (II) permanecería libre en el citoplasma. Del mismo modo, cuando la ferritina libera hierro de forma descontrolada, se produce Fe (II), que se vierte en el citoplasma. En otras palabras, una disfunción de la ferritina siempre da lugar a la existencia de Fe (II) libre, con independencia de la razón de su mal funcionamiento.

Como se mencionó anteriormente, el Fe (II) libre promueve la formación de ROS, que producen daño oxidativo. Curiosamente, el daño oxidativo en las neuronas es una causa primaria de enfermedades degenerativas como AD <sup>37</sup>. Además, según lo reportado recientemente por Kozlowski et al. <sup>38</sup>, Fernández et al.

<sup>39</sup>, Hureau y Dorlet <sup>40</sup> y Viles <sup>41</sup>, el Fe (II) libre y otros metales pueden contribuir a la aparición de algunas enfermedades neurológicas, al inducir la agregación de algunas proteínas, es el caso de  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína o la proteína priónica, que se acumulan respectivamente en pacientes de AD, PD y enfermedad de la proteína priónica (PPD)

Las razones del mal funcionamiento de la ferritina, ya sea en la absorción de hierro, almacenamiento o liberación de hierro, aún no están claras, pero los datos apoyan cada vez más dos líneas de evidencia. Primero, la existencia de un exceso de un agente reductor químico que interactuaría con la ferritina <sup>42</sup>. En segundo lugar, las mutaciones genéticas que afectarían a cualquiera de las estructuras del polipéptido de ferritina <sup>43</sup>, o la H <sup>44</sup> o la L <sup>45</sup> ferritina. Esto conduce a relaciones H/L indeseables en las cápsidas de ferritina. Ambas vías se han estudiado intensamente, relacionándolas con trastornos neurológicos <sup>46</sup>.

### **1.3.2. Controversias entorno a la ferritina.**

#### **a) Centro catalítico ferroxidasa.**

Aunque el núcleo metálico de la ferritina es básicamente ferrihidrita, donde el hierro presenta un estado de oxidación Fe (III), este núcleo se forma a partir de Fe (II) y no de Fe (III). Esto conlleva necesariamente a que, en algún momento de su travesía al interior de la proteína, el Fe (II) sea oxidado a Fe (III), por lo que debe existir un centro ferroxidasa responsable de esta oxidación. No obstante, el mecanismo de la reacción de oxidación de Fe (II) a

Fe (III) en el centro ferroxidasa de la ferritina es actualmente objeto de controversia.<sup>34,47-49</sup>

El mecanismo que había sido establecido consideraba que el Fe (II) se desplaza a través de los canales hidrofílicos hasta fijarse en el centro ferroxidasa libre de una subunidad H, donde es catalíticamente oxidado por una reacción con oxígeno molecular hasta formar un complejo peroxo-di-férrico (DFC). Los DFCs formados migrarían espontáneamente del centro ferroxidasa, dejándolo completamente vacante y continuarían el trayecto hacia el interior de la cavidad, donde agregarían para formar entidades multiméricas de Fe (III), que finalmente se fijarían en los puntos de nucleación de la cavidad proteica donde iniciarían el crecimiento del núcleo de hierro.<sup>34,47</sup>

En contraste con esta propuesta, resultados recientes contradicen esta naturaleza “vacía” del centro ferroxidasa, ampliamente aceptada. El modelo propuesto por Hagen et al. propone un mecanismo unificado, tanto en *archaea* como en eucariotas, en el cual dos Fe (II) son oxidados secuencialmente en el centro ferroxidasa<sup>12,48</sup>. A diferencia con el modelo anterior propuesto, este centro cargado con Fe (III) es considerado un grupo prostético estable hasta la llegada de un nuevo átomo de Fe (II), que dispararía un desplazamiento secuencial de Fe (III), y en presencia de oxígeno molecular, la consecuente oxidación catalítica del Fe (II) a Fe (III) (Fig. 5).

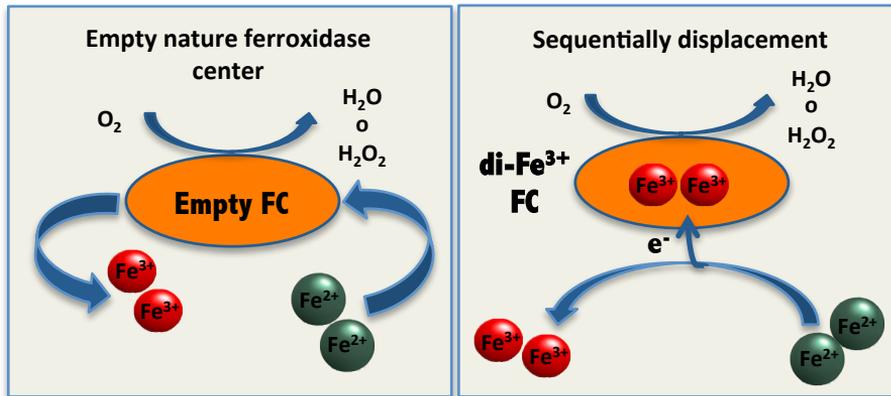


Fig. 5: Naturaleza del centro ferroxidasa según los dos modelos planteados.

### b) ¿Cómo llega el Fe (II) al centro ferroxidasa?

La observación de que el centro catalítico de la ferritina se encuentra en el centro de los cuatro haces  $\alpha$ -helicoidales de cada subunidad H, plantea la cuestión de cómo el Fe (II) llega a este sitio. Cada vez es más aceptado que el Fe (II) *in vivo* llega a la ferritina mediante una proteína chaperona de Fe (II) <sup>50,51</sup>.

La ruta exacta que sigue el Fe (II) hacia el centro ferroxidasa de la ferritina no se entiende completamente. Se cree que los canales de simetría  $C_3$  son el principal camino de entrada de Fe (II) en la ferritina debido a la existencia de un gradiente de carga negativa desde la superficie hasta la cavidad, pero no se pueden excluir otras vías.

El cálculo de un mapa de potencial electrostático de la ferritina H humana (HuHft) llevó a la conclusión de este gradiente electrostático en el canal de simetría  $C_3$  se debe a la presencia de residuos cargados positivamente en la superficie externa cerca de

estos sitios, y residuos de aminoácidos negativamente cargados dentro del canal <sup>52</sup>.

Gracias a la observación mediante rayos X de la estructura cristalina de la HuHFt tratada con Zn (II) se demostró que el Zn (II) es capaz de unirse a los ocho canales de simetría  $C_3$  presentes en la estructura de la HuHFt, y que esta unión de Zn (II) inhibe parcialmente la oxidación de Fe (II) en el centro de ferroxidasa <sup>53,54</sup>. Este hecho experimental está de acuerdo con la idea de que los canales de simetría  $C_3$  son el camino de entrada del Fe (II) al centro ferroxidasa.

### **c) Nucleación y mineralización en la ferritina.**

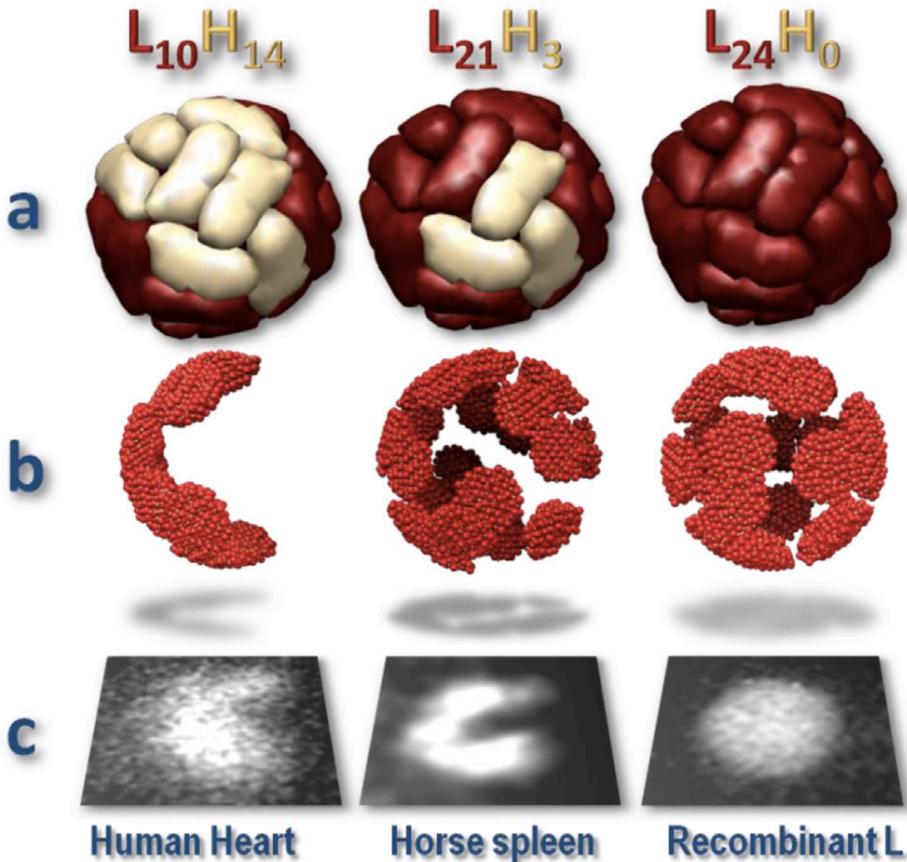
Otro de los grandes interrogantes sobre el funcionamiento de la ferritina es cómo se forma realmente el núcleo de hierro dentro de la cavidad proteica. Brown *et al.* propusieron que el mineral de la ferritina empieza a formarse simultáneamente en ocho puntos de nucleación diferentes dada la simetría cúbica de la cavidad central de la proteína <sup>55</sup>. El modelo de Brown explica la morfología simétrica cúbica observada para los núcleos de ferritina hepática, que contienen el eje  $C_4$  típico y ejes de simetría  $C_3$ .

Sin embargo, nuestro grupo mediante un estudio realizado con HAADF-STEM, en el que se trabajó con cuatro ferritinas con diferente contenido en subunidades H y L propuso un nuevo modelo para la formación del núcleo de hierro de la ferritina, el crecimiento del núcleo de hierro de la ferritina estaría basado en que existirían  $24-n$  sitios de nucleación, donde  $n$  es el número de subunidades H, ya que éstas carecen de centros de nucleación y no

## CAPÍTULO 1

---

contribuirían a la nucleación del mineral de hierro y por lo tanto al crecimiento de éste <sup>56</sup>. Esto explica la presencia de simetrías no cúbicas en los núcleos de nuestras muestras heteropoliméricas (ambas subunidades) de ferritina nativa (bazo de caballo y corazón humano). Estos centros de nucleación crecen y se conectan para producir la partícula de hierro. Por lo tanto, el crecimiento del núcleo de hierro en la ferritina se controlaría por la relación H/L, de manera que éste tendrá una simetría menos cúbica al aumentar la relación H/L <sup>56</sup>.

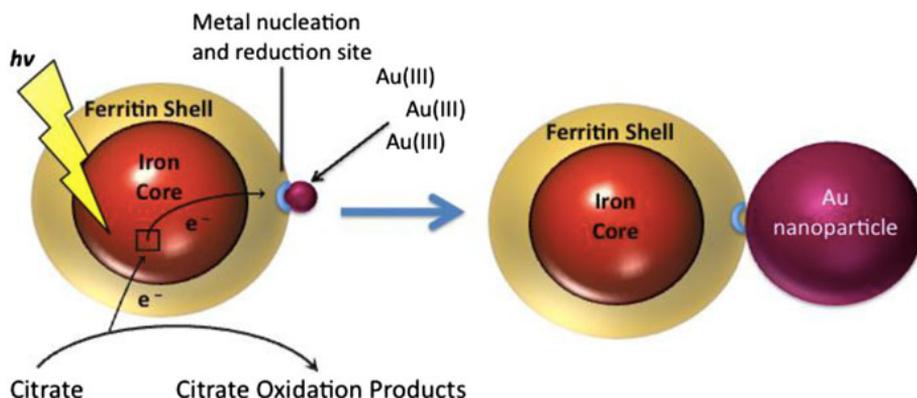


**Fig. 6:** (A) Estructura de las ferritinas de corazón humano, bazo de caballo y L recombinante. Las subunidades L están en rojo y las H en blanco. (B) Morfología modelada del núcleo de hierro y su proyección teniendo en cuenta sólo las subunidades L de nucleación. (C) Imágenes experimentales de cada ferritina obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión HAADF-STEM, exhibiendo las morfologías esperadas mediante el modelo 24-n. Imagen tomada de: F. Carmona *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, 257, 2752-2764.

#### **d) Propiedades fotorreductoras del núcleo ferrihidrita de la ferritina.**

Las nanopartículas de ferrihidrita que conforman el núcleo de la ferritina son semiconductoras y activas fotoquímicamente. Esto quiere decir que al absorber fotones cuya energía exceda la anchura de banda de semiconducción (de 2,5 a 3,5 eV <sup>57</sup>) se promueve un electrón de la capa de valencia a la de conducción y se generan huecos positivos en la banda de valencia lo suficientemente estables como para producir reacciones *redox* con los componentes del medio <sup>58</sup>.

Se ha reportado que la ferritina en presencia de dadores de electrones, como citrato, tartrato u oxalato, es capaz de fotorreducir diferentes especies como: Cu (II) a Cu (0) <sup>59</sup>, Au (III) a Au (0) <sup>60</sup>, Cr (VI) a Cr (III) <sup>57</sup>, citrocromo c y viológenos <sup>58</sup> (Fig. 5).



**Fig. 7:** Mecanismo de formación de nanopartículas de oro (AuNP) por irradiación de ferritina con luz. La ferritina posee un sitio de nucleación que atrae a los iones Au (III). La excitación fotoquímica del núcleo de hierro transfiere electrones a través de la cubierta de la proteína para reducir los iones de Au (III). Los agujeros de electrones creados por la irradiación se repondrían gracias al citrato, que actuaría como dador de electrones. La partícula de oro inicial actuaría como un sitio de nucleación que atraería más iones Au (III), que a su vez se reducirían y depositarían en la partícula de oro en crecimiento. Imagen tomada de: R. K. Watt *et al.*, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 2563–2575.

Las nanopartículas de ferrihidrita también son capaces de catalizar reacciones de foto-reducción, pero su actividad es de corta duración ya que la foto-catálisis se detiene cuando los iones Fe (II) se oxidan a Fe (III) y éstos precipitan por hidrólisis. Sin embargo, ha sido propuesto que en el núcleo ferrihidrítico de la ferritina, el Fe (II) formado migraría al centro ferroxidasa, donde se reoxidaría a Fe (III) y migraría nuevamente al interior de la ferritina, reincorporándose al núcleo mineral. La actividad ferroxidasa pues, evitaría que el hierro se moviese hacia el medio exterior, manteniendo el núcleo prácticamente inalterado<sup>61</sup>.

Dado que el núcleo mineral de ferritina está rodeado por una cubierta proteica de aproximadamente unos 2 nm de espesor, que posee canales de 4 -5 Å de diámetro, surge la pregunta sobre el mecanismo de fotorreducción que implica moléculas mucho más grandes que el tamaño de poro. Nikandrov et al.<sup>58</sup> sugirieron que la transferencia de electrones a larga distancia entre el núcleo mineral de ferritina y los reactivos *redox* externos se produciría mediante túnel de electrones a través de la cápside proteica de la ferritina<sup>58</sup>.

### **e) ¿Cómo se libera el Fe de la ferritina?**

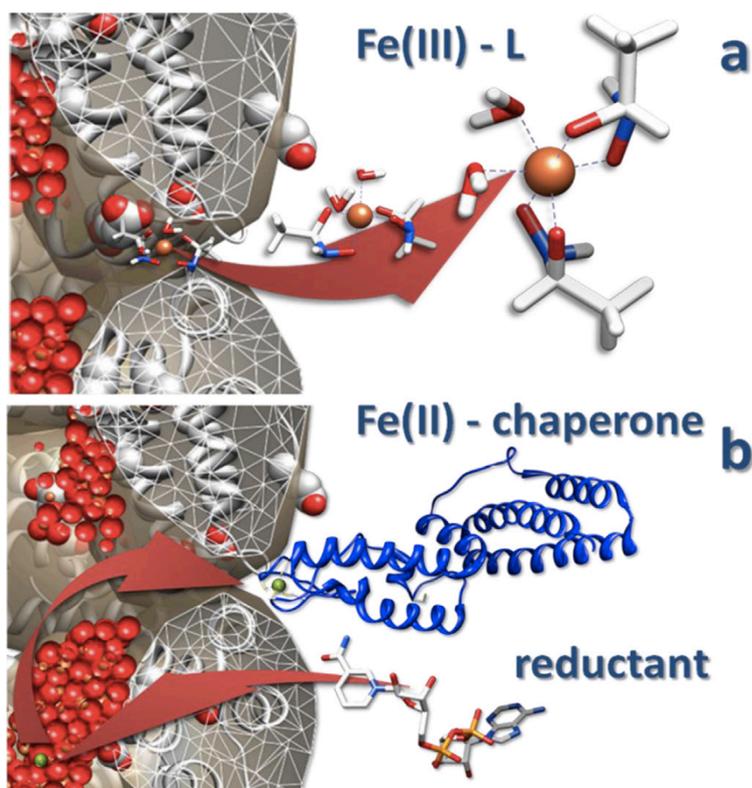
El mecanismo de recuperación de Fe a partir de ferritina es poco conocido. En base a los datos actuales, se proponen cuatro modelos globales para explicar la liberación de hierro de ferritina: (i) la existencia de un equilibrio entre el hierro almacenado en ferritina y el hierro en el citoplasma, (ii) la degradación de la cápside de la ferritina (iii) la participación de una chaperona que se acoplaría con la ferritina y retiraría directamente el hierro (III), y (iv) la existencia de una biomolécula dadora de electrones que se acople a la ferritina para reducir el Fe (III) del mineral de ferrihidrita y facilitar la movilización de Fe (II), que sería quelado por una chaperona fuera de la cápside de ferritina (Fig. 8).

Aunque no se dispone de pruebas definitivas que apoyen el modelo de reducción-quelación (opción iv anterior), este mecanismo es el más aceptado, ya que algunos datos experimentales parecen apoyar esta hipótesis. Por un lado, la naturaleza reductora bien conocida del medio intracelular

## CAPÍTULO 1

---

proporciona moléculas tales como flavinas, glutatión y ácido ascórbico, que son capaces de reducir y movilizar el hierro del núcleo de ferritina <sup>62</sup>. Además, estudios *in vitro* muestran que el método más eficiente para eliminar el hierro de la ferritina es mediante la reducción-quelación (Fig. 8) <sup>63</sup>. De hecho, esta es la estrategia comúnmente utilizada en el laboratorio para obtener apoferritina (proteína sin átomos de hierro) a partir de ferritina. El vaciado del hierro de la ferritina, se realiza frecuentemente mediante el uso de ácido tioglicólico (TGA) como agente reductor y 2,2 -alpha-bipiridilo (bipy) o ferrozina (fz) como quelantes de Fe (II).



**Fig. 8:** Modelos propuestos para la salida Fe de la ferritina. Imagen tomada de: F. Carmona *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, 257, 2752-2764.

#### **1.4. Frataxina: una proteína en busca de una función.**

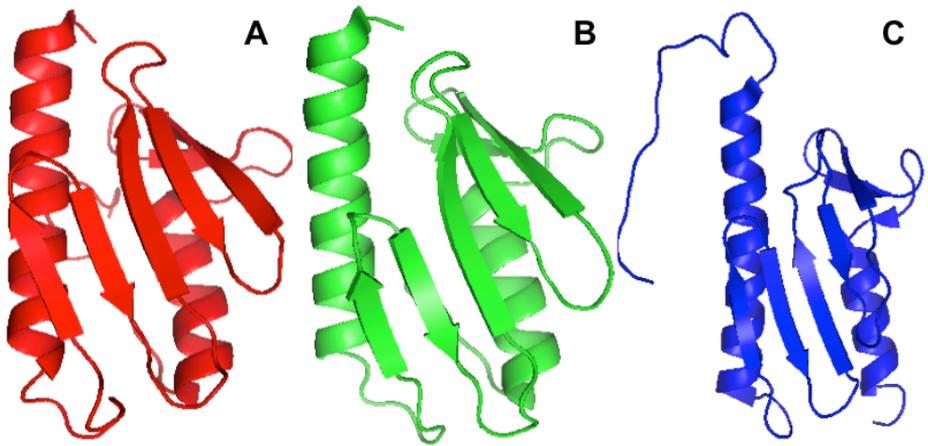
La frataxina es una proteína mitocondrial altamente conservada en la evolución. Presenta homólogos en casi todos los organismos conocidos, incluidos mamíferos, bacterias, hongos y plantas<sup>64-66</sup>.

- *Estructura de la frataxina.*

A partir del análisis de secuencias de frataxina se pueden distinguir dos regiones distintas, un bloque N-terminal de 70-90 aminoácidos, ausente en procariotas y no conservado en eucariotas; y una parte C-terminal que comprende un bloque de 100-120 aminoácidos que está conservado en la mayoría de los organismos, indicando que es la parte funcional de estas proteínas.

En eucariotas, la frataxina está codificada en el genoma nuclear y se localiza en la matriz mitocondrial. Presenta un único plegamiento proteico característico. El dominio frataxina en humanos (residuos 88-210, sin la secuencia de importe a mitocondria) tiene una conformación  $\alpha\beta$ -sandwich (Fig. 9 A), donde las láminas  $\beta$  forman un plano de  $\beta$  antiparalelas que interaccionan con dos  $\alpha$ -hélices. Doce residuos acídicos de la hélice  $\alpha_1$  y de la hoja  $\beta_1$  forman una zona de alta densidad de carga negativa en la superficie de la proteína creando un dipolo, que se postula como un sitio potencial de interacción con iones metálicos, ligandos u otras proteínas necesarias para ejercer su

función <sup>67</sup>. Tanto la estructura global como su superficie aniónica, se encuentra conservada en todos los organismos estudiados (Fig. 9) <sup>64,68</sup>.



**Fig. 9:** Estructura conservada de las frataxinas más estudiadas a partir de sus PDBs: A) HuFH (1ekg) <sup>67</sup>; B) CyaY (1ew4) <sup>69</sup>; C) YFH1 (2ga5) <sup>70</sup>.

### 1.4.1. Implicaciones de la frataxina en neuroquímica.

La FRDA (*Friedreich's Ataxia*) es una enfermedad rara, que conduce a una degeneración neuro- y cardio-severa (mortal) causada por una deficiencia de frataxina <sup>71</sup>. Las consecuencias fisiopatológicas de la deficiencia de frataxina son, una interrupción severa de la biosíntesis de clústeres hierro azufre, la sobrecarga de hierro mitocondrial acoplada a la desregulación del hierro celular y una aumento de la sensibilidad al estrés oxidativo <sup>68,72</sup>.

Si la acumulación de hierro mitocondrial tiene un papel causal en las disfunciones desencadenadas por la deficiencia de frataxina o si es solo un resultado de la deficiencia de esta, ha sido tema de

debate <sup>73</sup>. Lo que si está claro es que tanto la distribución intracelular del hierro, así como la expresión de proteínas relacionadas con este, están alteradas debido a la deficiencia de frataxina <sup>73</sup>.

El estrés oxidativo ocurre en las células deficientes en frataxina y está relacionado con el metabolismo alterado del hierro. La primera evidencia de esta relación fue la demostración de que la levadura deficiente en frataxina <sup>74</sup> y las células cultivadas de pacientes con FRDA <sup>75</sup> son altamente sensibles al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  genera el radical hidroxilo altamente tóxico ( $OH\cdot$ ) al reaccionar con Fe (II) mediante la ya mencionada reacción de Fenton. El  $OH\cdot$  es capaz de producir daños en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La deficiencia de frataxina aumenta los niveles de ambos componentes de la reacción de Fenton: el hierro aumenta debido a una ineficiente síntesis de clústeres hierro azufre (ISC); y el  $H_2O_2$  aumenta debido a la disminución de la actividad de la cadena respiratoria como resultado de la alteración de los complejos respiratorios que contienen ISC I, II y III.

En mitocondria, el  $H_2O_2$  se forma a través de la dismutación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) catalizado por la superóxido dismutasa 2 (SOD2). A su vez, el  $O_2^{\cdot-}$  se genera por la adición directa al oxígeno de electrones que se escapan prematuramente de la cadena respiratoria, una fuga que aumenta cuando la cadena respiratoria está defectuosa. El  $H_2O_2$  es eliminado por la glutatión peroxidasa mitocondrial, a expensas del glutatión (antioxidante), que parece

estar disminuido en la FRDA, posiblemente debido a un consumo excesivo <sup>76</sup>.

### **1.4.2. Controversias entorno a la función de la frataxina.**

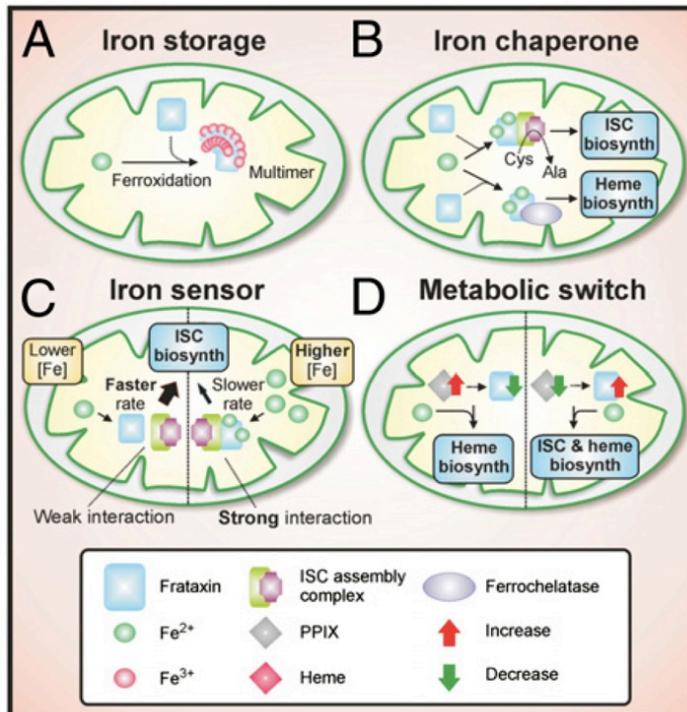
Hasta la fecha, las evidencias acumuladas sugieren que la frataxina está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del hierro en mitocondria, puesto que como acabamos de mencionar una deficiencia de ésta (Ataxia de Friedreich), ocasiona una acumulación de Fe en mitocondria <sup>77,78</sup>.

Como en otras partes celulares, las mitocondrias deben almacenar iones metálicos en formas disponibles y no tóxicas ya que algunos iones metálicos libres, como los del cobre y el hierro, pueden generar rápidamente radicales hidroxilo (reacción de Fenton) <sup>1</sup>. Para evitar la presencia de iones metálicos libres, las mitocondrias tienen mecanismos para la homeostasis del metal, controlando su captación, almacenamiento y liberación. La proteína frataxina podría estar involucrada en estas funciones.

Las funciones de la frataxina parecen estar pues relacionadas con el metabolismo del hierro (Fig. 10) e incluirían la biogénesis de ISC y del grupo hemo, así como el almacenamiento de hierro. La frataxina también ha sido implicada en la depuración (*scavenging*) de hierro <sup>79</sup>, como regulador del estrés oxidativo <sup>80</sup>, y como una chaperona de hierro <sup>81</sup>.

La información más abundante sobre la posible función de la frataxina proviene de estudios con ortólogos de frataxina de levaduras (YFH1) y de bacterias (CyaY) que comparten un alto grado de identidad de secuencia con la proteína humana <sup>68</sup>. Un

consenso es que las funciones de la frataxina comparten un requisito, fijar el hierro mitocondrial de una forma u otra <sup>68,82</sup>. Aunque hay varias propuestas, la función exacta de la frataxina sigue siendo tema de controversia <sup>82-84</sup>.



**Fig. 10:** Esquema de las funciones propuestas para la frataxina. (A) La frataxina puede realizar una función mitocondrial de almacenamiento de hierro similar a la ferritina. (B) La frataxina puede funcionar como una chaperona de hierro uniendo el hierro y luego suministrándolo. (C) El ortólogo frataxina, CyaY puede funcionar como un regulador negativo de "detección de hierro" que inhibe la velocidad de montaje de ISC en condiciones de alto contenido de hierro mitocondrial y baja disponibilidad de apo-aceptor ISC. (D) La frataxina también puede funcionar como un "switch metabólico" que permite que la mitocondria favorezca las síntesis de ISC o del grupo hemo, dependiendo de los niveles de

frataxina y protoporfirina IX <sup>81,85</sup>. Imagen tomada de: Richardson *et al.*, *PNAS*, **2010**, 24, 10775-10782.

### **a) Frataxina como almacén de Fe.**

Se ha propuesto que la frataxina funcione como una proteína mitocondrial de almacenamiento de hierro <sup>86</sup> (Fig. 10 A). El ortólogo de frataxina, YFH1, es capaz de auto-ensamblarse en oligómeros y luego en multímeros de orden superior en presencia de cantidades de [Fe (II)] crecientes <sup>87,88</sup>. La oligomerización dependiente del hierro de YFH1 está asociada con el desarrollo de la actividad ferroxidasa que parece existir sólo en la estructura oligomérica/multimérica <sup>68</sup>. Este hallazgo fue propuesto para explicar que los oligómeros de YFH1 almacenen hierro en un estado de hierro (III) mineralizado y *redox*-inactivo <sup>68,88,89</sup>. Sin embargo, debido a que la oligomerización dependiente del hierro de YFH1 sólo se produce en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, los cuales son típicamente abundantes en la mitocondria <sup>68,87,90</sup>, el apoyo a la hipótesis de almacenamiento de hierro disminuye.

La frataxina humana recombinante una vez oligomerizada parece capaz de unir y almacenar hierro <sup>89,91</sup>. Sin embargo, los monómeros recombinantes de frataxina humana, a diferencia de los de YFH1, no pueden ser inducidos a oligomerizar *in vitro* por hierro <sup>91</sup>. Además, la oligomerización espontánea de la frataxina humana parece depender de la sobreexpresión heteróloga <sup>91</sup>. Estas consideraciones estarían en contra de una función *in vivo* de almacenamiento de hierro para la frataxina humana. La observación de que la manipulación de los niveles mitocondriales

de hierro no afecta a los niveles de expresión de la frataxina no es consistente con un papel significativo en el almacenamiento de hierro mitocondrial <sup>85</sup>. Además, el apoyo a la hipótesis de que la frataxina actúe en mitocondria como proteína de "almacenamiento de hierro" se redujo al descubrir ferritina mitocondrial (ftmt) en organismos superiores <sup>47,92</sup>. La existencia de ftmt parece hacer redundante cualquier papel significativo de almacenamiento de hierro para la frataxina humana. Sin embargo, las células de levadura no expresan ferritina <sup>47</sup>, y es posible que la YFH1 pueda poseer una capacidad adicional de almacenamiento de hierro no compartida por los ortólogos de frataxina en organismos superiores.

### **b) Frataxina como chaperona de Fe.**

Quizás el papel más prometedor para la frataxina sea como chaperona de hierro (Fig. 10 B) en la biosíntesis de ISC y del grupo hemo. Se ha observado que la frataxina interactúa con las proteínas dependientes del hierro que participan en la biosíntesis de ISC y grupo hemo <sup>81,93</sup>, y presuntamente dona hierro a las mismas. Por ejemplo, la YFH1 parece capaz de interactuar con el complejo de montaje ISC central que comprende la proteína de andamio, Isu y la desulfurasa de cisteína Nfs1, y que la presencia de hierro (II) favorece este acoplamiento <sup>81,94</sup>

Recientemente, se ha sugerido que la frataxina interactúa con Isu1 a través de un residuo altamente conservado de triptófano (trp 131) en su región de lámina  $\beta$  conservada <sup>95</sup>. Análogamente, la frataxina humana demuestra interacciones reforzadas con hierro

con Isu y ferroquelatasa <sup>81,90</sup>. Es importante destacar que la interacción de frataxina con Isu o con ferroquelatasa parece incrementar la tasa de síntesis de ISC <sup>81</sup> o la inserción de hierro (II), catalizada por ferroquelatasa respectivamente, en PPIX (protoporfirina IX) <sup>93</sup>. Tales observaciones sugieren que la frataxina puede funcionar como un dador de hierro a Isu y a ferroquelatasa. Los datos emergentes indican que la naturaleza de las interacciones facilitadoras de la frataxina con la maquinaria de la síntesis de ISC y del grupo hemo puede ser más compleja que la simple donación de hierro.

### **c) Frataxina sensor/regulador negativo de Fe.**

Un estudio reciente con CyaY sugiere que la proteína puede actuar como un "sensor de hierro" (Fig. 10 C), que regularía negativamente la tasa de biosíntesis de ISC bajo condiciones de hierro alto y baja disponibilidad de apo-aceptor ISC <sup>80</sup>. Si extendemos este modelo a sistemas eucarióticos, una deficiencia en la expresión de frataxina es presumiblemente perjudicial porque la tasa de biosíntesis ISC puede exceder la disponibilidad de apo-aceptores ISC, resultando en la sobreproducción de ISCs que son inestables en una forma no unida <sup>80</sup>. Esencialmente, este modelo sugiere que además de funcionar como un donador de hierro en la biosíntesis de ISC, la frataxina puede ejercer un "control cinético" sobre la tasa de biosíntesis de ISC, dependiendo de las disponibilidades relativas de apo-aceptores de hierro e ISC. Esto es consistente con las afinidades relativamente bajas (es decir, micromolar) de fijación de hierro por ortólogos de frataxina

provenientes de bacterias, levaduras y humana <sup>68</sup>.

### **1.5. Objetivos.**

El hierro es esencial para la vida. En esta tesis doctoral hemos abordado aspectos del metabolismo de hierro que todavía no han sido resueltos o son actualmente controvertidos. En particular, el trabajo de esta tesis doctoral se ha centrado en dos proteínas: la ferritina, la proteína almacén de hierro y la frataxina, una proteína que a tenor de los datos experimentales parece estar relacionada con el hierro pero cuya función exacta es todavía un enigma. Las propiedades y mecanismos de actuación de estas dos proteínas son objeto de controversia en la actualidad. El objetivo general de esta tesis es poder aportar un mayor conocimiento para contribuir a completar el puzzle complejo de piezas que representa el metabolismo de hierro y en particular el de estas dos proteínas.

Más concretamente nuestro trabajo ha abordado los siguientes objetivos:

1. **¿Tiene la ferritina propiedades de fotocatalizador?** A tenor de los datos en bibliografía, la ferritina puede emplearse en reacciones de fotocátalisis para la oxidación/reducción de sustratos orgánicos mediante irradiación UV. Pretendemos abordar esta posibilidad y descubrir los procesos químicos que ocurren en la ferritina tras excitación lumínica.

2. **Mecanismo de formación del núcleo ferritínico y posterior liberación de hierro.** En particular, hemos pretendido abordar aspectos controvertidos sobre estos dos procesos: por un lado conocer si todos los átomos de hierro del núcleo son oxidados de Fe (II) a Fe (III) en los centros ferroxidasas o si por el contrario, la superficie del óxido de hierro del núcleo actúa como catalizador heterogéneo. Por otra parte, nos hemos interesado en averiguar si la vía de liberación de hierro de la ferritina coincide con la de la entrada, es decir a través de los canales de simetría  $C_3$  y fijación del hierro en los centros ferroxidasa.
3. **Extender el estudio de la interacción de iones metálicos con frataxina al sistema frataxina de plantas y cobre.** Hay evidencias que relacionan la frataxina de plantas con el metabolismo de cobre, sin embargo no existen estudios en bibliografía sobre la interacción directa frataxina de plantas con cobre. Pretendemos abordar esta interacción y la consecuencias estructurales que genera en la proteína.
4. **Abordar el estudio de la interacción entre frataxinas de plantas y hierro.** En particular pretendemos abordar una cuestión crucial: conocer aspectos químicos de esta interacción que nos permitan concluir sobre la función que esta proteína puede tener en el metabolismo de hierro.

## 1.6. Referencias.

1. Crichton, R. *Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. (John Wiley & Sons, 2016).
2. Ilbert, M. & Bonnefoy, V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1827**, 161–175 (2013).
3. Braun, V. & Killmann, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 104–109 (1999).
4. Ratledge, C. & Dover, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 881–941 (2000).
5. Hayyan, M., Hashim, M. A. & Al Nashef, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implication. *Chem. Rev.* **116**, 3029–3085 (2016).
6. Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 192–208 (2004).
7. Fenton, H. J. H. Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron. *J. Chem. Soc. Trans.* **65**, 899–910 (1894).
8. Haber, F. & Weiss, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London. Ser. A - Math. Phys. Sci.* **147**, 332 LP-351 (1934).
9. Heli, H., Mirtorabi, S. & Karimian, K. Advances in iron chelation: an update. *Expert Opin. Ther. Patents* **21**, 819–856 (2011).
10. Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *J. Struct. Biol.* **126**, 182–194 (1999).
11. Levi, S. *et al.* Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem.J.* **288**, 591–596 (1992).
12. Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P. L. & Hagen, W. R. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chem. Rev.* **115**, 295–326 (2015).
13. Carmona, F. *et al.* Ferritin iron uptake and release in the presence of metals and metalloproteins : Chemical implications in the brain. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2752–2764 (2013).

## CAPÍTULO 1

---

14. Aisen, P., Leibman, A. & Zweier, J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930–1937 (1978).
15. Sun, H., Li, H. & Sadler, P. J. Transferrin as a metal ion mediator. *Chem. Rev.* **99**, 2817–2842 (1999).
16. Steele, T. M., Frazer, D. M. & Anderson, G. J. Critical Review Systemic Regulation of Intestinal Iron Absorption. **57**, 499–503 (2005).
17. Lane, D. J. R., Bae, D., Merlot, A. M., Sahni, S. & Richardson, D. R. Update on Function and Regulation. *Nutrients* 2274–2296 (2015).  
doi:10.3390/nu7042274
18. Andrews, N. C., M.D. & Ph.D. Disorders in Iron Metabolism. *N Engl J Med* **341**, 1986–1995 (1999).
19. Harrison, P. M. & Arosio, P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1275**, 161–203 (1996).
20. David, H. & Boldt, M. New Perspectives on Iron: An Introduction. *Am. J. Med. Sci* **318**, 207–212 (1999).
21. Connor, J. R. in *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders* 23–39 (1997).
22. Connor, J. R. and Benkovic, S. A. Iron regulation in the brain: Histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann Neurol.* **32**, S51–S61 (1992).
23. Gałazka-Friedman, J. & Friedman, A. Controversies about iron in parkinsonian and control substantia nigra. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* **57**, 217—225 (1997).
24. M.B.H., Y., D., B. & P., R. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol. Scand.* **80**, 47–54 (2009).
25. Cherny, R. A. *et al.* Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits  $\beta$ -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**, 665–676 (2001).
26. Pérez, M. *et al.* Ferritin is associated with the aberrant tau filaments

- present in progressive supranuclear palsy. *Am. J. Pathol.* **152**, 1531–1539 (1998).
27. A. Takeda, M. Hashimoto, M. Mallory, M. Sundsumo, L. Hansen, A. Sisk, E. M. Abnormal distribution of the non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor/alpha-synuclein in Lewy body disease as revealed by proteinase K and formic acid pretreatment. *Lab. Invest.* **78**, 1169–1177 (1998).
  28. Hashimoto, M. & Masliah, E. Alpha-synuclein in Lewy Body Disease and Alzheimer's Disease. **720**, 707–720 (1999).
  29. Watt, R. K. The many faces of the octahedral ferritin protein. *BioMetals* **24**, 489–500 (2011).
  30. Recalcati, S., Invernizzi, P., Arosio, P. & Cairo, G. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **30**, 84–89 (2008).
  31. Munro, H. N. & Linder, M. C. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev* **58**, 317–396 (1978).
  32. Theil, E. C. Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 304–311 (2011).
  33. Hempstead, P. D. *et al.* Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J. Mol. Biol.* **268**, 424–448 (1997).
  34. Liu, X. & Theil, E. C. Ferritin reactions: direct identification of the site for the diferric peroxide reaction intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8557–8562 (2004).
  35. Tatur, J., Hagen, W. R. & Matias, P. M. Crystal structure of the ferritin from the hyperthermophilic archaeal anaerobe *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 615–630 (2007).
  36. Berg, D., Becker, G., Riederer, P. & Riefse, O. Iron in neurodegenerative disorders. *Neurotox. Res.* **4**, 637–653 (2002).
  37. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream

- antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74 (2009).
38. Kozłowski, H., Luczkowski, M., Remelli, M. & Valensin, D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2129–2141 (2012).
39. Binolfi, A., Quintanar, L., Bertoncini, C. W., Griesinger, C. & Fernández, C. O. Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2188–2201 (2012).
40. Hureau, C. & Dorlet, P. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- $\beta$  peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A $\beta$  sequences. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2175–2187 (2012).
41. Viles, J. H. Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2271–2284 (2012).
42. Dominguez-Vera, J., Fernandez, B. & Galvez, N. Native and synthetic ferritins for nanobiomedical applications: recent advances and new perspectives. *Future Med. Chem.* **2**, 609 (2010).
43. Curtis, A. R. J. *et al.* Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat. Genet.* **28**, 350–354 (2001).
44. Kato, J. *et al.* A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 191–197 (2001).
45. Martin, M. E., Fargion, S., Brissot, P., Pellat, B. & Beaumont, C. A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* **91**, 319–23 (1998).
46. Watt, R. K., Hilton, R. J. & Graff, D. M. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**, 745–759 (2010).
47. Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. *Biochimica et Biophysica Acta*

- Ferritins : A family of molecules for iron storage , antioxidation and more. *BBA - Gen. Subj.* **1790**, 589–599 (2009).
48. Ebrahimi, K. H., Bill, E., Hagedoorn, P. & Hagen, W. R. The catalytic center of ferritin regulates iron storage via Fe(II)-Fe(III) displacement. *Nat Chem Biol* **8**, 941–8 (2012).
  49. Tosha, T., Ng, H. L., Bhattasali, O., Alber, T. & Theil, E. C. Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14562–14569 (2010).
  50. Bridges, J. C. *et al.* A Cytosolic Iron Chaperone That Delivers Iron to Ferritin. *Science (80-. )*. **320**, 1207–1211 (2008).
  51. Nandal, A. *et al.* Article Activation of the HIF Prolyl Hydroxylase by the Iron Chaperones PCBP1 and PCBP2. *Cell Metab.* **14**, 647–657 (2011).
  52. Douglas, T. & Ripoll, D. R. Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin. *Protein Sci.* **7**, 1083–1091 (1998).
  53. Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C. & Chasteen, N. D. Defining metal ion inhibitor interactions with recombinant human H- and L-chain ferritins and site-directed variants: an isothermal titration calorimetry study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 489–497 (2003).
  54. Ebrahimi, K., Hagedoorn, P. & Hagen, W. R. Inhibition and stimulation of formation of the ferroxidase center and the iron core in *Pyrococcus furiosus* ferritin. *J Biol Inorg Chem* **15**, 1243–1253 (2010).
  55. Pan, Y. H. *et al.* 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: New evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *J. Struct. Biol.* **166**, 22–31 (2009).
  56. López-Castro, J. D. *et al.* A new approach to the ferritin iron core growth : influence of the H / L ratio on the core shape. *Dalt. Trans* **41**, 1320–1324 (2012).
  57. Kim, I., Hosein, H., Strongin, D. R. & Douglas, T. Photochemical Reactivity of Ferritin for Cr ( VI ) Reduction. 4874–4879 (2002).  
doi:10.1021/cm0207301
  58. Nikandrov, V. V., C.K. Gratzel, Moser, J. & Gratzel, M. Light induced redox reactions involving mammalian ferritin as photocatalyst. **41**, 83–89

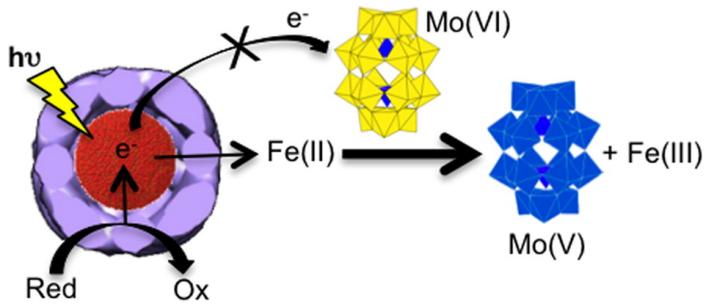
- (1997).
59. Ensign, D., Young, M. & Douglas, T. Photocatalytic Synthesis of Copper Colloids from Cu ( II ) by the Ferrihydrite Core of Ferritin. **43**, 3441–3446 (2004).
  60. Keyes, J. D., Hilton, R. J., Farrer, J. & Watt, R. K. Ferritin as a photocatalyst and scaffold for gold nanoparticle synthesis. *J. Nanopart. Res.* **13**, 2563–2575 (2011).
  61. Watt, R. K., Petrucci, O. D. & Smith, T. Catalysis Science & Technology for energy conversion. 3103–3110 (2013). doi:10.1039/c3cy00536d
  62. Sirivech, S., Frieden, E. & Osaki, S. The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. *Biochem. J.* **143**, 311–5 (1974).
  63. Joo, M. S., Tourillon, G., Sayers, D. E. & Theil, E. C. Rapid reduction of iron in horse spleen ferritin by thioglycolic acid measured by dispersive X-ray absorption spectroscopy. *Biol. Met.* **3**, 171–175 (1990).
  64. Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A. & Bork, P. Friedreich's ataxia protein: Phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* **19**, 465–468 (1996).
  65. Koutnikova, H. *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345–351 (1997).
  66. Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (80- )*. **271**, 1423–1427 (1996).
  67. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.-I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal Structure of Human Frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753–30756 (2000).
  68. Pandolfo, M. & Pastore, A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J. Neurol.* **256**, 9–17 (2009).
  69. Cho, S. J. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin

- family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8932–7 (2000).
70. He, Y. *et al.* Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrochelatase interaction. *Biochemistry* **43**, 16254–16262 (2004).
71. Campuzano, V. *et al.* Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771–80 (1997).
72. Schmucker S and Puccio H. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich ' s ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 103–110 (2010).
73. Radisky, D. C., Babcock, M. C. & Kaplan, J. The Yeast Frataxin Homologue Mediates Mitochondrial Iron Efflux. 4497–4500 (1999).
74. Babcock, M. *et al.* Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709–1712 (1997).
75. Wong, A. *et al.* The Friedreich ' s ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. **8**, 425–430 (1999).
76. Casali, C., Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. & Piemonte, F. Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. 376–379 (2002).
77. Whitnall, M. *et al.* The MCK mouse heart model of Friedreich's ataxia: Alterations in iron-regulated proteins and cardiac hypertrophy are limited by iron chelation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9757–62 (2008).
78. Huang, M. L.-H. *et al.* Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16381–16386 (2009).
79. Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O. & Isaya, G. Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase: Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J. Biol. Chem.* **275**, 41469–41475 (2000).
80. Adinolfi, S. *et al.* Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 390–396 (2009).
81. Yoon, T. & Cowan, J. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of

- frataxin as an iron donor for assembly of clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7856–7862 (2003).
82. Lane, D. J. R. *et al.* Frataxin, a molecule of mystery: trading stability for function in its iron-binding site. *Biochem. J.* **426**, e1-3 (2010).
83. Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: A protein in search for a function. *J. Neurochem.* **126**, 43–52 (2013).
84. Busi, M. V. & Gomez-Casati, D. F. Exploring frataxin function. *IUBMB Life* **64**, 56–63 (2012).
85. Becker, E. M., Greer, J. M., Ponka, P. & Richardson, D. R. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: Characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood* **99**, 3813–3822 (2002).
86. Adamec, J. *et al.* Iron-Dependent Self-Assembly of Recombinant Yeast Frataxin: Implications for Friedreich Ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549–562 (2000).
87. Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, a S., Martin, S. & Pastore, a. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1865–1877 (2002).
88. Park, S. *et al.* Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31340–31351 (2003).
89. O’Neill, H. A. *et al.* Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* **44**, 537–545 (2005).
90. Bencze, K. Z. *et al.* Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem. Commun.* **1**, 1798 (2007).
91. Cavadini, P., O’Neill, H. a, Benada, O. & Isaya, G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 217–227 (2002).
92. Levi, S. *et al.* A Human Mitochondrial Ferritin Encoded by an Intronless Gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 24437–24440 (2001).

93. Yoon, T. & Cowan, J. A. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 25943–25946 (2004).
94. Wang, T. & Craig, E. A. Binding of Yeast Frataxin to the Scaffold for Fe-S Cluster Biogenesis, *Isu* \*. **283**, 12674–12679 (2008).
95. Leidgens, S., de Smet, S. & Foury, F. Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its  $\beta$ -sheet. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 276–286 (2009).





## CAPÍTULO 2: PROPIEDADES (AUTO)FOTOCATALÍTICAS DE LA FERRITINA



### 2.1. Introducción.

Los organismos vivos han desarrollado una compleja maquinaria química basada en ferritina para administrar la disponibilidad de hierro. La ferritina tiene por tanto la doble función de detoxificación y almacenamiento de hierro <sup>1-7</sup>. El hierro almacenado en la ferritina no es tóxico y está disponible cuando la célula lo necesita.

La ferritina más estudiada, utilizada tradicionalmente como modelo de ferritinas de mamífero, es la de bazo del caballo. La ferritina del bazo del caballo (HSFt) consiste en apoferritina, una cubierta esférica hueca de aproximadamente 450 kDa con un diámetro de aproximadamente 12 nm, y una nanopartícula encapsulada de tipo ferrihidrita de Fe (III) <sup>8-10</sup>. La capa de apoferritina se compone de 24 subunidades polipeptídicas de dos tipos: las subunidades H (pesada) y L (ligera). El ensamblaje de las dos subunidades en la cubierta de ferritina da como resultado diferentes tipos de canales que conducen a la cavidad central. Ocho canales hidrofílicos permiten el paso de agua e iones metálicos al núcleo de la proteína.

El hierro de la nanopartícula de ferrihidrita nativa se puede eliminar por reducción <sup>7,11</sup>. El Fe (II) puede difundir posteriormente a través de los canales hidrofílicos hacia el medio externo.

El núcleo de ferritina, principalmente ferrihidrita, es un semiconductor que se ha propuesto para funcionar como fotocatalizador en reacciones *redox*. La irradiación de ferritina con

luz UV-Visible induce la promoción de electrones en el núcleo mineral, desde la banda de valencia a la banda de conducción, generando un par electrón-hueco. Una vez constituido, el par electrón-hueco positivo, el sistema puede generar simultáneamente reacciones de oxidación (a especies que cedan un electrón para neutralizar el hueco positivo de la banda de valencia, tales como ácidos carboxílicos, tioles o sulfitos <sup>12</sup>) y de reducción (a especies que capten el electrón excitado en la banda de conducción; especies tales como Cr (VI), Cu (II), Au (III), viológeno y citocromo c se han reducido usando citrato o tartrato como dadores de electrones sacrificialios <sup>12-16</sup>).

El mecanismo detallado por el que la ferritina actúa como fotocatalizador sigue sin estar claro. El contacto directo entre el núcleo de ferritina y los sustratos que se van a oxidar (dadores de electrones) o los sustratos a reducir (aceptadores de electrones) requiere la entrada de los sustratos a través de la envoltura de ferritina hasta alcanzar la cavidad. Alternativamente, la transferencia de electrones se podría llevar a cabo a través de la capa proteica de apoferritina de 2 nm. En cualquier caso, se ha supuesto que los reductores del sustrato son electrones liberados del núcleo de ferritina <sup>13,14,17-19</sup>.

Suponiendo que la ferritina actúa como un fotocatalizador, el núcleo de ferritina podría eventualmente sufrir fotocorrosión, esto es, el electrón excitado de la banda de conducción puede reducir a un átomo de Fe (III) del núcleo ferritínico, formando Fe (II) y disolviendo la nanopartícula de ferrihidrita. De hecho, trabajos previos han demostrado que la irradiación de ferritina con luz UV-

Visible induce una movilización reductiva de Fe (II) <sup>20</sup>. El Fe (II) se detectó con un quelante de Fe (II) adecuado, ferrozina (sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico, de aquí en adelante fz), a través de la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ . También se ha propuesto que la ferritina podría superar la fotocorrosión <sup>15,17</sup>. En este esquema, el núcleo permanecería en forma activa, mientras el Fe (II) que difunde a través de los canales hidrofílicos llegaría a los centros ferroxidasa dónde volvería a ser oxidado, volviendo a reincorporarse al núcleo.

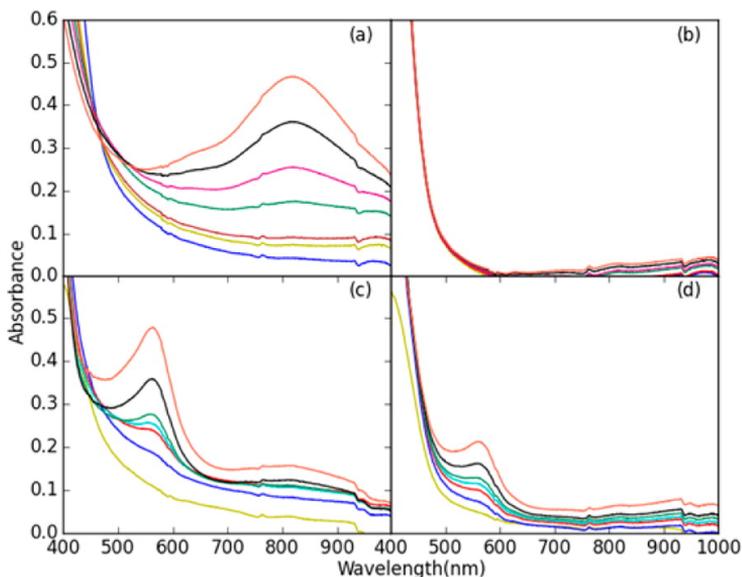
Claramente, los detalles de cómo se produce la fotocatalisis por ferritina siguen siendo inciertos. Los resultados y conclusiones de varios estudios son mutuamente inconsistentes y requieren mayor investigación. Con este fin, hemos diseñado nuevos enfoques para comprender la naturaleza de la reducción del núcleo de ferritina en presencia de luz.

### **2.2. Resultados y discusión.**

En primer lugar, se evaluó la capacidad fotorreductora de la ferritina de bazo de caballo con el polioxometalato electrocromico  $[\text{P}_2\text{Mo}^{\text{VI}}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$  (POM en lo sucesivo) en presencia de un agente dador de electrones como citrato. El POM se caracteriza por reducirse a una familia de especies de valencia mixta  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}$  con un color azul intenso característico, que se detecta fácilmente mediante espectroscopia UV-Vis, por la aparición de una banda ancha centrada en el rango de 700-800 nm <sup>21-23</sup>. El POM es ideal como indicador para nuestros fines porque no puede cruzar los canales de apoferritina debido a su gran tamaño. Además, el POM

no es reducido por citrato o tampones convencionales y no se ve afectado por la radiación UV-Vis.

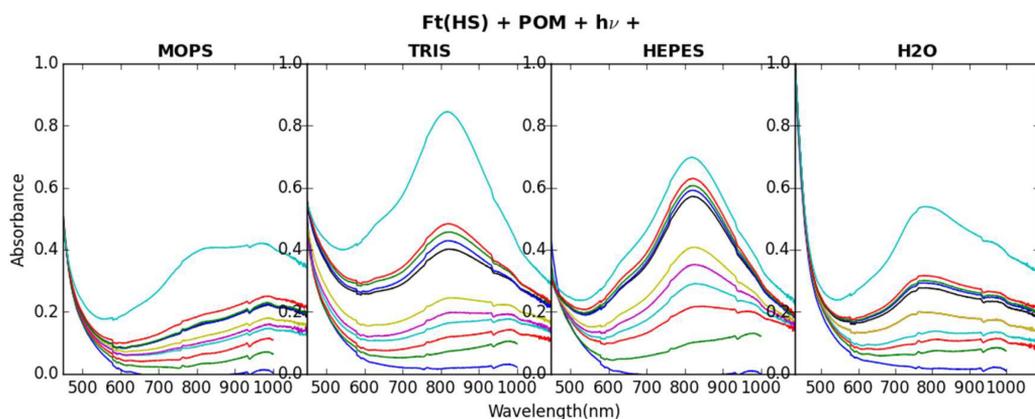
Como se muestra en la figura 1 a, cuando se irradia una mezcla de POM y ferritina de bazo de caballo en presencia de citrato con una lámpara UV-Vis (véase la sección experimental), se desarrolla gradualmente una banda ancha centrada a 800 nm, confirmando la reducción del POM. Sin irradiación, no se produce reducción del POM. Del mismo modo, si irradiamos ferritina en ausencia de citrato, el POM no se reduce (Fig. 1 b). El anión citrato suministra electrones al núcleo de la ferritina para neutralizar los huecos positivos que se generan tras la irradiación, aunque no se sabe con certeza si el citrato alcanza el núcleo ferritínico.



**Fig. 1:** Espectros de UV-Vis a lo largo del tiempo después de irradiar la mezcla de ferritina de bazo de caballo (HSFt) y POM: con (a) y sin citrato (b); con fz, con (c) y sin citrato (d).

## PROPIEDADES (AUTO)FOTOCATALÍTICAS DE LA FERRITINA

Resultados similares se obtuvieron con POM y ferritina en presencia de diferentes tampones, Tris, MOPS y HEPES, con pequeñas variaciones de acuerdo con su influencia sobre la fotoactividad de la ferritina según lo descrito por Watt et al. (Fig. 2) <sup>19</sup>.

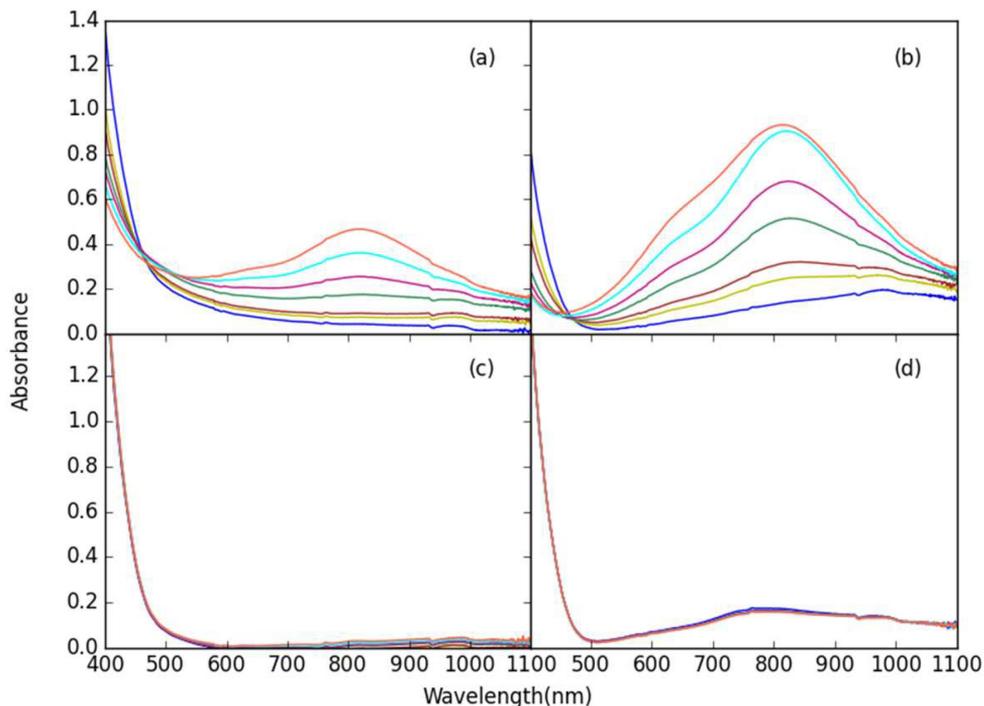


**Fig. 2.** Espectros UV-Vis después de irradiar la disolución de ferritina de bazo de caballo (HSFt), citrato y POM en diferentes medios: MOPS, Tris, HEPES y H<sub>2</sub>O.

Curiosamente, cuando se añade fz a la mezcla de POM, ferritina y citrato y luego se irradia, la banda UV-Vis típica del POM reducido apenas se forma, por contra aparece una banda centrada a 562 nm (Figura 1c). La presencia de la banda de 562 nm es indicativa de la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ . Este resultado indica que después de la irradiación de ferritina se forma Fe (II) y que además este Fe (II) es captado por fz.

De este simple experimento se deduce que la reducción del POM cuando la ferritina es irradiada se lleva a cabo por Fe (II) y no por electrones que provienen del núcleo de ferritina. De hecho, en

un siguiente experimento, Fe (II) mezclado con POM y citrato resultó en la misma banda UV-Vis típica de POM reducido (Fig. 3).



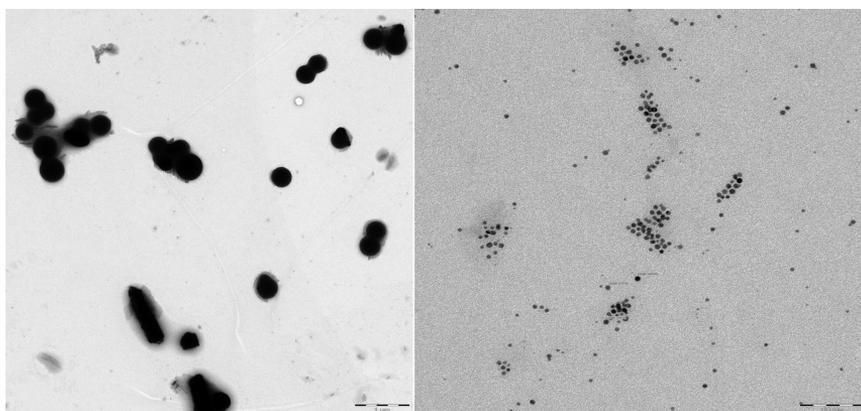
**Fig. 3:** Espectros UV-Vis después de irradiar (a) HSfT con POM con citrato, (b) Fe (II) 0.03 $\mu$ M con POM con citrato, (c) HSfT con POM sin citrato y (d) Fe (II) 0.03 $\mu$ M con POM sin citrato.

A la luz de estos hallazgos, revisamos los experimentos previamente reportados, en los que la reducción de algunas especies químicas por ferritina irradiada se atribuyó a los electrones de la banda de conducción del núcleo de ferritina<sup>13-17,19</sup>. En particular, analizamos la reducción de Au (III) y Cu (II) para formar las respectivas nanopartículas del metal cero-valente.

Hemos encontrado que la reducción de estos cationes y la formación de nanopartículas de oro y cobre ocurre de manera

similar en soluciones con Fe (II) que en soluciones con ferritina irradiada. En ambos casos, la presencia de citrato fue necesaria para la reducción. El citrato estabiliza Fe (III), haciendo que el potencial *redox* Fe (III)/Fe (II) disminuya, aumentando por tanto la posibilidad de que el Fe (II) reduzca a POM, Au (III) y Cu (II).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de oro y cobre producidas mediante la adición de Fe (II) mostraron núcleos de densidad electrónica de forma esférica (Fig. 4). La espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) y la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX) confirmaron que las partículas contenían Cu y Au, de acuerdo con el metal que se adicionó.

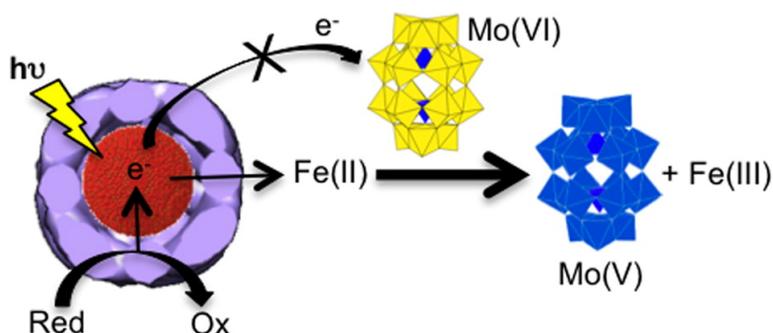


**Fig. 4:** Imágenes TEM típicas de nanopartículas de Cu (izquierda) y Au (derecha). Las escalas son de 1  $\mu\text{m}$  y 50 nm, respectivamente..

El análisis colectivo de estos hallazgos demuestra que la reducción de especies químicas fuera de la ferritina no ocurre a través de la liberación de electrones del núcleo, como había sido establecido sino que se debe a la presencia de Fe (II) liberado de la

ferritina. Este Fe (II) movilizado es un producto de la autofotocatálisis de la ferritina en la que se reduce el núcleo de ferrihidrita (Esquema 1).

### Esquema 1. Mecanismo de reducción química foto-inducida por ferritina.<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Tras la irradiación, los electrones se excitan desde la banda de valencia a la banda de conducción del semiconductor ferrihidrita. Los huecos positivos que se generan en la banda de valencia se neutralizan por los electrones del anión reductor citrato. Por otra parte, los electrones excitados de la banda de conducción reducen el Fe (III) del núcleo de hierro y los consiguientes iones de Fe (II) formados se liberan de la ferritina y llevan a cabo la reacción de reducción de POM.

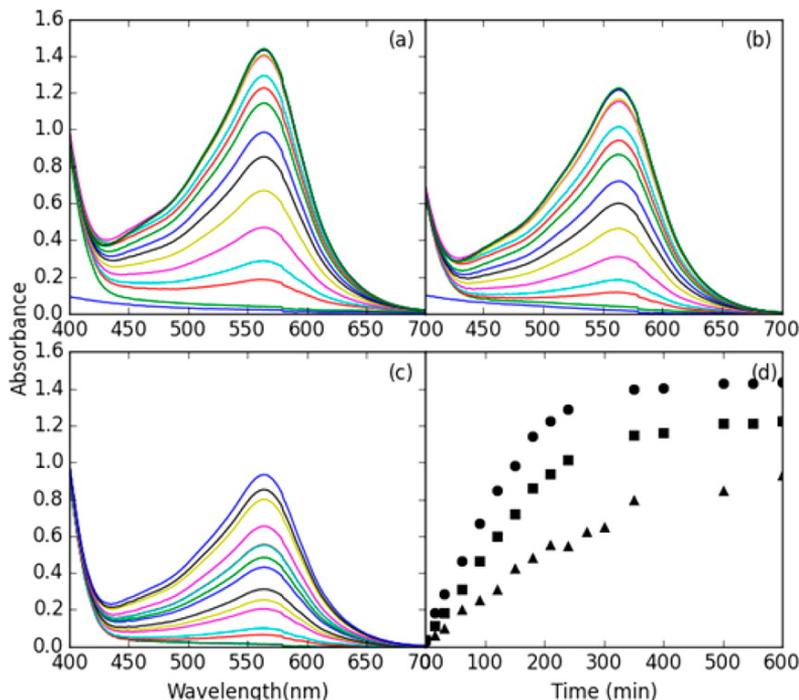
En este esquema,, el citrato tiene un doble papel en el comportamiento *redox* de la ferritina irradiada: dador de electrones al semiconductor central de hierro para la neutralización de los huecos positivos y amplificador de las reacciones reductoras de Fe (II).

Además, diseñamos experimentos para abordar el camino que sigue el Fe (II) después de irradiar la ferritina. Había sido aceptado

que el Fe (II) se reoxidaba en los centros ferroxidasa reincorporándose de nuevo al núcleo. Si los centros ferroxidasa evitan que el Fe (II) se libere de la ferritina, entonces este proceso de liberación de Fe (II) de la ferritina por irradiación debería depender del tipo de ferritina y la presencia de centros ferroxidasa<sup>15,17</sup>. Hemos abordado este problema mediante el estudio de la liberación de Fe (II) por irradiación de tres ferritinas con cargas de hierro equivalentes pero diferentes relaciones H/L: la ferritina H humana recombinante (HuFtH), un homopolímero de 24 subunidades H idénticas, cada una con un centro ferroxidasa; la ferritina de bazo de caballo (HSFt), un heteropolímero formado por aproximadamente tres subunidades H y 21 L; y la L-ferritina humana recombinante (HuFtL), un homopolímero de 24 subunidades L idénticas (las subunidades L carecen del centro ferroxidasa).

Después de la irradiación, la liberación de Fe (II) de HuFtH, HSFt y HuFtL se evaluó midiendo la disponibilidad de Fe (II) para complejación con fz. La cantidad de hierro liberado corresponde al aumento en la absorbancia de UV-Vis a 562 nm, por formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ . Los patrones de aumento de la disponibilidad de Fe (II) proporcionan una imagen dinámica de la liberación total de hierro de la ferritina inducida por la luz. Como se muestra en la figura 5, los patrones de eliminación de hierro son similares para las tres ferritinas, a pesar de que HuFtH contiene 24 centros ferroxidasas y HuFtL ninguno. Estos resultados respaldan la idea de que el Fe (II) formado por la autofotocatálisis de la ferritina no se reoxida en un centro ferroxidasa, sino que deja la

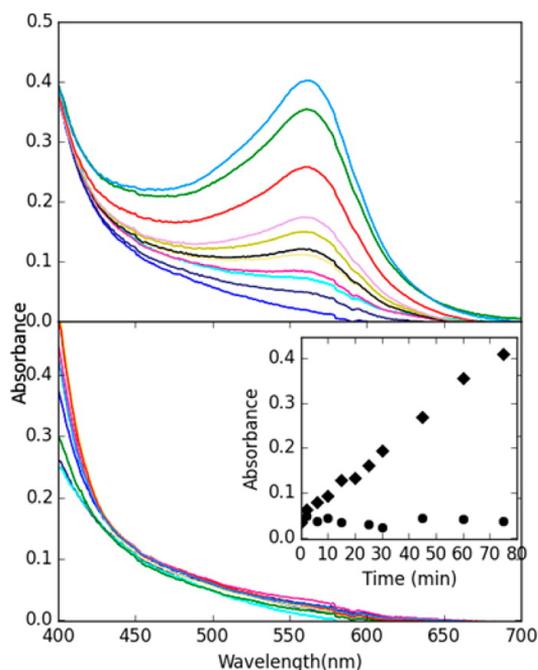
proteína y está disponible para la captura de fz o para llevar a cabo reducciones químicas.



**Fig. 5:** Espectros UV-Vis a lo largo del tiempo después de irradiar (a) HuFtH, (b) HuFtL y (c) HSft en presencia de fz. (d) Absorbancia a 562 nm a lo largo del tiempo: HuFtH (●), HuFtL (■), HSft (Δ).

Finalmente, con objeto de completar el escenario de auto-fotooxidación, abordamos la liberación de Fe (II) de la ferritina en ausencia de aceptores de electrones. A diferencia de los experimentos previos, agregamos la fz después de diferentes lapsos de tiempo de irradiación. Para ningún tiempo de adición de fz observamos la banda correspondiente al compuesto  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$  (Fig. 6). Este experimento pone de manifiesto que en ausencia de fz, el Fe (II) que es efectivamente liberado de la ferritina, como se

ha demostrado en los experimentos anteriores, permanece libre y está disponible para volver a reincorporarse al núcleo de la ferritina, como en un proceso normal de remineralización.



**Fig. 6:** Espectros UV-Vis a lo largo del tiempo de HSFT con fz añadido antes (arriba) y después (abajo) irradiando. La inserción es la absorbancia a 562 nm para fz agregada desde el inicio (◆) y después de diferentes tiempos (●) de irradiación.

### 2.3. Conclusiones.

Nuestros resultados son inconsistentes con un modelo en el que los electrones de la banda de conducción cruzan la capa de apoferritina y reducen los cationes metálicos en la superficie exterior del núcleo de ferrihidrita. En su lugar, los electrones excitados reducen automáticamente el núcleo de mineral de la

ferritina para producir iones Fe (II). Además, hemos demostrado que estos iones Fe (II) no son reoxidados en los centros ferroxidasa. Por el contrario, el Fe (II) sale de la cápsida para reducir los receptores de electrones externos, como Cu (II) o Au (III). En ausencia de aceptores de electrones, el Fe (II) está disponible para el reingreso a la ferritina.

### **2.4. Materiales y métodos.**

*Liberación de Fe (II) de la ferritina inducida por la luz con formación de POM\* y ferrozina-Fe (II).*

La ferritina de bazo de caballo, HSft (aproximadamente 2000 Fe/Ft), se obtuvo de Sigma-Aldrich y se dializó exhaustivamente frente a agua Milli-Q usando una membrana de diálisis Spectra/Por Float-A-Lyzer con un límite de peso molecular de 300000 Da. Se añadió ferritina (25  $\mu$ M, 12.5 mg/mL) a soluciones de POM 1 mM con o sin citrato 30 mM. El POM se obtuvo según los métodos previamente reportados <sup>24</sup>. Se tomaron espectros de UV-Vis antes y después de irradiar con una lámpara LED de amplio espectro (400-800 nm). Las muestras control se mantuvieron en la oscuridad. Los espectros se tomaron a intervalos de 15, 30, 60 y 100 minutos a medida que progresaba el experimento. Se siguió el mismo procedimiento con la adición de un exceso de fz. Para comparar tampones, las soluciones que contenían 1 mM de POM, 0.25  $\mu$ M de HSft y 30 mM de MOPS, HEPES o Tris a pH 7.4 se iluminaron con la lámpara LED de amplio espectro y se midieron con espectroscopia UV-Vis en una hora. Después de 24 h a la luz, se

añadió citrato a una porción de la solución, que luego se midió con espectroscopia UV-Vis.

### *Síntesis nanopartículas de cobre y oro.*

Las nanopartículas de cobre y oro se formaron mezclando soluciones de 0.1 M de  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$  o  $\text{AuCl}_3$  en HEPES 125 mM y citrato 400 mM. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio electrónico de análisis Phillips CM-20 HR que funcionaba a 200 keV.

### *Preparación de Ferritina Recombinante.*

HuFtH y HuFtL humanas recombinantes se prepararon tal como se describió previamente <sup>25</sup>. Todas las ferritinas usadas son electroforéticamente puras. Las concentraciones de proteína se determinaron con el reactivo BCA (Pierce) usando albúmina sérica bovina como estándar. HuFtH, HuFtL y HSft se reconstituyeron en tampón 0.1 M de imidazol/NaCl 0.05 M a pH 7.4. Fe (II) se añadió lentamente a intervalos de 20 minutos para una carga total de hierro de 200 Fe/ferritina. Las proteínas se transfirieron mediante diálisis a tampón Tris 20 mM (pH 7.4, NaCl 5 mM).

### *Liberación de Ferritina Fe (II) inducida por la luz de HuFt.*

Se añadió ferritina (HuFtH, HuFTL o HSft) en cantidades de 25  $\mu\text{M}$  a soluciones con citrato 30 mM y Tris 20 mM. Los espectros se tomaron antes y después de la adición del exceso de fz. Se irradiaron las cubetas y se tomaron espectros cada 15, 30 y luego intervalos de 60 minutos a medida que progresaba el experimento.

### *Control de ferrozina.*

Se añadió HSft en una cantidad de 25  $\mu\text{M}$  a una solución de tampón Tris 20 mM (pH 7.4, NaCl 5 mM). La solución se distribuyó entre varias cubetas UV-Vis. Fz se agregó en exceso a una muestra. Todas las cubetas fueron irradiadas. La muestra con fz se midió con espectrometría UV-Vis al mismo tiempo que se añadió fz a otra muestra y se midió. Los espectros se tomaron primero cada 4 minutos y luego cada 15 minutos.

### **2.5. Referencias.**

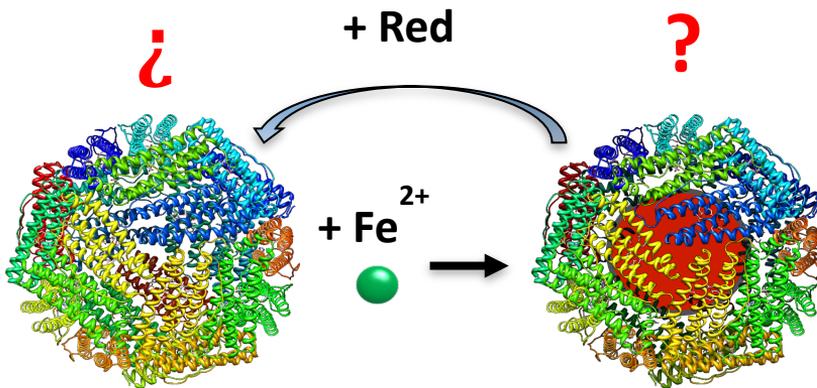
1. Arosio, P., Carmona, F., Gozzelino, R., Maccarinelli, F. & Poli, M. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochem. J.* **472**, 1–15 (2015).
2. Lane, D. J. R. *et al.* Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 1130–1144 (2015).
3. Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P. L. & Hagen, W. R. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chem. Rev.* **115**, 295–326 (2015).
4. Finazzi, D. & Arosio, P. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch. Toxicol.* **88**, 1787–1802 (2014).
5. Alkhateeb, A. A. & Connor, J. R. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1836**, 245–254 (2013).
6. Bou-Abdallah, F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**, 719–731 (2010).
7. Carmona, F. *et al.* Ferritin iron uptake and release in the presence of metals and metalloproteins : Chemical implications in the brain. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2752–2764 (2013).

8. Bradley, J. M., Moore, G. R. & Le Brun, N. E. Mechanisms of iron mineralization in ferritins: One size does not fit all. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 775–785 (2014).
9. Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *J. Struct. Biol.* **126**, 182–194 (1999).
10. Gálvez, N. *et al.* Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin. 8062–8068 (2008).
11. Clemente-León, M. *et al.* Magnetic Langmuir-Blodgett films of ferritin with different iron contents. *Langmuir* **22**, 6993–7000 (2006).
12. Nikandrov, V. V., C.K. Gratzel, Moser, J. & Gratzel, M. Light induced redox reactions involving mammalian ferritin as photocatalyst. **41**, 83–89 (1997).
13. Ensign, D., Young, M. & Douglas, T. Photocatalytic Synthesis of Copper Colloids from Cu ( II ) by the Ferrihydrite Core of Ferritin. **43**, 3441–3446 (2004).
14. Kim, I., Hosein, H., Strongin, D. R. & Douglas, T. Photochemical Reactivity of Ferritin for Cr ( VI ) Reduction. 4874–4879 (2002). doi:10.1021/cm0207301
15. Keyes, J. D., Hilton, R. J., Farrer, J. & Watt, R. K. Ferritin as a photocatalyst and scaffold for gold nanoparticle synthesis. *J. Nanopart. Res.* **13**, 2563–2575 (2011).
16. Online, V. A., Petrucci, O. D., Buck, D. C. & Watt, R. K. RSC Advances A ferritin mediated photochemical method to synthesize biocompatible catalytically active gold nanoparticles : size control synthesis for small. 3472–3481 (2014). doi:10.1039/c3ra46520a
17. Watt, R. K., Petrucci, O. D. & Smith, T. Catalysis Science & Technology for energy conversion. 3103–3110 (2013). doi:10.1039/c3cy00536d
18. Colton, J. S., Erickson, S. D., Smith, T. J. & Watt, R. K. Sensitive detection of surface- and size-dependent direct and indirect band gap transitions in ferritin. *Nanotechnology* **25**, (2014).
19. Hilton, R. J., Keyes, J. D. & Watt, R. K. Maximizing the efficiency of ferritin as a photocatalyst for applications in an artificial photosynthesis system.

- Nanosensors, Biosensors, Info-Tech Sensors Syst. Proceeding*, (2010).
20. Wolszczak, M. & Gajda, J. Iron release from ferritin induced by light and ionizing radiation. *Res. Chem. Intermed.* **36**, 549–563 (2010).
  21. Papaconstantinou, E. Photochemistry of polyoxometallates of molybdenum and tungsten and/or vanadium. *Chem. Soc. Rev.* **18**, 1 (1989).
  22. Rui, T. *et al.* Composite Superlattice Thin Films With Photochromic Properties. **78**, 116–121 (2002).
  23. González, A., Gálvez, N., Clemente-León, M. & Dominguez-Vera, J. M. Electrochromic polyoxometalate material as a sensor of bacterial activity. *Chem. Commun.* **51**, 10119–10122 (2015).
  24. Strandberg, R. *et al.* Multicomponent Polyanions. 12. The Crystal Structure of Na<sub>6</sub>Mo<sub>18</sub>P<sub>20</sub>O<sub>62</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>, a Compound Containing Sodiumcoordinated 18-Molybdodiphoshate Anions. *Acta Chemica Scandinavica* **29a**, 350–358 (1975).
  25. Santambrogio, P. *et al.* Functional and immunological analysis of recombinant mouse H- and L-ferritins from Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* **19**, 212–218 (2000).







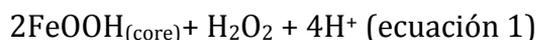
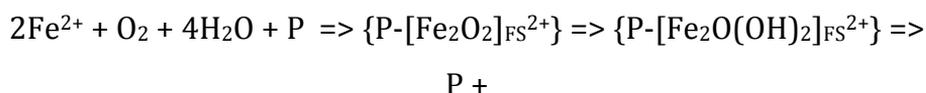
## CAPÍTULO 3: INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA.



### 3.1. Introducción.

La especificidad de la ferritina está relacionada con el transporte selectivo de hierro a través de sus canales moleculares, el poseer un lugar específico de oxidación de Fe (II) y la nucleación de Fe (III). Las razones estructurales de dicha especificidad son al día de hoy entendidas parcialmente. Por ejemplo, surgen controversias a la hora de explicar los diferentes mecanismos por los que la ferritina es capaz de incorporar Fe, ya que tanto la cápside proteica (FC), cómo el núcleo de Fe presentan sitios para la oxidación de Fe (II), siendo diferentes las reacciones de oxidación (ecuaciones 1 y 2).

Cuando la adición de Fe (II) a HuHFt es  $<50$  Fe (II)/proteína, el hierro es oxidado por completo en el centro ferroxidasa <sup>1,2</sup>. La reacción de ferroxidación/mineralización ocurre con una estequiometría Fe (II)/O<sub>2</sub> de 2:1, lo que resulta en la producción de peróxido de hidrógeno según la ecuación 1 <sup>1-3</sup>.



Este modelo es válido siempre que el hierro se adicione en pequeños incrementos ( $<50$  Fe (II)/proteína) y se permita suficiente tiempo entre las adiciones, en cuyo caso, la proteína exhibe un comportamiento enzimático <sup>2-4</sup>.

Sin embargo, cuando se emplea una relación Fe/proteína mayor (200 Fe (II)/proteína), el mecanismo cambia; la estequiometría Fe (II)/O<sub>2</sub> se aproxima a 4:1, y el oxígeno molecular se reduce finalmente a agua según la reacción dada por la ecuación 2<sup>2,3</sup>. Esto ocurre también para HuLFt, que al consistir únicamente en unidades L, no posee centros ferroxidasa<sup>5</sup>.



Dado que la ecuación 2 es idéntica a la de auto-oxidación e hidrólisis de Fe (II), se supone<sup>2,3</sup>, que la mineralización del núcleo a altos flujos de Fe (II) en HuHFt y la mineralización en HuLFt, probablemente se produce a través de la deposición de hierro directamente sobre la superficie del mineral de acuerdo con un modelo de crecimiento cristalino<sup>6</sup>. Recientemente Sadeghi et al.<sup>7</sup> han demostrado que la química acuosa de los iones Fe (III) en ausencia de ferritina genera un polímero Fe<sub>13</sub> que se parece a la ferrihidrita. Esta observación es consistente con la opinión de que las ferritinas proporcionan un recipiente de reacción cerrado en el que puede depositarse un núcleo rico en hierro en lugar de una superficie que cataliza la formación de un tipo particular de polímero de hierro.

Estas diferencias (oxidación y nucleación) entre cadenas H y L de la ferritina van ligadas a sus secuencias de aa, entre las cuales existe aproximadamente un 50% de semejanza. Mientras que las cadenas H poseen el centro ferroxidasa (FC), formado por Glu27, Glu62, His65 y Glu107, que oxidan catalíticamente el Fe (II) a Fe (III), las cadenas L poseen mayor número de residuos con ácidos

carboxílicos expuestos en la cavidad interna de la ferritina <sup>8</sup>, lo que favorece la nucleación del óxido de Fe.

La incorporación de hierro en ferritinas se ha estudiado extensamente *in vitro*. Como ha sido comentado en la Introducción, la mayoría de los datos indican que el hierro entra y sale de la cavidad de las ferritinas animales a través de los ocho canales hidrofílicos de simetría C<sub>3</sub> <sup>9-11</sup>. Experimentos de “binding” usando Cd (II), Zn (II) y Tb (III) han demostrado que estos iones metálicos compiten con Fe (II) y Fe (III), lo que sugiere la existencia de sitios de fijación en la ferritina que serían comunes para todos estos iones metálicos. En particular se ha demostrado que el Zn (II) es capaz de unirse a los centros ferroxidasa de los canales C<sub>3</sub>. Experimentos cinéticos de empleando Zn (II) y Tb (III) como inhibidores de la oxidación de Fe (II) indican que el mecanismo de inhibición ocurre bloqueando el paso de Fe (II) al centro ferroxidasa <sup>12</sup>.

En este trabajo nos proponemos, mediante el tratamiento de las ferritinas HSft (heteropolimérica), HuLFt y HuHFt (recombinantes homopoliméricas) con Zn (II), evaluar: i) si cambia la actividad ferroxidasa debido al bloqueo del centro ferroxidasa (FC), ii) si el núcleo de la ferritina es realmente capaz de oxidar Fe (II), trabajando con ferritinas con diferente número de hierros en sus núcleos y cuyos centros ferroxidasa están bloqueados, y iii) si el bloqueo de los canales C<sub>3</sub>, genera diferencias en la salida de Fe de la ferritina.

En cuanto al mineral formado en el interior de la ferritina, es ampliamente aceptado que el contenido de fosfato en el núcleo de

la ferritina cambia la cristalinidad del mineral de la ferritina <sup>13-15</sup>. En ferritinas de mamíferos las cantidades de fosfato encontradas son pequeñas (de media contienen un fosfato por cada 10 átomos de Fe <sup>13</sup>), estando principalmente adsorbidas en la superficie del mineral de óxido de hierro, mientras que en bacterioferritinas y ferritinas de plantas la cantidad de fosfato encontrada es mucho más alta (conteniendo ratios de fosfato:Fe de 1 <sup>16</sup>), dando lugar a ferrihidrita amorfa <sup>17,18</sup>.

Investigaciones iniciales del papel fisiológico que puede tener el fosfato en la función de la ferritina sugirieren que el fosfato podría estar involucrado en la formación del núcleo de la ferritina, acelerando la tasa de oxidación de Fe (II) <sup>19</sup>.

A la vista de estos datos, decidimos llevar a cabo un estudio comparativo de la actividad ferroxidasa y de la liberación de hierro mediante foto-reducción en ferritinas cuyos núcleos de Fe habían sido formados en presencia o ausencia de fosfato en el medio de reacción.

### **3.2. Resultados y discusión.**

#### *1. Incorporación de Fe en la ferritina.*

Para evaluar la entrada de Fe en la ferritina nos centraremos en medir la actividad ferroxidasa (oxidación catalítica de Fe (II) a Fe (III)) de diferentes ferritinas HSft, HuHFt y HuLFt, con diversos ratios H/L mediante un sencillo protocolo basado en la monitorización del Fe (II) libre con fz. Para ello, añadimos fz a diferentes tiempos de reacción y determinamos el Fe (II) que no

había sido oxidado en ese tiempo a través de la banda de absorción del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$  a 562nm en UV/Vis. En esto experimento, cuanto más rápida es la oxidación de Fe (II) por parte de la ferritina, menor sería la banda de absorción a 562 nm obtenida en el espectro UV/Vis.

### *1.1. Influencia de Zn en la actividad ferroxidasa de ferritinas:*

#### i) Según subunidades.

Las apo-ferritinas animales HSFt, HuHFt y HuLFt, con un diferente contenido en subunidades H/L, se trataron con Zn (II) con el objetivo de bloquear los centros ferroxidasa y/o la entrada a los canales  $\text{C}_3$ <sup>12</sup>, y poder así evaluar la actividad ferroxidasa de estas ferritinas.

Como puede verse en la figura 1, la actividad ferroxidasa de HuHFt (100% H) tratada con Zn (II) disminuyó un 33% con respecto a la nativa, lo que indica cierto bloqueo del centro ferroxidasa por parte de Zn (II). Un dato similar se obtuvo para HSFt (90% L-10% H). Por el contrario, para HuLFt (100% L, sin centros ferroxidasa) la presencia de Zn(II) no tuvo ningún efecto.

Estos datos son coherentes con lo establecido, en el sentido que el Zn (II) es efectivamente capaz de unirse al centro ferroxidasa, compitiendo con el Fe (II) entrante e impidiendo su oxidación. Además, estos datos ponen de manifiesto que el Zn (II) solo bloquea el centro ferroxidasa de los canales  $\text{C}_3$ , pero no propiamente los canales, puesto que la presencia de Zn (II) no tiene influencia ninguna en la oxidación de Fe (II) a Fe (III) en HuLFt.

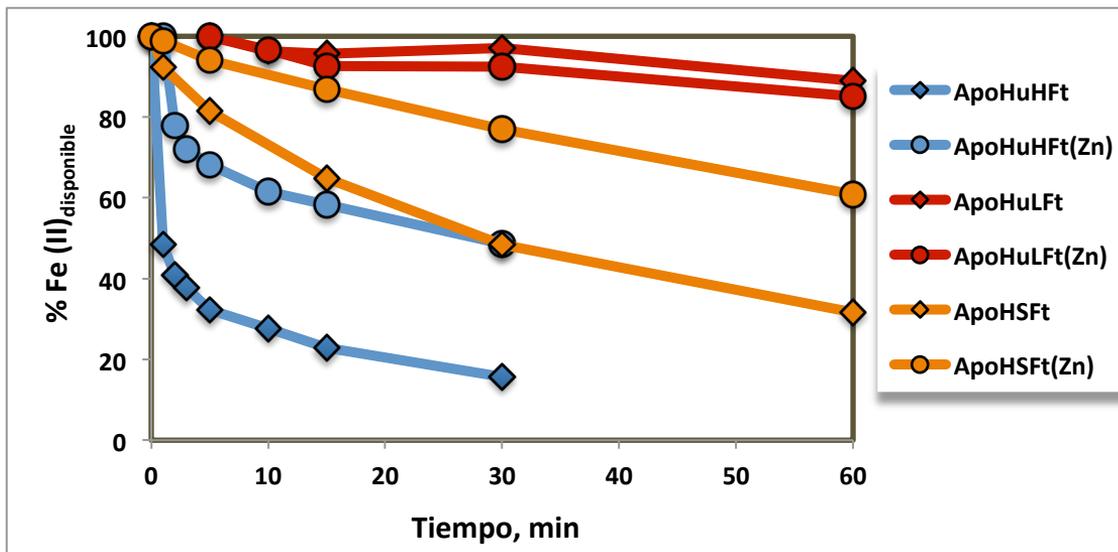


Fig. 1: Actividad ferroxidasa ferritinas con diferente contenido H/L.

ii) Según contenido de hierro del núcleo

Una vez comprobada la disminución de la actividad ferroxidasa producida por Zn (II) en las diferentes ferritinas, elegimos HSFt para realizar un estudio de la influencia que tendría el núcleo mineral de ferrihidrita en la oxidación de Fe (II). Para ello reconstituimos la apoferritina con un contenido creciente de átomos de hierros: apoHSFt (0 Fe), 200FeHSFt (200 Fe), 600FeHSFt y 1600FeHSFt. Una vez eliminado mediante diálisis el Fe unido lábilmemente a la proteína, se procedió al bloqueo de los centros ferroxidasa con Zn (II) y a la medición de la actividad ferroxidasa para ratios Fe:Ft (25, 100 y 200).

Como puede verse en la figura 2, el bloqueo de la actividad ferroxidasa de las HSFts con distinto contenido en Fe es evidente. Sin embargo, no parece haber contribución a la oxidación de Fe (II)

## **INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA**

---

a Fe (III) por parte de los núcleos formados dentro de la ferritina puesto que las curvas de cantidad de Fe (II) disponibles son muy similares, independientemente del contenido de Fe del núcleo.

Estos resultados no nos permiten decir a ciencia cierta si el núcleo interno oxida Fe (II) o no, pero si nos permiten llegar a la conclusión de que, si son capaces de oxidar, su influencia en la oxidación de Fe (II) a Fe (III) es insignificante en comparación con la oxidación catalítica producida por el centro ferroxidasa.

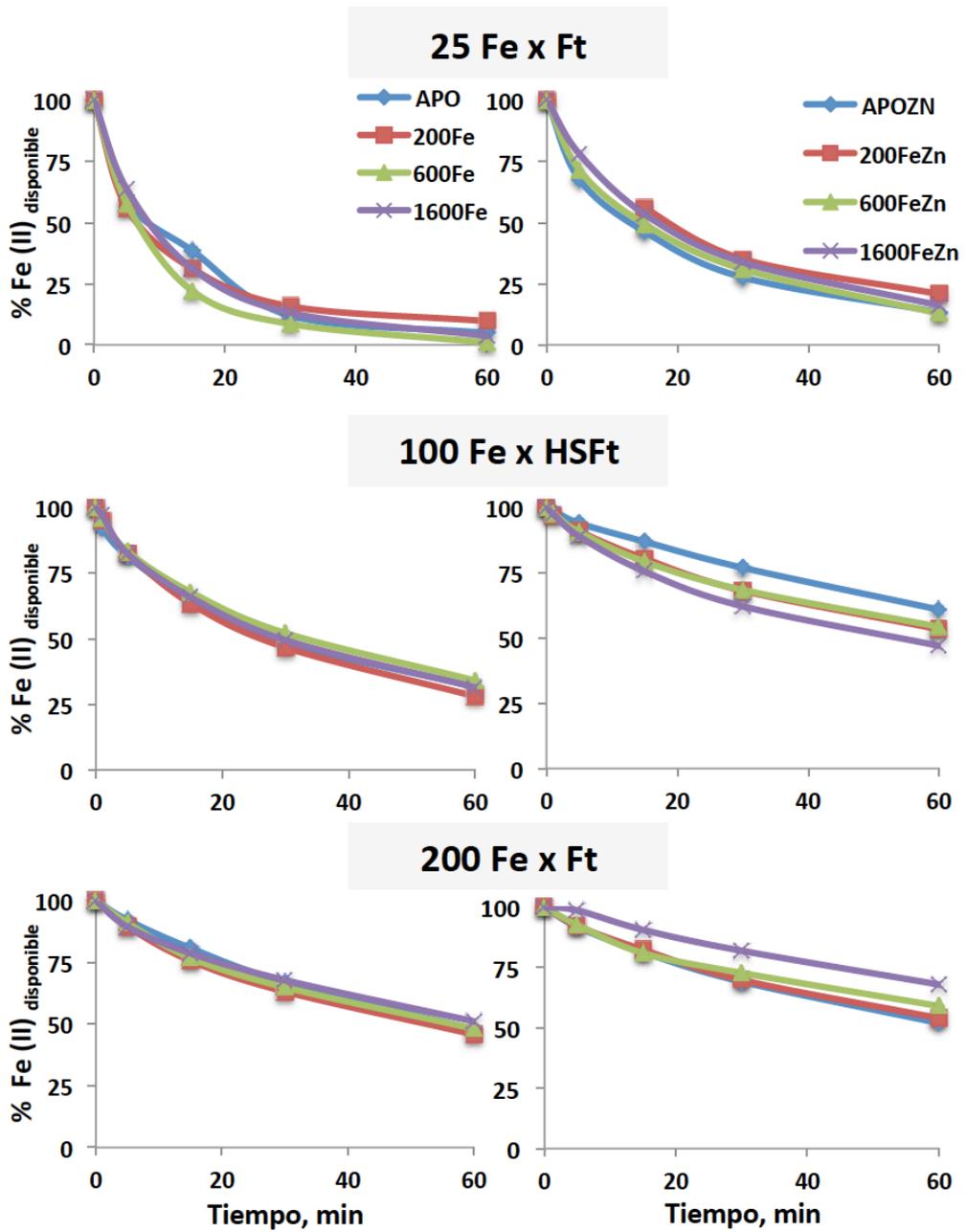


Fig. 2: Actividad ferroxidasa de ferritinas con diferente número de Fe en el núcleo.

## INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA

### 1.2. Influencia de la presencia de fosfato en el core.

Otro de los factores descritos en bibliografía que podría afectar a la entrada de Fe en la ferritina es la presencia de fosfato <sup>19</sup>, la cual está descrita como factor que facilitaría la oxidación de Fe (II) a Fe (III) <sup>19</sup>. Por ello, a partir de apoHSFt reconstituimos con diferente contenido en Fe y en presencia o ausencia de fosfato para evaluar si esta presencia de fosfato facilita o no la oxidación de Fe (II) a Fe (III).

	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
<b>50Fe</b>	100	91,0	70,4	61,6	40,9
<b>50 Fe PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	100	83,1	68,6	64,3	47,9
<b>200 Fe</b>	100	84,6	70,8	57,4	31,4
<b>200 Fe PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	100	91,8	78,4	59,6	35,7
<b>600 Fe</b>	100	95,2	79,0	55,3	33,0
<b>600 Fe PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	100	93,6	78,8	61,4	39,5
<b>1600 Fe</b>	100	90,0	72,3	56,1	43,1
<b>1600 Fe PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	100	91,9	77,4	62,3	46,2

**Tabla 1:** Actividad ferroxidasa en ferritinas con PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Valores relativos de Fe (II) disponible con respecto al tiempo).

Como puede verse en la tabla 1, las ferritinas formadas en presencia de fosfato presentan una actividad ferroxidasa igual (valores similares de oxidación de Fe (II)) que las que han sido formadas en ausencia de éste. Por lo tanto la presencia de fosfato en el núcleo de la ferritina, no facilitaría la oxidación de Fe (II), o por lo menos no de manera acusada.

### *2. Liberación de hierro de la ferritina.*

La salida de Fe del interior de la proteína es otro de los aspectos de controversia en el mundo de la ferritina <sup>20,21</sup>. El mecanismo más aceptado es el de reducción-quelación <sup>22</sup>: una biomolécula reductora reduciría el Fe (III) del mineral de ferrihidrita y facilitaría la movilización de Fe (II), que sería quelatado por una chaperona una vez fuera de la cápside proteica. Sin embargo no existe unanimidad.

Otra de las controversias en cuanto a la liberación del Fe de la ferritina es el camino que sigue éste: si sale por donde entra (canales C<sub>3</sub> y centro ferroxidasa <sup>23</sup>) o por una vía diferente.

Nosotros, aprovechando las propiedades fotorreductoras del núcleo de ferrihidrita, estudiamos la salida de Fe de la ferritina en presencia de luz y moléculas dadoras de electrones como el citrato. Para ello evaluamos la liberación de Fe de diferentes ferritinas: bloqueadas con Zn (II) o no, y reconstituidas en presencia de fosfato o no.

#### *2.1. Fotorreducción en presencia de Zn en el centro ferroxidasa.*

## INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA

El objetivo es ver si hay diferencias acusadas en la liberación de Fe de la ferritina una vez tratada con Zn (II), lo que nos indicaría que la salida de Fe de la ferritina tiene lugar por el mismo sitio por el que entra, centro ferroxidasa y canales C<sub>3</sub>. Como en anteriores experimentos, la liberación de hierro de la ferritina se cuantificará en base a la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$  mediante el aumento de la absorción a 562 nm. Como puede verse en la figura 4, el patrón de liberación de Fe es similar en las ferritinas tratadas o no con Zn (II). Podemos por tanto concluir que la presencia de Zn (II) en los centros ferroxidasa no altera la velocidad de liberación de Fe.

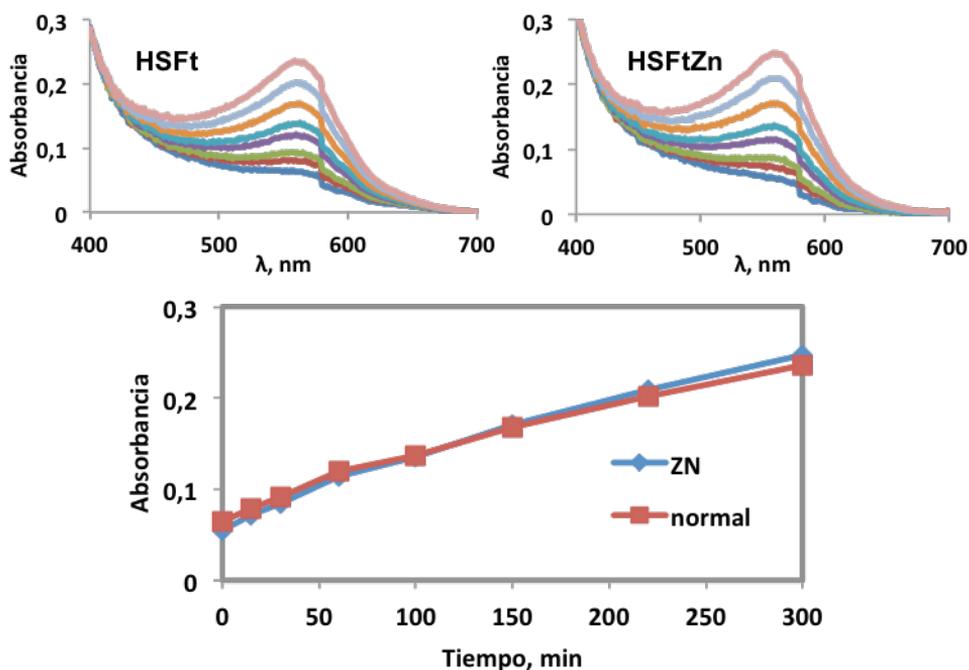
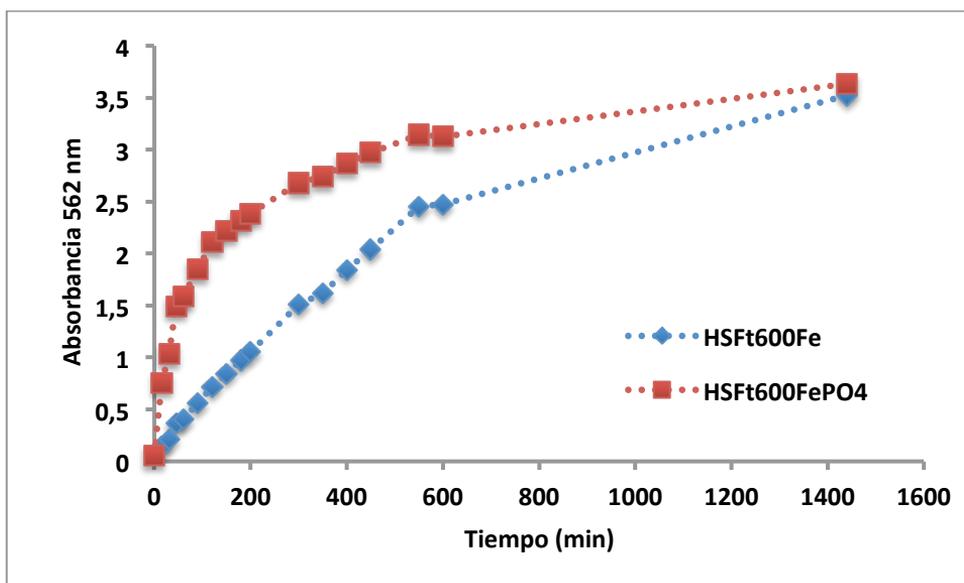


Fig. 4: Fotorreducción núcleo ferrihidrita de HSFT bloqueada o no con Zn (II).

#### 2.2. Fotorreducción en presencia de fosfato en el núcleo.

Partiendo de ApoHSFt, reconstituimos dos ferritinas con el mismo número de hierros (1600), una en presencia de fosfato y otra en ausencia. Posteriormente estudiamos la liberación de Fe de la ferritina mediante la quelación con fz del Fe (II) generado en la foto-reducción del núcleo de ferrihidrita a distintos tiempos.

Como puede verse en la figura 5, la foto-reducción de la muestra reconstituida en presencia de fosfato es más rápida, se alcanzan valores altos de Fe (II) fuera de la ferritina a tiempos más cortos que para las ferritinas reconstituidas en ausencia de fosfato, lo que está de acuerdo con que el mineral formado en el interior de la ferritina en presencia de fosfato es más amorfo y por tanto químicamente más lábil.



**Fig. 5:** Fotorreducción núcleo ferrihidrita de HSft reconstituida en presencia/ausencia  $\text{PO}_4^{3-}$ .

### 3.3. Conclusiones.

En cuanto a la incorporación de Fe en la ferritina, concluimos que el Zn (II) es capaz de bloquear parcialmente la actividad ferroxidasa de los centros catalíticos presentes en las subunidades H de la ferritina, y que el núcleo de Fe de la ferritina tiene una influencia pequeña en la oxidación de Fe (II) a Fe (III) en comparación con el centro ferroxidasa. Además, no observamos diferencias en la actividad ferroxidasa de ferritinas reconstituidas en presencia de fosfato, descrito como factor que favorece la oxidación, lo que descarta un papel significativo del núcleo de ferritina en la oxidación de Fe (II). En definitiva, la conclusión obtenida de estos datos puede expresarse en los siguientes términos: todos los átomos de Fe del núcleo de la ferritina se fijaron como Fe (II) al centro ferroxidasa y allí fueron oxidados a Fe (III). La formación del núcleo en ferritinas sin subunidades H (sin centro ferroxidasa por tanto) sigue siendo una cuestión por resolver.

En cuanto a la liberación de Fe de la ferritina, podemos concluir que el Fe sigue un camino distinto al de la entrada (canales  $\text{C}_3$ -centros ferroxidasa), ya que teniendo los centros ferroxidasa bloqueados con Zn (II) no existen diferencias en la cinética de liberación de éste. Más concretamente, de nuestros datos se deriva que los centros ferroxidasa no fijan el Fe que va siendo

liberado, aunque no se descarta que sea vía los mismos canales de entrada, es decir los canales de simetría  $C_3$ .

Finalmente, nuestros datos confirman que los núcleos de ferritina formados en presencia de fosfato son más lábiles químicamente y por lo tanto el Fe se libera de la proteína con mayor facilidad. Por tanto, la célula dispone de la posibilidad de controlar la cantidad de fosfato en el mineral de ferritina como una opción para facilitar la recuperación de hierro de la ferritina cuando sea requerido.

### **3.4. Materiales y métodos.**

#### *Síntesis ferritinas.*

HuFtH y HuFtL humanas recombinantes se prepararon tal como se describió previamente <sup>26</sup>. Todas las ferritinas usadas son electroforéticamente puras. Las concentraciones de proteína se determinaron con el reactivo BCA (Pierce) usando albúmina sérica bovina como estándar.

HSFt se reconstituyó en tampón 0.1 M de imidazol/NaCl 0.05 M a pH 7.4. Fe (II) se añadió lentamente a intervalos de 20 minutos para diferentes cargas totales de hierro de 200, 600 y 1600 Fe/ferritina. Las proteínas se transfirieron mediante diálisis a tampón Tris 20 mM (pH 7.4, NaCl 5 mM).

Las ferritinas formadas en presencia de fosfato, fueron reconstituidas también en tampón 0.1 M de imidazol/NaCl 0.05 M a pH 7.4, con 1mM de PBS presente en el medio.

#### *Bloqueo con Zn (II).*

## INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA

---

Tanto las ferritinas reconstituidas (a partir de ApoHSFt) como las ferritinas recombinantes humanas (HuFtH y HuFtL) fueron incubadas con 100 Zn (II) por ferritina durante dos horas, y posteriormente dializadas exhaustivamente (membrana de diálisis Spectra/Por Float-A-Lyzer con un límite de peso molecular de 300000 Da) frente a tampón Tris 20 mM (pH 7.0, NaCl 5 mM) para eliminar el exceso de Zn (II) no unido a la ferritinas.

### *Medida actividad ferroxidasa.*

(Zn) La actividad ferroxidasa de las diferentes HSFts (ApoHSFt, 200FeHSFt, 600FeHSFt y 1600FeHSFt, bloqueadas o no con Zn) se ensayaron a una concentración de proteína de 0.5  $\mu$ M en tampón Tris 20 mM, pH 7.0. Se adicionó Fe (II) a partir de disoluciones acuosas recién preparadas (desgasificadas previamente durante 15 min bajo una corriente de nitrógeno) de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en una relación Fe (II)/ferritina de 25, 100 y 200. El Fe (II) disponible se monitorizó a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos con ferrozina. Los espectros se tomaron en estos tiempos de reacción en un intervalo de longitud de onda 450-650 nm, con un Spectronic Unicam UV 300.

( $\text{PO}_4^{3-}$ ) Para evaluar la actividad ferroxidasa de las diferentes HSFt (50FeHSFt, 200FeHSFt, 600FeHSFt y 1600FeHSFt, reconstituidas en presencia o ausencia de  $\text{PO}_4^{3-}$ ), se trabajó a una concentración de proteína de 0,5  $\mu$ M en tampón Tris 20mM pH 7.0 en una relación Fe (II)/ferritina de 100. Los espectros se tomaron a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos de reacción en un intervalo de longitud de onda 450-650 nm.

### *Fotorreducción del núcleo de la ferritina.*

(Zn) Se usaron disoluciones 25  $\mu\text{M}$  de HSft y HSftZn con citrato 30 mM y Tris 20 mM, a las que se adicionó fz en exceso. Se irradiaron las cubetas y se registraron los espectros de UV-Vis a diferentes tiempos, para visualizar la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ .

( $\text{PO}_4^{3-}$ ) Se usaron disoluciones 25  $\mu\text{M}$  de 1600FeHSft y 1600 $\text{PO}_4$ HSft con citrato 30 mM y Tris 20 mM, a las que se adicionó fz en exceso. Se irradiaron las cubetas y se registraron los espectros de UV-Vis a diferentes tiempos, para visualizar la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ .

### **3.5. Referencias.**

1. Sun, S., Chasteen, N. D., Arosio, P. & Levi, S. Ferroxidase Kinetics of Human Liver Apoferritin, Recombinant H-Chain Apoferritin, and Site-Directed Mutants. *Biochemistry* **32**, 9362–9369 (1993).
2. Yang, X., Chen-Barrett, Y., Arosio, P. & Chasteen, N. D. Reaction paths of iron oxidation and hydrolysis in horse spleen and recombinant human ferritins. *Biochemistry* **37**, 9743–9750 (1998).
3. Xu, B. & Chasteen, N. D. Iron oxidation chemistry in ferritin: Increasing Fe/O<sub>2</sub> stoichiometry during core formation. *J. Biol. Chem.* **266**, 19965–19970 (1991).
4. Waldo, G. S. & Theil, E. C. Formation of Iron(III)-Tyrosinate Is the Fastest Reaction Observed in Ferritin. *Biochemistry* **32**, 13262–13269 (1993).
5. Levi, S. *et al.* The role of L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *J Mol Biol* **238**, 649–654 (1994).
6. Macara, I. G., Hoy, T. G. & Harrison, P. M. The formation of ferritin from apoferritin. Catalytic action of apoferritin. *Biochem. J.* **135**, 343–348 (1973).

## INCORPORACIÓN Y LIBERACIÓN DE HIERRO DE LA FERRITINA

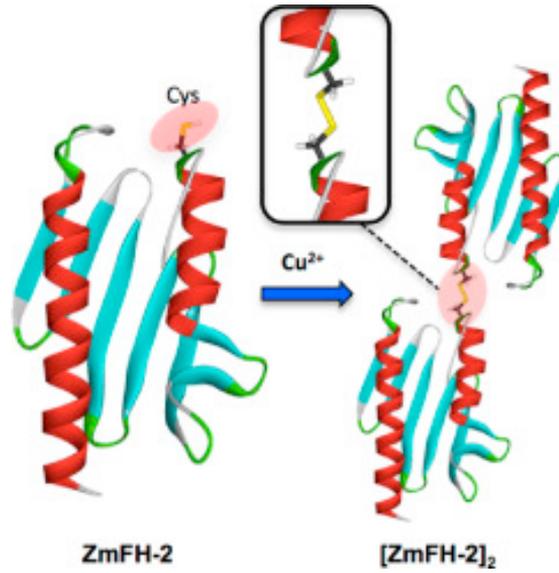
---

7. Sadeghi, O., Zakharov, L. N. & Nyman, M. Aqueous formation and manipulation of the iron-oxo Keggin ion. *347*, 2013–2017 (2015).
8. Levi, S. *et al.* Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem.J.* **288**, 591–596 (1992).
9. Levi, S., Santambrogio, P., Corsi, B., Cozzi, A. & Arosio, P. Evidence that residues exposed on the three-fold channels have active roles in the mechanism of ferritin iron incorporation. *Biochem. J.* **317**, 467–473 (1996).
10. Theil, E. C. *et al.* The ferritin iron entry and exit problem. *Inorganica Chim. Acta* **297**, 242–251 (2000).
11. Bou-Abdallah, F. *et al.* Facilitated diffusion of iron(II) and dioxygen substrates into human H-chain ferritin. A fluorescence and absorbance study employing the ferroxidase center substitution Y34W. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17801–17811 (2008).
12. Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C. & Chasteen, N. D. Defining metal ion inhibitor interactions with recombinant human H- and L-chain ferritins and site-directed variants: an isothermal titration calorimetry study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 489–497 (2003).
13. Trefry, A. & Harrison, P. M. Incorporation and release of inorganic phosphate in horse spleen ferritin. *Biochem. J.* **171**, 313–20 (1978).
14. Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. *J. Struct. Biol.* **126**, 182–194 (1999).
15. Johnson, J. L., Cannon, M., Watt, R. K., Frankel, R. B. & Watt, G. D. Forming the Phosphate Layer in Reconstituted Horse Spleen Ferritin and the Role of Phosphate in Promoting Core Surface Redox Reactions †. 6706–6713 (1999). doi:10.1021/bi982727u
16. Watt, G. D., Frankel, R. B., Papaefthymiou, G. C., Spertalian, K. & Stiefel, E. I. Redox Properties and Mossbauer Spectroscopy of *Azotobacter vinelandii* Bacterioferritin. 4330–4336 (1986). doi:10.1021/bi00363a023
17. Mann, S., Bannister, J. V & Williams, J. P. Structure and Composition of

- Ferritin Cores Isolated from Human Spleen , Limpet ( *Patek vulgata* ) Hemolymph and Bacterial ( *Pseudomonas aeruginosa* ) Cells. *J Mol Biol* **188**, 225'232 (1986).
18. Wade, V. J. *et al.* Structure and composition of ferritin cores from pea seed (*Pisum sativum*). **1161**, 91–96 (1993).
  19. Gheng, Y. G. & Chasteen, N. D. Role of Phosphate in Initial Iron Deposition in Apoferritin1 ". 2947–2953 (1991). doi:10.1021/bi00225a031
  20. Watt, R. K., Hilton, R. J. & Graff, D. M. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**, 745–759 (2010).
  21. Carmona, F. *et al.* Ferritin iron uptake and release in the presence of metals and metalloproteins : Chemical implications in the brain. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2752–2764 (2013).
  22. Jacobs, D. L., Watt, G. D., Frankel, R. B. & Papaefthymiou, G. C. Redox reactions associated with iron release from mammalian ferritin. *Biochemistry* **28**, 1650–1655 (1989).
  23. Watt, R. K., Petrucci, O. D. & Smith, T. Catalysis Science & Technology for energy conversion. 3103–3110 (2013). doi:10.1039/c3cy00536d







## CAPÍTULO 4: QUÍMICA REDOX EN FRATAXINAS DE PLANTAS.



### 4.1. Introducción.

La frataxina es una proteína que se expresa en mayor medida en células de tejidos con una tasa metabólica alta, como neuronas, corazón, riñón e hígado en mamíferos <sup>1</sup> y flores en plantas <sup>2</sup>. La detoxificación de hierro y el control de ROS son funciones tradicionalmente asociadas a la frataxina, por lo que su presencia en los tejidos metabólicamente exigentes se hace más necesaria <sup>3-5</sup>.

La expresión de la frataxina en las plantas es esencial, ya que los mutantes *knockout* de *A. thaliana* son letales <sup>6,7</sup>. Asimismo, una reducción en la síntesis de AtFH en la planta genera una disminución en la actividad de las proteínas de tipo hemo y Fe-S, un mayor contenido de hierro y niveles altos de monóxido de nitrógeno (NO), lo que indica un papel también en la señalización del NO y el estrés oxidativo <sup>6,8,9</sup>. De todos modos, el papel que desempeña la frataxina sigue siendo un enigma por resolver, especialmente en plantas.

En eucariotas no fotosintéticos, solo existe una isoforma de frataxina y está localizada en la mitocondria <sup>1,10,11</sup>. En levaduras y humanos, los homólogos de frataxina se sintetizan como moléculas precursoras más grandes que, al importarlas a la mitocondria, están sujetas a dos escisiones proteolíticas, produciendo una forma intermedia y una forma madura <sup>12-15</sup>. Sin embargo, recientemente se ha publicado que en *Arabidopsis*, la AtFH, está presente en mitocondria y cloroplastos <sup>16</sup>, y su deficiencia altera el funcionamiento normal de los cloroplastos al afectar los niveles de

Fe, clorofila y proteínas Fe-S, lo que sugiere que la AtFH juega un papel tanto como modulador del ISC mitocondrial como de los sistemas SUF (*Sulfur Utilization Factor*) de cloroplastos <sup>16</sup>.

Aunque identificamos solo un gen de frataxina en *A. thaliana*, otras plantas podrían tener al menos dos isoformas <sup>17</sup>, aunque esto no ha sido verificado experimentalmente hasta la fecha. En la presente tesis, hemos identificado dos genes que codifican diferentes isoformas de frataxina en *Zea mays*: *ZmFH-1*, ubicado en el cromosoma 1 y *ZmFH-2*, ubicado en el cromosoma 3. Los análisis de secuencia muestran un alto porcentaje de identidad entre ambas isoformas. Ambas proteínas son funcionales, tienen un papel protector contra especies oxidantes y se localizan en ambos casos tanto en mitocondria como en cloroplastos. Sin embargo, algunas diferencias en sus patrones de expresión, características estructurales y propiedades de agregación sugieren que ambas isoformas cumplirían una función similar pero no idéntica en el metabolismo de *Zea mays*.

Las frataxinas de plantas representan un modelo especialmente interesante para abordar la función de esta proteína. Como se indicó en la introducción, los datos existentes sobre frataxinas se corresponden mayoritariamente a proteínas de origen animal, bacterias y levadura. Por otra parte, el estudio existente sobre la interacción de iones metálicos con frataxinas se reduce al Fe por lo que existe un interés en extender estos estudios a otros iones metálicos. En este sentido, existe cierta evidencia de que la frataxina podría estar involucrada en el metabolismo del cobre. Así, los mutantes *knockout* de frataxina de *S. cerevisiae* son

más sensibles al Cu que las células *wild-type* <sup>18</sup>. Los pacientes con ataxia de Friedreich muestran una distribución alterada del Cu en el núcleo dentado del sistema nervioso central <sup>19</sup>, y en la mosca modelo de la enfermedad hay un aumento generalizado en el contenido de cobre <sup>20</sup>. Por otra parte, en moscas *knockdown*, con niveles reducidos de frataxina, el tratamiento con quelantes de cobre mejoró algunos de los síntomas sin alterar el fenotipo de acumulación de hierro, lo que implica un papel directo del Cu en la fisiopatología de la enfermedad.

Muy recientemente Ha-Duong *et al.* realizaron un estudio sobre la afinidad del cobre por la frataxina de levadura, concluyendo que ésta, es incluso mayor que la del hierro <sup>21</sup>. Por lo tanto, se necesitan más estudios para dar respuesta al creciente interés por estudiar la interacción entre cobre y frataxinas.

A diferencia de otras frataxinas conocidas, las frataxinas de plantas contienen una cisteína conservada (Cys) en sus secuencias de aminoácidos C-terminales. Los residuos de Cys pueden experimentar varias modificaciones reversibles tales como la oxidación para formar puentes disulfuro, ácido sulfénico, glutationilaciones o alquilaciones. Por lo tanto, la presencia de un residuo de Cys en las frataxinas de las plantas las diferencia de las de otros reinos y puede ser vital en el ensamblaje y la función de la proteína en plantas.

Hemos estudiado la influencia de este residuo de Cys en el ensamblaje de tres frataxinas de plantas recombinantes, una de *Arabidopsis thaliana* (AtFH) y dos de *Zea mays* (ZmFH-1 y ZmFH-2). Curiosamente, ZmFH-1 y ZmFH-2 tienen diferentes

inclinaciones para formar dímeros en condiciones aeróbicas.

Debido a que los iones metálicos, en particular Cu (II), actúan en la conversión *redox* cisteína-cistina en otras proteínas <sup>22,23</sup>, evaluamos la oxidación producida por Cu (II) en frataxinas de plantas que conduce a la dimerización, así como a la reducción química que revierte a monómero.

### 4.2. Resultados y discusión

#### *Identificación de homólogos de frataxina Zea mays y análisis filogenético*

Utilizando AtFH como secuencia de inicio, buscamos genes homólogos de maíz en la base de datos *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Identificamos dos genes homólogos predichos para *Zea mays* que codifican las proteínas ZmFH-1 y ZmFH-2 compuestas por 199 y 201 aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas comparten el 72,9% de la secuencia. Además, la ZmFH-1 y la ZmFH-2 comparten el 41.9 y 44.7% de identidad de secuencia, respectivamente, con la AtFH. Es importante señalar que el maíz es el primer organismo descrito que contiene dos genes que codifican proteínas frataxina.

#### *Modelado de homología de ZmFH-1 y ZmFH-2*

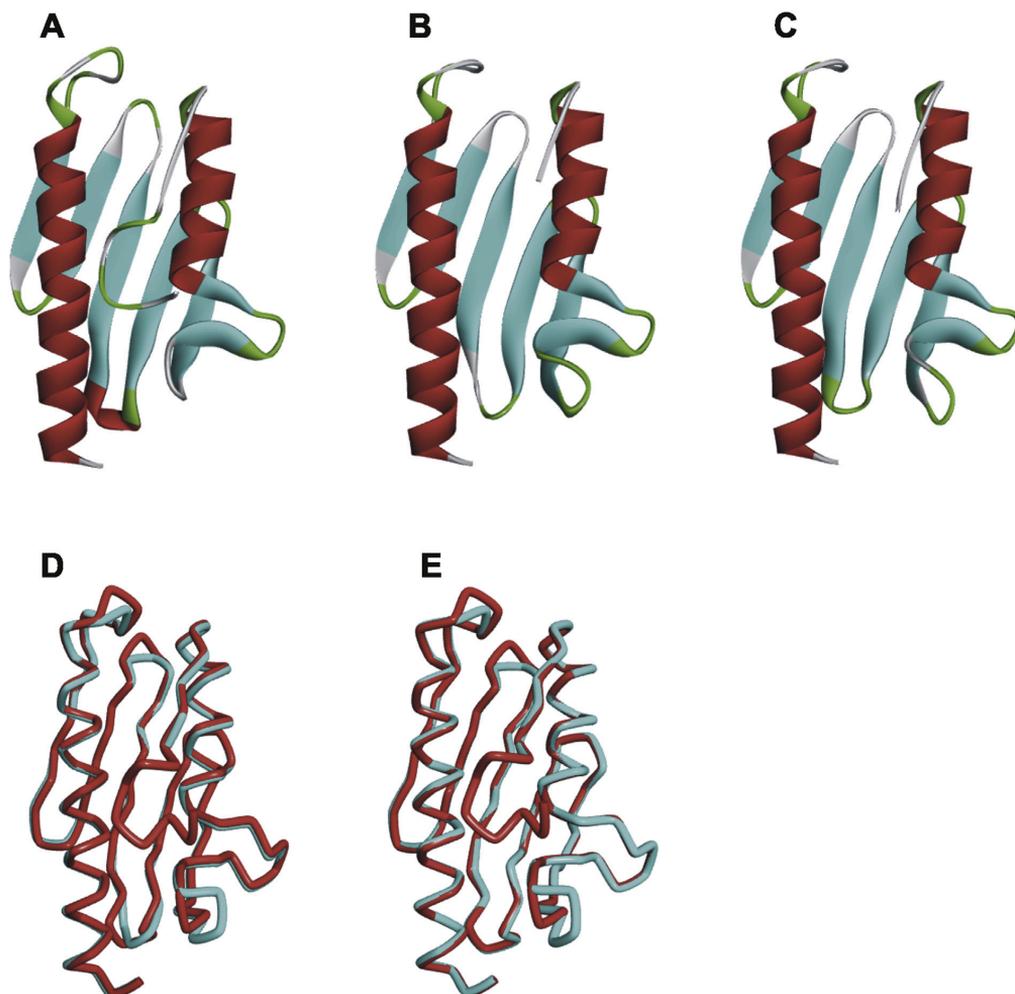
Se construyeron dos modelos de homología de ZmFH-1 y ZmFH-2 usando la estructura 3D de la frataxina humana madura (HuFH, código PDB 1EKG) <sup>24</sup>. Las alineaciones de HuFH con ZmFH-1 y ZmFH-2 se realizaron usando los átomos de la cadena principal de HuFH de los residuos 90 a 208 (119 aminoácidos). La HuFH

madura comparte 40.9% de identidad con los residuos 89-199 de ZmFH-1 y 38.6% de identidad con los residuos 90-201 de ZmFH-2. Una alineación de la estructura del esqueleto del polipéptido de HuFH con ZmFH-1 y ZmFH-2 mostró que ambos modelos de homología 3D son muy similares entre ellos y con HuFH (Fig. 1). Ambos modelos contienen elementos de estructura secundaria similares, que constan de dos hélices alfa ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ), cinco segmentos antiparalelos que forman una lámina beta grande ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) y una segunda lámina beta más pequeña formada por el extremo C de  $\beta 5$  y cadenas  $\beta 6$  y  $\beta 7$ , como se ha reportado previamente para varias frataxinas, incluidas las de *E. coli*<sup>25</sup>, humanos<sup>24</sup> y *Arabidopsis thaliana*<sup>2</sup>.

Sin embargo, aunque ambas frataxinas de maíz muestran un plegamiento 3D similar al de HuFH, con elementos de estructura secundaria altamente conservados, algunas diferencias son evidentes. En primer lugar, el giro entre la hélice  $\alpha 1$  y la primera cadena de la lámina beta tanto en ZmFH-1 como en ZmFH-2 no coincide con el de HuFH. Lo mismo ocurre en los giros entre las cadenas  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , y  $\beta 5$  y  $\beta 6$  (Fig. 2 D y E). Estas son regiones no conservadas entre las frataxinas de diferentes taxones, que podrían explicar los cambios estructurales que probablemente afectan a sus funciones. Alternativamente, estas diferencias pueden representar adaptaciones específicas de frataxinas de maíz para cumplir funciones específicas en el metabolismo de las plantas. Las regiones entre la hélice  $\alpha 1$  y la primera cadena de la lámina  $\beta 1$ , y las cadenas  $\beta 2$  y  $\beta 3$  se conservan principalmente en

frataxinas de plantas, y tienden a estar cerca de la cisteína C-terminal conservada.

En segundo lugar, y lo que es más importante, las regiones C-terminales de las frataxinas de maíz extendidas desde la hélice  $\alpha 2$  son más cortas que en la secuencia humana (Fig. 1 A, B y C). La región C-terminal es determinante y crítica en el ensamblaje y la estabilidad termodinámica de la proteína nativa <sup>26</sup>, estando ambas propiedades correlacionadas con la longitud de la secuencia y el entramado de interacciones, consigo mismo y con el resto de la proteína, que estos aminoácidos establecen. Lo más probable es que el plegamiento de las frataxinas de *Zea mays* sea menos estable que el de HuFH, un hecho que podría afectar a su función.



**Fig. 1: Modelo de homología 3D de ZmFH-1 y ZmFH-2 maduras.** Las estructuras de cinta que muestran el plegamiento de frataxina humana (HuFH, PDB ID 1EKG) (A) y los modelos de homología de ZmFH-1 (B) y ZmFH-2 (C).  $\alpha$ -hélices están coloreadas en rojo, las cadenas  $\beta$  están representadas en los cyan y los giros  $\beta$  se indican en verde. (D) y (E) muestran la superposición de la estructura 1EKG HuFH 3D (rojo) con los modelos de homología de ZmFH-1 (D) y ZmFH-2 (E), ambos coloreados en cyan.

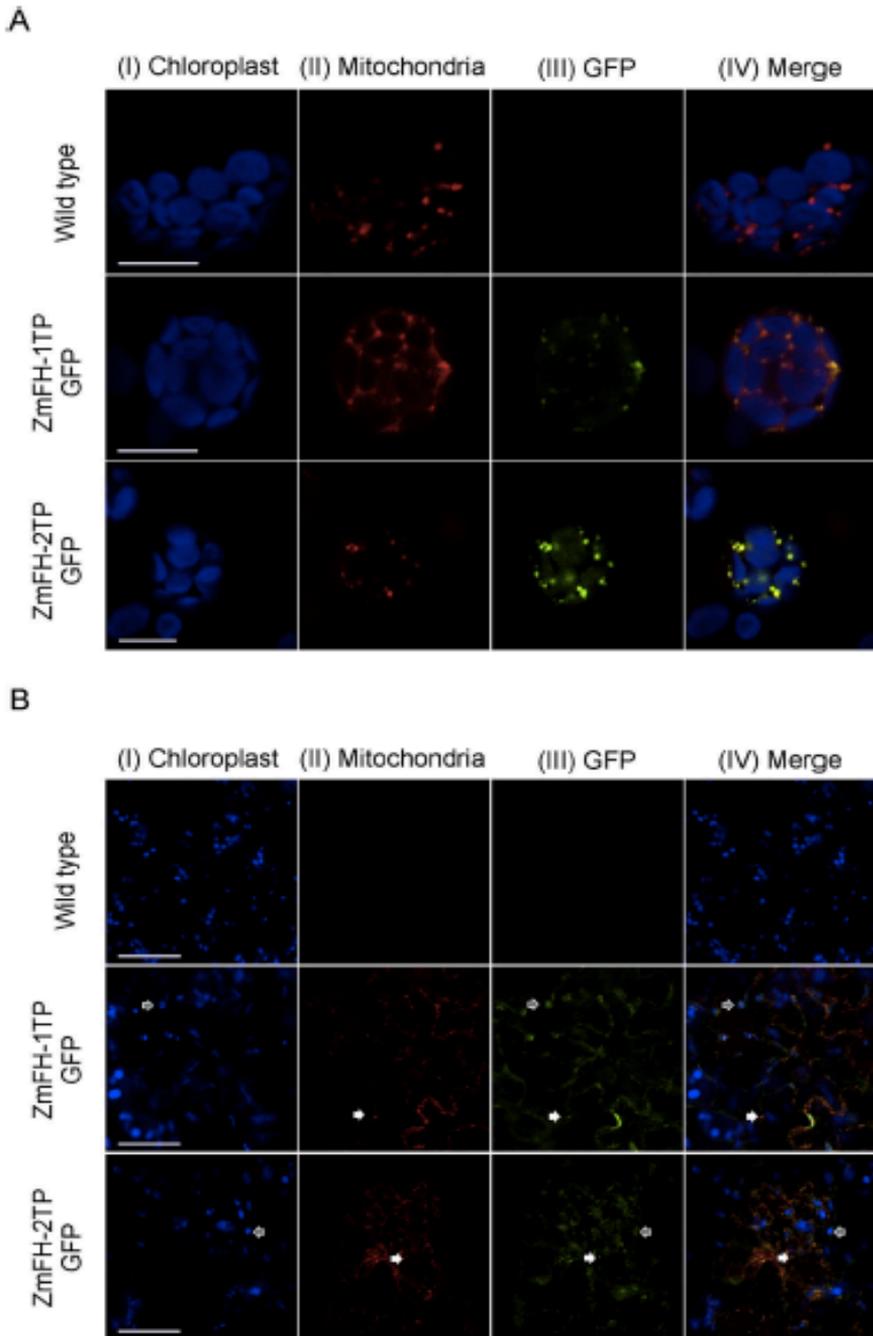
#### *Localización subcelular de ZmFH-1 y ZmFH-2*

Llevamos a cabo el estudio de la localización celular de ZmFH-1 y ZmFH-2. Para ello, transformamos plantas de *A. thaliana* con plásmidos que codifican los péptidos de tránsito predichos de ambas proteínas fusionadas a la secuencia de ADN que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Posteriormente aislamos protoplastos de las plantas seleccionadas y buscamos la ubicación de GFP usando microscopía confocal fluorescente.

Los resultados mostraron que la ZmFH-1TP-GFP se colocalizó con la señal de fluorescencia roja correspondiente al marcador mitocondrial *MitoTracker*, mientras que la ZmFH-2TP-GFP mostró un patrón de fluorescencia que se colocalizó tanto con *Mitotracker* como con la autofluorescencia de clorofila, indicando una localización dual en mitocondrias y cloroplastos (Fig. 2 A).

Para confirmar estos resultados, también realizamos los estudios de localización en hojas infiltradas de *N. benthamiana*. Los patrones de fluorescencia indican una acumulación significativa de ZmFH-1TP-GFP y ZmFH-2TP-GFP en ambos, mitocondria y cloroplastos, lo que sugiere una localización dual en ambos orgánulos de plantas (Fig. 2 B). Nuestros resultados implican que al menos una isoforma de frataxina de maíz estaría presente tanto en cloroplastos como en mitocondria. Esto podría explicarse por la composición de aminoácidos de ambos péptidos de tránsito de Zm-FH. Estos están enriquecidos en residuos hidrofóbicos, positivamente cargados, y significativamente deficientes en residuos ácidos, similar a otras proteínas dirigidas ya reportadas<sup>27</sup>.

Recientemente Casati *et al.*, demostraron que en *A. thaliana*, la frataxina está codificada por un único gen y la proteína está localizada en mitocondria y cloroplasto <sup>16</sup>. Estos datos sugieren que la AtFH jugaría un papel importante en el metabolismo Fe-S de las plantas en ambos orgánulos, ya que su deficiencia altera la actividad biológica de varias proteínas Fe-S mitocondriales y cloroplastidiales <sup>6,16</sup>. Por lo tanto, es posible que cada proteína ZmFH desempeñe un papel similar en cloroplasto y mitocondria como ocurre con AtFH, participando en el funcionamiento normal de la cadena de transporte de electrones en cloroplasto y regulando la biosíntesis de clústeres Fe-S y el metabolismo del hierro en ambos orgánulos <sup>16</sup>.



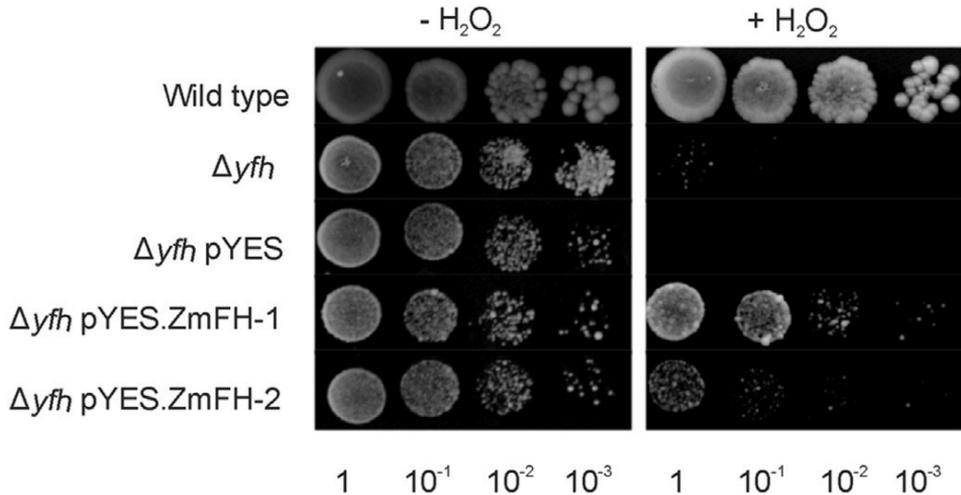
**Fig. 2: Localización subcelular de isoformas de frataxina de maíz en sistemas heterólogos.** (A) Estudios de localización en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Los plásmidos pZP212 que contienen las secuencias de

codificación de péptido de tránsito *ZmFH-1TP* y *ZmFH-2TP*, fusionadas a GFP, se introdujeron en plantas de *A. thaliana* Col-0 mediante el método de inmersión floral. Los protoplastos aislados de las plantas *wild-type* y transgénicas se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. La fluorescencia corresponde a (I) autofluorescencia de clorofila (excitación 488 nm/emisión 650 nm); (II) tinción *MitoTracker* (excitación 543 nm/emisión 576 nm); (III) la GFP (excitación 488 nm/emisión 510 nm); (IV) la superposición de I, II y III, que muestra la coincidencia de la localización de GFP con los marcadores de los orgánulos. Escala: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Localización subcelular en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron de hojas de plantas silvestres, hojas infiltradas con pZP212.ZmFH-1TP-GFP, y hojas infiltradas con pZP212.ZmFH-2TP-GFP. La fluorescencia corresponde a (I) autofluorescencia de clorofila (excitación 488 nm/emisión 650 nm); (II) marcador mitocondrial *mCherry* (excitación 543 nm/emisión 576 nm); (III) la GFP (excitación 488 nm/emisión 510 nm); (IV) Superposición de I, II y III, que muestra la coincidencia de la localización de GFP con marcadores. Las flechas blancas indican co-localización con mitocondria y las grises indican co-localización con cloroplasto. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### *Complementación de Saccharomyces cerevisiae (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Se ha reportado anteriormente que las levaduras *knockout* de frataxina son hipersensibles a los oxidantes, como lo demuestra su sensibilidad al peróxido de hidrógeno <sup>28</sup>. Para estudiar la función de ZmFH-1 y ZmFH-2, evaluamos la capacidad de estas proteínas para restaurar el fenotipo normal de la levadura *knockout* de frataxina ( *$\Delta yfh1$* ) cuando se complementa con isoformas de frataxina de maíz. Por lo tanto, las células  *$\Delta yfh1$*  solas o complementadas con cada isoforma se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM y posteriormente se transfirieron a medio YP-galactosa completo. El

mutante nulo muestra una menor tasa de crecimiento y una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno que las células de fenotipo silvestre. Por el contrario, las células de levadura complementadas mostraron una mayor resistencia al estrés oxidativo (Fig. 3). Las células que expresan ZmFH-1 crecieron hasta la cuarta dilución después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que indica que esta isoforma es más eficiente que ZmFH-2, que también creció hasta la cuarta dilución, pero mucho menos vigorosamente, para restaurar el fenotipo. Como se describió para AtFH<sup>2</sup>, estos resultados apuntan a un papel protector contra los oxidantes para estas isoformas y sugieren que ambas proteínas ZmFH pueden tener diferente relevancia en la protección contra el daño oxidativo.



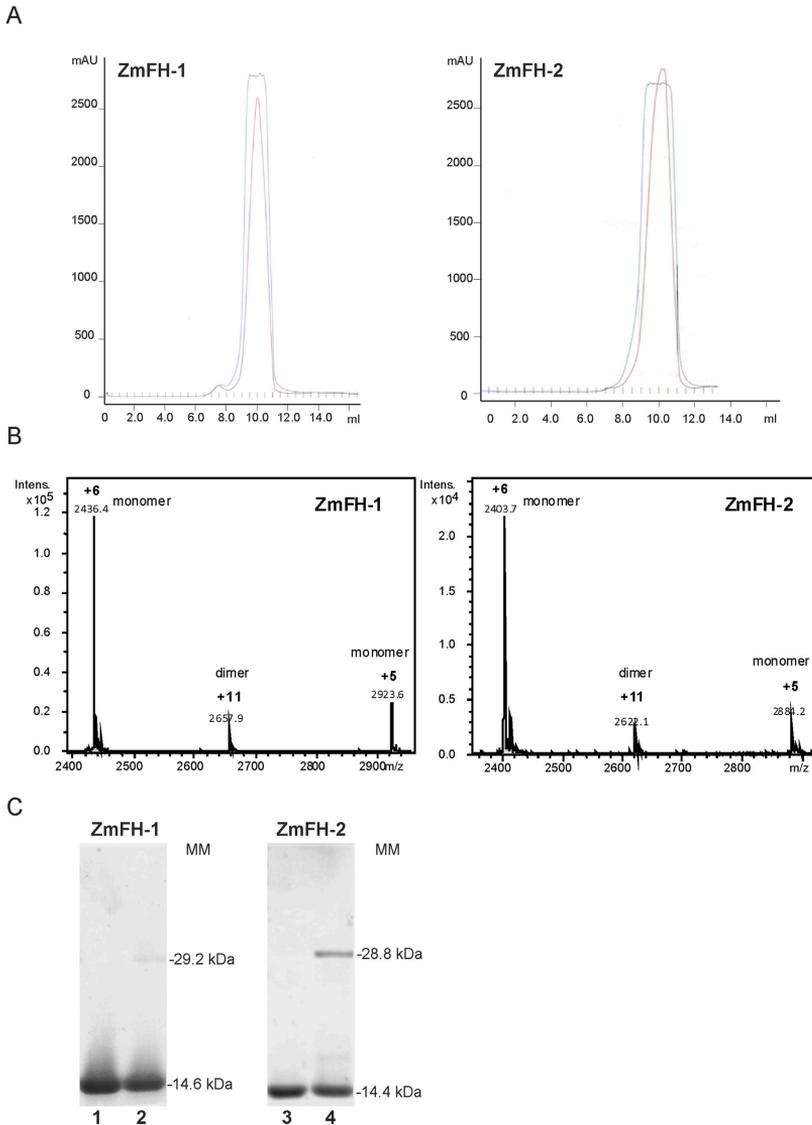
**Fig. 3: Complementación de la deficiencia de YFH1 por ZmFH-1 y ZmFH-2.**

La sensibilidad de *S. cerevisiae* DY150,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta yfh1$  transformadas con pYES, pYES.ZmFH-1 y pYES.ZmFH-2 frente al daño oxidativo se evaluó después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El tratamiento consistió en una incubación de las levaduras en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM durante 60 minutos y se inocularon 3  $\mu$ L de cada

dilución seriada en medio de cultivo YP-Galactosa al 2% (p/v). Las fotografías se tomaron después de 3 días de crecimiento a 30 °C.

### *Síntesis y purificación de ZmFH-1 y ZmFH-2*

La síntesis a pequeña escala (es decir, 5 L de cultivo, cultivado en varios matraces Erlenmeyer de 2 L) de ZmFH-1 y ZmFH-2 representa invariablemente un pico de proteína en la última etapa de purificación de FPLC (*fast protein liquid chromatography*, Fig. 4 A). Este pico se identificó mediante ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) y SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Fig. 4 A, B) como el monómero ZmFH esperado (más los residuos GST N-terminales resultantes de la digestión con trombina de las proteínas de fusión con GST). Por lo tanto, los ESI-MS de ZmFH-1 y ZmFH-2 purificados, tanto a pH neutro como ácido, exhiben picos principales de 14612 y 14416 Da, respectivamente (Fig. 4 B). Los valores de ZmFH-1 y ZmFH-2 estimados en MW son 14613.2 y 14416.0 Da, respectivamente. Estos resultados confirmaron que los monómeros de las proteínas sintetizadas carecían de iones metálicos. Solo se detectaron picos menores de MW compatibles con dímeros de proteína (MW experimental de 29226 Da para ZmFH-1 y 28832 Da para ZmFH-2, que coinciden exactamente con los valores teóricos). La presencia de dímeros también fue evidente cuando las muestras se analizaron por PAGE nativa. Por lo tanto, se evidencia una banda monomérica acompañada por una banda con una masa molecular que coincide con la de los dímeros de proteína, especialmente para ZmFH-2 (Fig. 4 C).



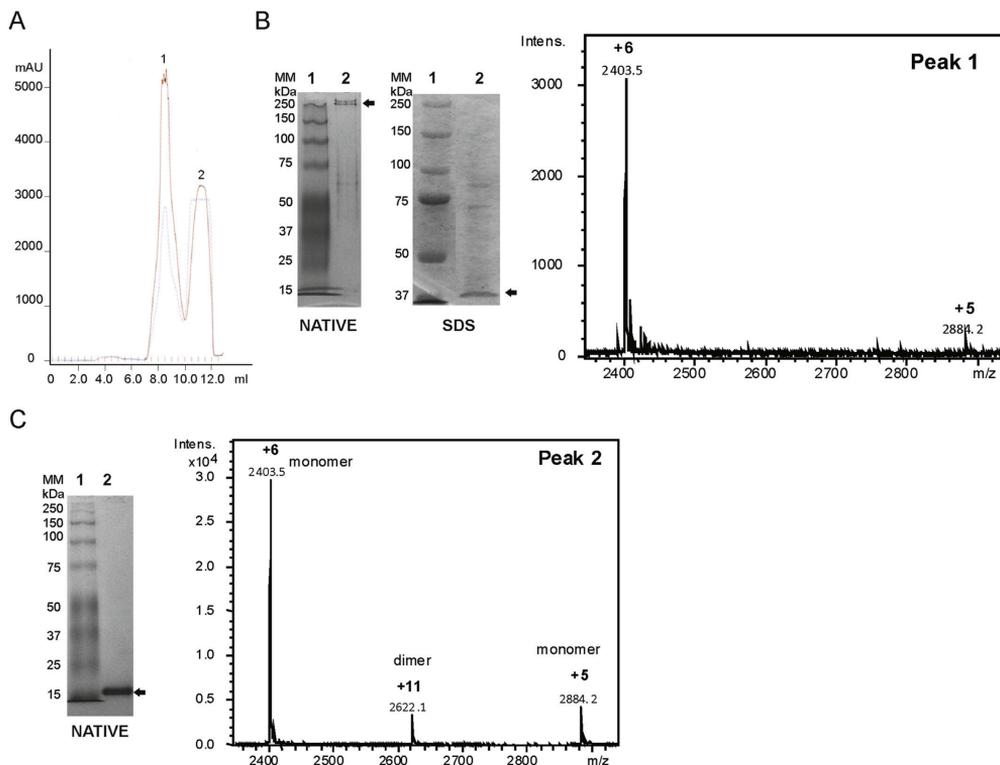
**Fig. 4: Expresión y purificación de ZmFH-1 recombinante y ZmFH-2.** (A) Espectros de FPLC Superdex 75 de síntesis a escala Erlenmeyer (aproximadamente 500-1000 mL), (B) ESI-MS y (C) Análisis PAGE nativa de las proteínas recombinantes ZmFH-1 (izquierda) y ZmFH-2 (derecha). Las líneas azul y roja en (A) corresponden a 280 y 254 nm, respectivamente. Los carriles en (C) corresponden a: (1) ZmFH-1 con DTT (Ditiotreitol); (2) ZmFH-1 sin DTT; (3) ZmFH-2 con DTT; y (4) ZmFH-2 sin DTT en tampón de muestra.

### *Estudios de agregación y conformacionales de ZmFH-1 y ZmFH-2*

Una característica común descrita para todas las frataxinas conocidas es su capacidad de ensamblaje, que probablemente esté relacionada con el dinamismo de sus estructuras <sup>29</sup>. Nosotros hemos analizado la agregación de ZmFH y/o cambios conformacionales, tomando la isoforma ZmFH-2 recombinante como modelo, a través de i) el análisis de su tendencia espontánea (es decir, intrínseca, no impulsada por metal) de someterse a oligomerización y ii) entrada de una señal química externa, como presencia de O<sub>2</sub> (es decir, incubación al aire libre).

Con este fin, se repitió la síntesis de ZmFH-2 en condiciones de gran escala en un fermentador de 10 L equipado con controladores de temperatura, O<sub>2</sub> y pH. Sorprendentemente, en este caso, se obtuvieron dos picos de FPLC, en contraste con el pico único logrado en las producciones de Erlenmeyer (aproximadamente 500-1000 mL, Fig. 5 A). La PAGE nativa del primer pico reveló una banda de muy alto peso molecular, una banda débil a 60 kDa y la ausencia total de monómero (Fig. 5 B). La especie HMW-ZmFH-2 era sensible a SDS (Fig. 5 B) de acuerdo con su naturaleza polimérica. Vale la pena señalar que las únicas bandas distintas en condiciones de desnaturalización, además del monómero que se ejecuta con el frente, indican agregados de 60 y 90 kDa, lo que correspondería a tetrámeros y hexámeros de ZmFH-2. Sin embargo, el análisis ESI-MS de esta muestra solo produjo un pico monomérico ZmFH-2, lo que indica que las condiciones de funcionamiento de la MS eran demasiado duras para mantener el

estado agregado o que las especies de alto peso molecular formadas no podían ser ionizadas y detectadas por ESI-MS. En cualquier caso, el monómero observado por ESI-MS sería el resultado de la desagregación del polímero HMW o simplemente la pequeña fracción restante de un monómero capaz de ionizarse, de acuerdo con la baja intensidad del pico. Por el contrario, el segundo pico de FPLC contenía principalmente ZmFH-2 monomérico, mostrando características similares por ESI-MS a las mostradas por la muestra recuperada de cultivos de pequeña escala (véanse las Fig. 4 B y 5 C). Estos hallazgos demuestran claramente que las condiciones de cultivo pueden conducir a la agregación de frataxinas, ya que además de las especies monoméricas, también se recupera una parte importante de la proteína sintetizada en un estado agregado HMW, como también fue reportado para la HuFH.



**Fig. 5: Síntesis de ZmFH-2 a escala de fermentador.** (A) Espectros de ZmFH-2 con Superdex 75. Las líneas azules y rojas corresponden a 280 y 254 nm, respectivamente. (B) Análisis de PAGE nativa y ESI-MS del pico 1 y (C) del pico 2. Los carriles 1 y 2 en cada gel corresponden a marcadores de peso molecular (MWM) y a la muestra analizada, respectivamente. En los geles nativos, los MW son solo indicativos.

### *Efecto del Oxígeno en la conformación y agregación de ZmFH-1 y ZmFH-2*

Posteriormente, y con el fin de investigar si el posible origen de los distintos estados de agregación de la frataxina en las producciones pequeñas (dímeros), como a gran escala (polímeros HMW) de ZmFH-2 (Fig. 4 C y 5 B) se debieron a una oxidación de la muestra al aire, las muestras de ZmFH-2 se dejaron al aire libre

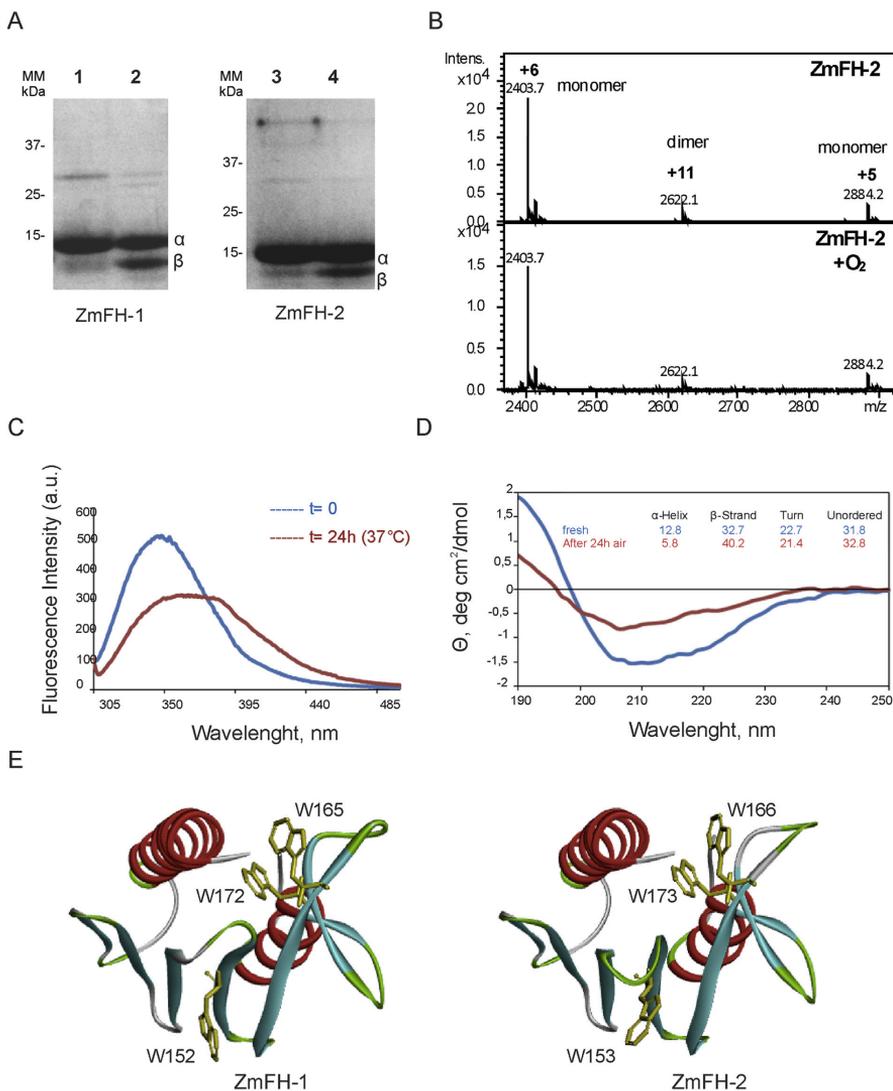
durante varias horas, y luego se analizaron mediante PAGE nativa y ESI-MS (Fig. 6). La electroforesis PAGE reveló que la exposición al aire no condujo a la formación de dímeros sino a la aparición de una nueva banda monomérica (llamada a partir de ahora el monómero  $\beta$ ) de movilidad ligeramente más rápida que el monómero original (nombrado a partir de ahora monómero  $\alpha$ ) (Fig. 6 A). Los espectros ESI-MS de ambas muestras (fresca y oxigenada) compartían los mismos picos y, por lo tanto, el mismo peso molecular (Fig. 6 B), lo que demuestra que  $\alpha$  y  $\beta$  son dos conformaciones distintas de la misma proteína monomérica. Por lo tanto, la explicación más plausible para estos datos experimentales es suponer que el  $O_2$  provoca un cambio conformacional del monómero  $\alpha$  al  $\beta$ , que muestra una movilidad electroforética diferente en los geles nativos.

La posible transformación impulsada por  $O_2$  del monómero de tipo  $\alpha$  a tipo  $\beta$  se controló mediante espectroscopias de fluorescencia, UV-Vis y dicroísmo circular (CD). Sorprendentemente, la autofluorescencia del monómero  $\alpha$  muestra un máximo a 350 nm que se mueve a 390 nm cuando se expone 24 horas al aire libre (Fig. 6 C). Se observó un comportamiento similar para la otra frataxina de maíz analizada (ZmFH-1). La fluorescencia de la proteína a 350 nm es generalmente atribuible a residuos de triptófano (Trp), y el cambio a 390 nm revelaría una alteración del microambiente de Trp que conduce a un estado más expuesto<sup>30</sup>, compatible con el supuesto cambio conformacional de la proteína. Ambos polipéptidos estudiados con ZmFH albergan tres residuos de Trp en su región C-

terminal que podrían explicar perfectamente este fenómeno. Sin embargo, la cadena lateral Trp 153 ya está expuesta en el modelo 3D de ZmFH-2, proyectándose éste fuera del plano definido por la lámina  $\beta$  (Fig. 6 E). Esta podría ser la razón por la cual el cambio en el máximo de fluorescencia de la proteína se puede atribuir a la exposición de Trp 166 y Trp 173, los residuos de Trp cuyos indoles pertenecientes a sus cadenas laterales están enterrados en el núcleo de la proteína. Se ha demostrado que la frataxina de levadura interactúa con Isu1 a través del Trp 131 <sup>31</sup>, y este Trp conservado y expuesto es un punto caliente de interacción proteína-proteína <sup>32</sup>. De hecho, los Trp 166 y 173 se conservan en todas las frataxinas de plantas. Por lo tanto, este fenómeno de cambio conformacional del monómero  $\alpha$  al monómero  $\beta$  con la exposición de residuos Trp adicionales podría ser relevante para la interacción de frataxinas vegetales con proteínas de las rutas biosintéticas del grupo [Fe-S], u otras vías, en condiciones fisiológicas donde el oxígeno es abundante.

Del mismo modo, los espectros de CD de ZmFH-1 y ZmFH-2, después de 24 h en aerobiosis, mostraron diferencias significativas respecto a las muestras recientes (controles)(Fig. 6 D). Los espectros de CD experimentales interpretados con CONTIN corresponden a una mezcla de frataxinas con diferentes estructuras. La exposición al aire produce un aumento de lámina  $\beta$  en detrimento de estructuras hélice  $\alpha$ . Por lo tanto, mientras que el espectro de CD del monómero  $\alpha$ -ZmFH-2 (muestra reciente) coincide con un 13% de  $\alpha$ -hélice y un 33% de  $\beta$ -lámina, la de la muestra expuesta al aire (incluidos ambos  $\beta$ -ZmFH-1 y los

monómeros  $\beta$ -ZmFH-2 alcanzan 40% de cadena  $\beta$  y disminuyen a 6% de  $\alpha$ -hélice (Fig. 6 D). El aumento de cadena  $\beta$  en una proteína conduce a una mayor exposición de su estructura. Tanto el progreso de la fluorescencia como el de los espectros de CD, junto con la invariabilidad de los espectros ESI-MS que acompañan estos cambios espectroscópicos, desde la muestra fresca a la aireada, sugieren la existencia de un cambio conformacional a partir de un monómero  $\alpha$ -ZmFH-2 a un monómero  $\beta$ -ZmFH-2, con una estructura más abierta. Esto también está respaldado por las características estructurales del modelo 3D, con la corta extensión C-terminal que produce baja estabilidad termodinámica al ensamblaje <sup>26</sup>.



**Fig. 6: Efecto de la exposición al aire en frataxinas de maíz.** (A) Geles de PAGE nativa de muestras de ZmFH expuestas al aire libre. Los carriles 1 y 3 son proteínas ZmFH-1 y ZmFH-2 recientemente purificadas. Los carriles 2 y 4 son las proteínas después de 1 día de exposición a 37 °C al aire libre. (B) Análisis ESI-MS de ZmFH-2 antes y después de la exposición al aire libre. (C) Autofluorescencia y (D) dicroísmo circular de muestras de ZmFH-2 antes y después de 24 h de exposición al aire libre. La tabla insertada muestra el porcentaje de los elementos de la estructura secundaria en cada caso. (E)

Modelo 3D de ZmFH-2 que muestra la orientación de la cadena lateral de sus tres residuos Trp.

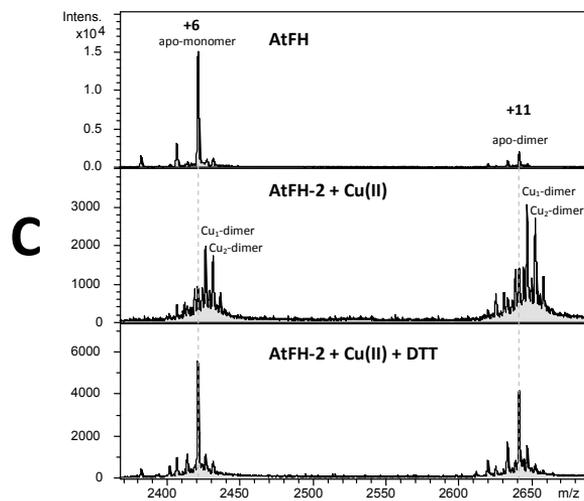
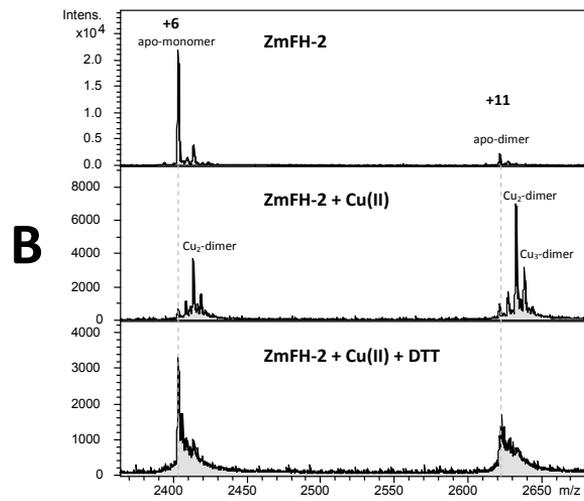
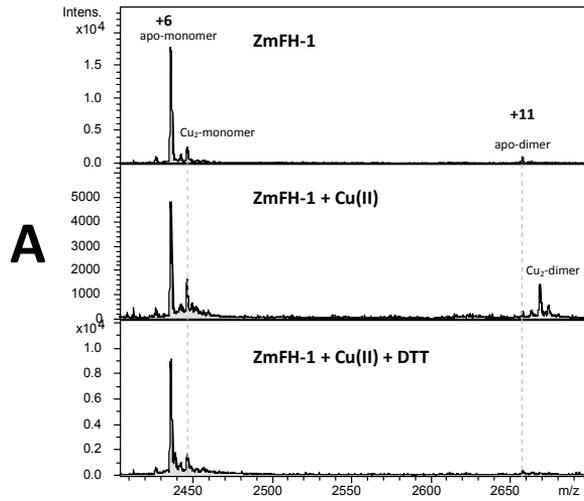
### *Efecto del Cobre en la conformación y agregación de ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH*

Como ya se ha descrito anteriormente, se sintetizaron las frataxinas recombinantes ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH (monómeros), y se mantuvieron alejadas de  $O_2$  para evitar cambios conformacionales. Las proteínas se trataron con un ligero exceso de Cu (II) (ver experimental) para evaluar sus tendencias a formar dímeros mediante puentes disulfuro por oxidación de sus residuos de cisteína. Las mezclas de proteína y Cu (II) se analizaron mediante ESI-MS (Fig. 7).

Después de la adición de Cu (II) a ZmFH-2, aparece una especie dimérica principal de 28.830 Da junto con una pequeña fracción del monómero sin reaccionar con un MW de 14.416 Da (Fig. 7 B). No se detectaron complejos monoméricos de Cu-ZmFH-2, pero las especies dímeras de Cu-(ZmFH-2)<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub>-(ZmFH-2)<sub>2</sub> y Cu<sub>3</sub>-(ZmFH-2)<sub>2</sub> fueron las principales especies detectadas (Fig. 7 B). Curiosamente, la adición de un reductor químico tal como DTT hace que las señales del dímero de cobre prácticamente desaparezcan mientras que el apomonómero da como resultado un pico principal con algunos picos no resueltos probablemente debido a pequeñas cantidades de especies de Cu.

El comportamiento de ZmFH-1 hacia Cu (II) es diferente al de ZmFH-2. Después de incubar ZmFH-1 con Cu (II), los picos de masas en el espectro ESI-MS (Fig. 7 A) correspondientes al ZmFH-

1-dímero son claramente menores en comparación con los encontrados para ZmFH-2 (Fig. 7 B). La adición de DTT a la mezcla de ZmFH-1 y Cu (II) dio como resultado un único pico correspondiente a la forma monómero (Fig. 7 A). Por el contrario, la adición de Cu (II) a AtFH produce varias formas de AtFH-dímero. Los dímeros Cu-(AtFH)<sub>2</sub> y Cu<sub>2</sub>-(AtFH)<sub>2</sub> cargados con cobre representan las señales predominantes, aunque también se puede detectar una especie apo-dimérica menor (Fig. 7 C). Dado que la adición de DTT da como resultado la aparición de señales apo-monoméricas y apo-diméricas de intensidad similar, podemos concluir que la conversión de dímeros a monómeros no es completa en AtFH (Fig. 7 C).

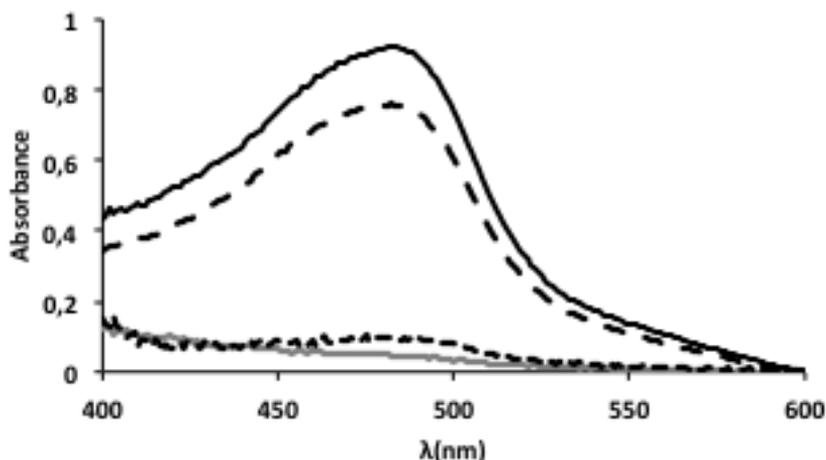


**Fig. 7: Espectros de ESI-MS de frataxinas de plantas.** Los espectros de masas de las frataxinas de plantas ZmFH-1 (A), ZmFH-2 (B) y AtFH (C) antes y después de la adición de Cu (II), y después de la adición de DTT. Todos los espectros muestran el estado de carga +6 para la forma monomérica y el estado de carga +11 para la especie dimérica. Se observa que cuando las formas diméricas son la especie principal, la especie Cu-dímero también se puede observar en el estado de carga +12 (alrededor de 2420 m/z), que coincide y se superpone con la especie menor de monómero de Cu.

Estos hallazgos sugieren que las tres frataxinas de plantas estudiadas, ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH, forman dímeros por puente disulfuro a través de la oxidación de cisteína por Cu (II) aunque con diferente extensión. Mientras que el monómero de ZmFH-1 parece resistir la oxidación para formar el dímero, el dímero de AtFH resiste la reducción para formar el monómero. ZmFH-2 exhibe un comportamiento intermedio. Para confirmar la existencia de una reacción *redox* entre las frataxinas de planta y el Cu (II), realizamos un estudio espectrofotométrico sobre las mezclas de las proteínas y Cu (II), utilizando BCS (sal disódica del ácido bathocuproinedisulfónico) como un sensor de Cu (I). El complejo  $[Cu^I(BCS)_2]^+$  se formaría como resultado de la reducción de Cu (II) por la frataxina y se podría detectar monitorizando su absorbancia UV-Vis a 480 nm.

Las soluciones de las proteínas frataxina se mezclaron con BCS, se desgasificaron y se saturaron con argón. Se agregaron varios equivalentes de Cu (II). La figura 8 muestra los espectros UV-Vis registrados 5 minutos después de la adición de Cu (II) a cada frataxina. Las cantidades de Cu (I) generadas por ZmFH-2 y AtFH

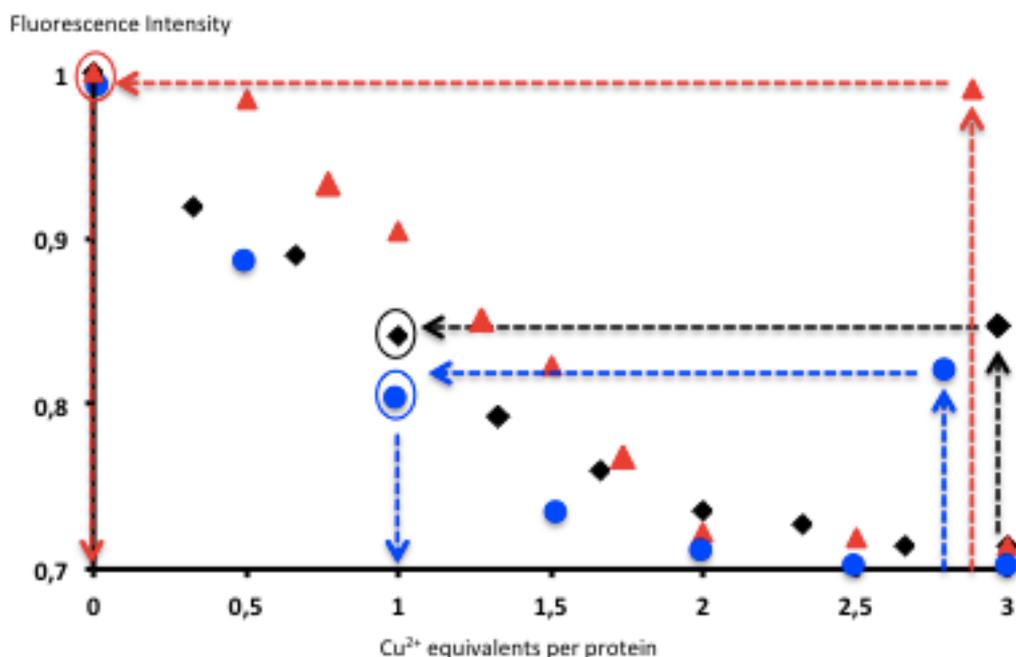
son significativamente mayores que las de ZmFH-1. En base a la concentración inicial de frataxinas, se puede concluir que mientras que ZmFH-2 y AtFH reducen Cu (II) en cantidades equimolares, ZmFH-1 apenas alcanza un 10% de reducción de Cu (II). Estos valores indican que Cu (II) apenas oxida ZmFH-1. Esta frataxina, a diferencia de ZmFH-2 y AtFH, es menos propensa a la oxidación de Cu (II), de acuerdo con los resultados anteriores de ESI-MS.



**Fig. 8:** Espectros de UV-Vis de complejos de  $[Cu^I(BCS)_2]^+$  generados después de incubar las frataxinas de la planta con cobre. Espectros UV-Vis de las mezclas de ZmFH-1 (línea de puntos), ZmFH-2 (línea continua negra) y AtFH (línea discontinua) con BCS después de 5 min de adición de Cu (II). La línea continua gris es el control: solución de Cu (II) con BCS en ausencia de frataxinas.

Además, los espectros de emisión de fluorescencia después de la excitación a 295 nm se recogieron después de cada adición de Cu (II). Los espectros iniciales exhibieron máximos a 350 nm correspondientes a la autofluorescencia de frataxina, que

disminuyó continuamente con adiciones de Cu (II) (Fig. 9). La disminución de esta emisión de fluorescencia puede ser causada por: (i) oxidación y dimerización de frataxina por Cu (II) o (ii) unión de Cu (II) a frataxina, lo que disminuiría la fluorescencia de la proteína, o ambos procesos simultáneamente.



**Fig. 9: Monitoreo de la fluorescencia de frataxinas en presencia de cobre.** Emisión de fluorescencia a 350 nm (excitación a 295 nm) tras la adición de Cu (II) a las frataxinas de plantas ZmFH-2 (negro), ZmFH-1 (rojo) y AtFH (azul). Las flechas discontinuas indican los valores de fluorescencia obtenidos después de la adición de un exceso de DAHK. Para ZmFH-2 (negro) y AtFH (azul), la fluorescencia recupera valores cercanos a los obtenidos después de la adición de 1 equivalente de Cu (II) por monómero de frataxina. Para ZmFH-1 (rojo), la fluorescencia vuelve al valor inicial (antes de la adición de Cu (II)).

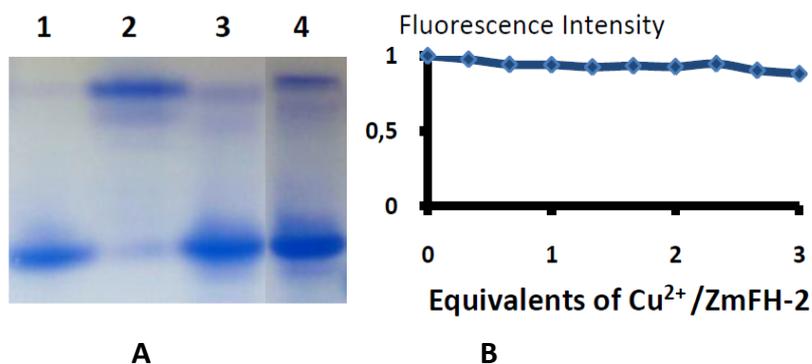
El péptido Asp-Ala-His-Lys (DAHK), un conocido quelante de Cu (II) <sup>33</sup>, se añadió en un exceso (2:1 con respecto al cobre) a las mezclas finales de frataxina y Cu (II) (3 equivalentes/proteína). DAHK une Cu (II) libre o débilmente unido a otra especie química. Por lo tanto, los valores de fluorescencia obtenidos después de la adición de DAHK revelan las interacciones entre frataxina y Cu (II). La emisión de fluorescencia tras la adición de DAHK difería dependiendo de la frataxina. La emisión de fluorescencia de ZmFH-1 disminuyó cuando se añadió Cu (II), pero volvió al valor inicial después de la adición de DAHK (Fig. 9, flecha roja discontinua). Las emisiones de fluorescencia de ZmFH-2 y AtFH también disminuyeron cuando se agregó Cu (II). Sin embargo, la adición de DAHK a ZmFH-2 y AtFH dio como resultado valores de emisión de fluorescencia correspondientes a los obtenidos después de la adición de un equivalente de Cu (II) por proteína, no los valores iniciales antes de las adiciones de Cu (II) (Fig. 9, flechas discontinuas negras y azules).

Los resultados de la medición de fluorescencia coinciden con los obtenidos por ESI-MS y espectroscopia UV-Vis. La adición de Cu (II) a ZmFH-2 o AtFH produce una disminución en la fluorescencia de la proteína debido a sus conversiones, primero en dímeros y luego en complejos de cobre. La adición de DAHK elimina el Cu (II) unido que conduce a formas diméricas sin cobre de frataxina. Por lo tanto, los valores de fluorescencia obtenidos después de la adición de DAHK coinciden con los correspondientes a la adición de la cantidad estequiométrica de Cu (II) requerida para la oxidación/dimerización de ZmFH-2 o frataxinas AtFH (Fig. 9,

flecha y líneas discontinuas azules). En contraste, la fluorescencia de ZmFH-1 disminuye principalmente debido a múltiples iones de cobre que se unen al monómero. Después de la adición de DAHK, estos iones Cu (II) se eliminan dando como resultado el monómero de frataxina libre de cobre.

El experimento de fluorescencia descrito también ilustra que las afinidades por Cu (II) de estas frataxinas no son más altas, en formas monoméricas o diméricas, que las de DAHK ( $2.6 \cdot 10^{14}$  M)<sup>33</sup>, ya que DAHK restablece la emisión de fluorescencia a los valores correspondientes de las formas sin cobre.

En frataxinas de plantas, la dimerización tiene lugar a través de la oxidación de sus residuos de Cys. Las tres frataxinas se marcaron con 2-yodoacetamida, un reactivo comúnmente usado para bloquear el tiol de la cisteína mediante alquilación de este<sup>34</sup>, evitando así la formación de enlaces disulfuro. Efectivamente, las frataxinas marcadas resultantes apenas produjeron dímeros después de la adición de Cu (II). La PAGE nativa (Fig. 10 A) muestra cómo la adición de Cu (II) al derivado de yodoacetamida de ZmFH-2 no modifica significativamente su patrón de electroforesis. Del mismo modo, su fluorescencia no varía significativamente después de la adición paso a paso de Cu (II). Estos resultados concuerdan con la falta de formación de un dímero por puente disulfuro (Fig. 10 B).

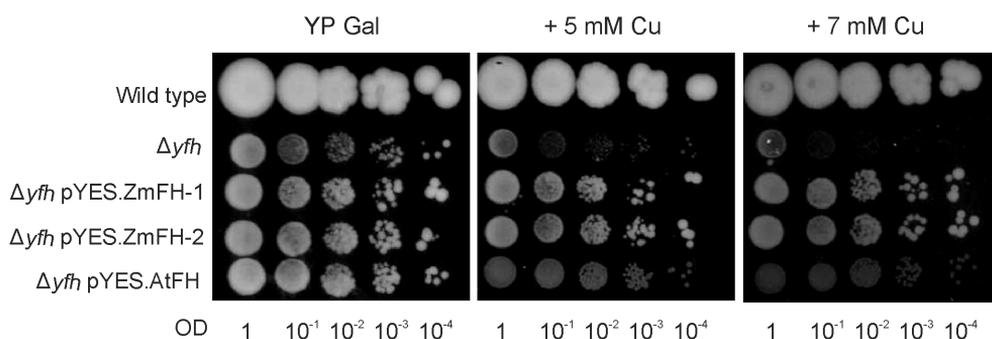


**Fig. 10: Frataxinas y frataxinas marcadas.** (A) Electroforesis nativa de ZmFH-2 antes y una vez marcada con yodoacetamida. El carril 1 es ZmFH-2; El carril 2 es ZmFH-2 después de la adición de Cu (II); El carril 3 es ZmFH-2 después del marcaje con yodoacetamida y el carril 4 es la adición de Cu (II) a la frataxina marcada. La presencia de algún dímero en el carril 4 es notable probablemente debido al hecho de que el marcaje de yodoacetamida no estaba completo. Sin embargo, vale la pena notar la fuerte diferencia entre el carril 2 y el carril 4, especialmente a nivel del monómero, así como la similitud entre el carril 3 y el carril 4. (B) Emisión relativa de fluorescencia a 350 nm (excitación a 295 nm) tras las adiciones de Cu (II) a ZmFH-2 una vez bloqueada con yodoacetamida.

#### *Complementación de Saccharomyces cerevisiae (Cu (II))*

Con el objetivo de profundizar en la influencia biológica de las frataxinas vegetales sobre el metabolismo del cobre, se realizó un experimento de rescate de fenotipo en una cepa de levadura *knockout* de frataxina para estudiar la capacidad de ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH de restaurar el fenotipo de crecimiento normal con altas concentraciones de Cu. Por lo tanto, las células de tipo silvestre y  $\Delta yfh1$  solas o complementadas con cada isoforma se cultivaron en medio completo de YP-galactosa, suplementado con o sin un exceso de CuSO<sub>4</sub>. Como se describió anteriormente, el

mutante nulo mostró un menor crecimiento y una mayor sensibilidad al Cu que las células de tipo silvestre. Por el contrario, las células de levadura transformadas mostraron una resistencia incrementada al Cu con respecto a la cepa de levadura *knockout* de frataxina (Fig. 11). Las células que expresan ZmFH-1 y ZmFH-2 crecieron hasta la quinta dilución después del tratamiento con metales. Las células que expresan AtFH también crecieron hasta la quinta dilución, pero con menos vigor. Por lo tanto, las isoformas de ZmFH son más efectivas que AtFH en la restauración del fenotipo. Como las frataxinas vegetales son capaces de complementar una cepa nula de la levadura, la frataxina parece estar involucrada en el metabolismo del Cu, una función posiblemente conservada a través de la evolución.



**Fig. 11. Complementación de la deficiencia de YFH1 por frataxinas de plantas.** La sensibilidad de *S. cerevisiae* DY150,  $\Delta yfh1$  y  $\Delta yfh1$  transformada con pYES.ZmFH-1, pYES.ZmFH-2 y pYES.AtFH. Se evaluaron todas las células en condiciones de exceso de cobre. 3  $\mu$ L de cada dilución seriada de 1/10, se inocularon en medio YP-Galactosa al 2% (p/v) complementado o no con las cantidades indicadas de  $\text{CuSO}_4$ . Las fotografías se tomaron después de 4 días de crecimiento a 30 °C.

### 4.3. Conclusiones.

Este es el primer estudio de una planta que alberga dos isoformas de frataxina codificadas en su genoma. Ambas proteínas tienen una identidad de secuencia elevada y una estructura similar con respecto a otros homólogos de frataxina como AtFH o HuFH.

*ZmFH-1* y *ZmFH-2* son genes funcionales, expresados en todos los tejidos de maíz estudiados. Como se publicó recientemente para la planta *A. thaliana*<sup>16</sup>, las dos isoformas de frataxina de *Zea mays* se encuentran colocalizadas en mitocondrias y cloroplastos. Los cloroplastos contienen una maquinaria de tipo SUF para la síntesis de sus proteínas Fe-S. Este sistema es similar al ISC encontrado en las mitocondrias, teniendo ambos sistemas proteínas homólogas<sup>35,36</sup>. Es posible que las frataxinas vegetales desempeñen papeles similares en los dos orgánulos, ya sea como donantes de hierro, modulando la actividad de los sistemas ISC y SUF que regulan la actividad de las proteínas involucradas en las vías o en una nueva función por descubrir.

Ya se habían llevado a cabo estudios de agregación y conformacionales de frataxinas obtenidas por síntesis heteróloga de *E. coli* de levaduras, bacterias y homólogos de frataxina humana, pero nunca para homólogos de frataxinas de plantas. Las producciones recombinantes tanto de *ZmFH-1* como de *ZmFH-2* a pequeña escala siempre producen apo-monómeros, con presencia reducida de los dímeros correspondientes. Sin embargo, la síntesis de estas frataxinas en una escala de fermentación proporciona dos grupos de proteínas, una de alto peso molecular (HMW) y otra que

contiene un monómero apo con las mismas características que el obtenido por cultivos Erlenmeyer. Los agregados HMW no son detectables por ESI-MS, pero se ven claramente por PAGE nativa, acompañados por trazas de hexámeros y tetrámeros. La exposición de los monómeros ZmFH-1 y ZmFH-2 (los denominados monómeros  $\alpha$ ) a la aerobiosis durante 24 h causa un cambio conformacional a un estado parcialmente desplegado (el llamado monómero  $\beta$ ). Esto se muestra por PAGE, CD y fluorescencia, y está apoyado también por las características C-terminales de los modelos de homología 3D.

Además, la química del cobre de frataxinas de plantas ha sido abordada por primera vez. ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH presentan un equilibrio monómero-dímero *redox*, aunque la inclinación a la interconversión es diferente para cada proteína. Cu (II) oxida fácilmente a ZmFH-2 transformándola en dímero, el cual se reduce fácilmente de forma química para dar el monómero de partida. Sin embargo, ZmFH-1 es poco propensa a oxidarse y existe principalmente en su forma monomérica. AtFH por contra resiste la reducción del dímero al monómero.

Estas notables diferencias en la química *redox* de las frataxinas vegetales, a pesar de sus secuencias de aminoácidos similares, pueden explicarse en términos de la accesibilidad del residuo Cys en cada proteína. El grupo tiol libre de ZmFH-1 puede estar enterrado en el interior de la proteína y no está expuesto a oxidantes como ocurre con otras proteínas<sup>37</sup>.

Por el contrario, los residuos de Cys de ZmFH-2 y AtFH son accesibles y, por lo tanto, se oxidan fácilmente para formar

dímeros por puente disulfuro. Estos dímeros se pueden reducir reversiblemente a sus respectivos monómeros en diferentes grados. Este tipo de química *redox* no había sido reportado para frataxinas y describe un nuevo esquema plausible para comprender la función de la frataxina en plantas. Además, hemos puesto de manifiesto la participación de las frataxinas en el metabolismo general del cobre aunque estos resultados requieren mayor investigación.

### 4.4. Materiales y métodos.

*Plantas, levaduras y cepas bacterianas.*

Las plantas usadas en este estudio fueron *Arabidopsis thaliana* var. Columbia Col-0 y *Zea mays* B73, las cuales crecieron en un invernadero a 22 °C con 16 h luz/8 h oscuridad. Se usó la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para experimentos de inmersión floral. *Saccharomyces cerevisiae* DY150 (MATa, ura3-52, leu2- 3,112, trp1-1, his3-11, ade2-1, can1-100(oc)) y la isogénica *Δyfh::his3 null mutant*<sup>28</sup> (amablemente proporcionada por el Dr. Jerry Kaplan, Utah State University) se usaron para los ensayos de complementación.

Las cepas *Escherichia coli* DH5a (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 F80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) y BL21 (DE3) (*E. coli* B Fe dcm ompT hsdS(rBemBe) gal l (DE3) se usaron como huéspedes bacterianos en los experimentos de clonación y expresión, respectivamente.

*Modelado molecular de frataxinas de maíz*

El modelado de homología se realizó utilizando el servidor @TOME2 (<http://atome1.cbs.cnrs.fr/AT2B/meta.html>)<sup>38</sup>. Los modelos estructurales tridimensionales obtenidos se evaluaron con el programa de análisis de estructura web ProSA<sup>39,40</sup> y Verify-3D<sup>41</sup>. La superposición de estructuras de proteínas se realizó utilizando el servidor SuperPose v 1.0 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/>)<sup>42</sup>.

### *Transformación de plantas, aislamiento de protoplastos y microscopía confocal de fluorescencia*

*ZmFH-1* (codones 1-83) y *ZmFH-2* (codones 1-78) secuencias que contienen la secuencia que codifica los péptidos de tránsito predichos con Mitoprot<sup>43</sup> y ChlroP<sup>44</sup> se clonaron en el plásmido pZP212 fusionado a la secuencia de GFP (proteína fluorescente verde) en el extremo 3'. La expresión de ambos transcritos está bajo el control del promotor CaMV35S. Las construcciones de plásmidos pZP212 se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* para transformar plantas de *A. thaliana* por el método de inmersión floral<sup>45</sup>. Se seleccionaron líneas transgénicas en medio de agar MS con 50 mg/mL de kanamicina durante 15 días, se transfirieron a tierra y se cultivaron a 22 °C en un invernadero en condiciones de día largo (16 h día/8 h noche). Las plantas transformadas se confirmaron mediante PCR.

El aislamiento de los protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* se realizó como se describe por Sang-Dong Yoo *et al.*<sup>46</sup>. Se cortaron tiras en la parte media de la hoja. Aproximadamente 20 hojas fueron digeridas en 10 mL de solución enzimática (20 mM MES

## CAPÍTULO 4

---

(pH 5.7), 1.5% (p/v) de celulosa R10, 0.4% (p/v) de macerozima R10, 0.4 M de manitol, 20 mM de KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, BSA al 0,1% (p/v)) a 22 °C durante 12 h con agitación suave al final del tratamiento. La suspensión se filtró y los protoplastos se recogieron por centrifugación a 150 x g durante 5 min, seguido de tres lavados con solución de WI (*washing & incubation*, 4 mM MES pH 5.7, 0.5 M manitol y 20 mM KCl). Los protoplastos se incubaron con colorante de fluorescencia *Orange MitoTracker* 1 μM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 30 minutos en la oscuridad.

Las señales de fluorescencia se analizaron usando un microscopio confocal invertido Nikon Modelo Eclipse TE-2000-E2, con un objetivo 60X. La excitación se realizó a 488 nm y 543 nm para GFP y *MitoTracker*, respectivamente. Para la emisión de fluorescencia, el detector espectral se estableció entre 515 y 530 nm para GFP, entre 585 y 640 nm para *MitoTracker* y a 665 nm para la autofluorescencia de clorofila.

Los protoplastos de plantas de tipo silvestre cultivadas bajo las mismas condiciones se usaron como controles para la fluorescencia de clorofila de fondo.

Además, se usaron células de *A. tumefaciens* transformadas para la infiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana*. El cultivo de *Agrobacterium* recombinante se cultivó durante la noche a 28 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron para alcanzar una concentración correspondiente a una densidad óptica de 0.8 a 600 nmin, una solución de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM pH 5.7 y acetosiringona 100 μM.

Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h y luego se infiltraron las hojas de *N. benthamiana*. Después de una semana, las hojas se analizaron mediante microscopía confocal, como se describió anteriormente.

### *Ensayos de complementación funcional de levadura*

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* silvestres (DY150) y una cepa isogénica frataxina *knockout* ( $\Delta yfh1::His3$ ) se utilizaron para la complementación con constructos quiméricos clonados en el sistema de vector pYES3CT (Invitrogen). Estas construcciones contienen el péptido de tránsito de la subunidad IV (COXIV) de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae* fusionado a las secuencias codificantes de las proteínas ZmFH-1 o ZmFH-2 maduras (codones 70-199 y 74-201, respectivamente). Las células transformadas se seleccionaron en medio sintético sin triptófano con glucosa como fuente de carbono.

Las levaduras transformadas se cultivaron en YP-rafinosa al 2% (p/v) y la expresión de la proteína se indujo con galactosa al 2% (p/v). Para evaluar la sensibilidad de estas células al daño oxidativo, se trataron alícuotas de cultivo de levadura con una  $OD_{600} = 1$  con  $H_2O_2$  2 mM durante 1 h con agitación. Las diluciones en serie de estas células se inocularon en medio YP-galactosa y se incubaron a 30 °C durante 3-4 días.

Para evaluar la sensibilidad de estas células al cobre, se detectaron diluciones en serie de estas células en medio YP-galactosa suplementado o no con diferente cantidad de  $CuSO_4$  (5-7 mM) y se cultivaron durante 4 días a 30°C.

### *Clonación, expresión y purificación de frataxinas recombinantes*

Ambas frataxinas de maíz, ZmFH-1 y ZmFH-2 se amplificaron sin sus péptidos de tránsito mediante PCR convencional (codones 70-199 y 74-201, respectivamente), usando cDNA de hojas de maíz y los cebadores *BamHI*-ZmFH1F, 2F y *XhoI*-ZmFH1R, 2R.

La amplificación se realizó con DNA polimerasa Taq (Invitrogen) en las siguientes condiciones: 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 55 °C (alineamiento) y 30 segundos a 72 °C (elongación). Los cebadores utilizados añadieron dianas de restricción 5' *BamHI* y 3' *XhoI* añadidos a las regiones codificantes de ZmFH, para la clonación en el vector de expresión pGEX-4T1 (GE Healthcare bio-Sciences, Uppsala, Suecia), aguas abajo de la glutatión-S-transferasa (GST) en el marco abierto lectura para generar plásmidos pGEX-ZmFH-1 y pGEX-ZmFH-2. La ausencia de mutaciones se confirmó por secuenciación de ADN. Cada plásmido de expresión se usó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3).

Para la expresión de proteínas, las células de *E. coli* se cultivaron en medio LB con 100 mg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. La síntesis de la proteína GST-ZmFH se indujo con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. Después de 3 h de inducción a 37 °C, las células se recogieron por centrifugación. Para la purificación de proteínas, las células se resuspendieron en PBS enfriado con hielo (NaCl 1.2 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM), se rompieron por sonicación y se centrifugaron a 10000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante

recuperado se usó para purificar los polipéptidos GST-ZmFH por cromatografía de afinidad discontinua con glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare) incubando la mezcla con agitación suave durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Después de tres lavados con PBS y, dado que las fusiones de GST-ZmFH incluyen un sitio de reconocimiento de trombina, se añadió esta proteasa (10 µg por mg de proteína fusionada) y se llevó a cabo la digestión durante toda la noche a 20 °C. Esto permitió la separación del fragmento de GST, que permaneció unido a la resina, de las proteínas ZmFH. Después de concentrar usando Centriprep Microcon 3 (Amicon, Merck, Darmstadt, Alemania), las proteínas se purificaron finalmente a través de FPLC, en una columna Superdex 75 de filtración en gel (GE Healthcare) equilibrada con 50 mM de Tris-HCl, pH 7.0. Las proteínas purificadas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

### *Análisis electroforéticos de frataxinas recombinantes y de las mezclas con cobre*

Las proteínas purificadas se analizaron en un 15% (p/v) de PAGE <sup>47</sup>, ya sea con SDS (concentración final de 0.1% (p/v), geles desnaturizantes) o sin SDS (geles nativos). Además, las muestras se analizaron tanto en tampón normal como en tampón reductor (es decir, con una concentración final de DTT 100 mM). La concentración de proteína total se determinó según lo descrito por Bradford <sup>48</sup>.

*Muestras de cobre.* ZmFH-2, ZmFH-1, AtFH (45  $\mu$ M) se incubaron en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 durante 30 minutos con 2 equivalentes de Cu (II) (como  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en atmósfera de nitrógeno. Se tomó una alícuota para posteriormente ser analizada por ESI-MS. La mezcla resultante se trató con DTT 1 mM durante 1 hora y luego se analizó de nuevo mediante ESI-MS. Estas muestras se analizaron en un 14% (p/v) de PAGE nativo.

### *ESI-MS de frataxinas recombinantes y de las mezclas con cobre*

Las determinaciones de la masa molecular se realizaron mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-TOF-MS). El equipo utilizado fue un instrumento Micro TOF-Q (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) interconectado con una bomba Agilent Series 1200 HPLC, ambos controlados mediante el *software* Compass. La calibración se logró con ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Todas las muestras se analizaron bajo las siguientes condiciones: 20  $\mu$ L de solución de proteína inyectada a 40  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ ; el voltaje del contraelectrodo capilar era de 5 kV; temperatura de desolvatación de aproximadamente 90-110  $^{\circ}\text{C}$ . El tampón transportador era una mezcla 5:95 de acetonitrilo:acetato de amonio/amoníaco (15 mM, pH 7.0). Todos los espectros se registraron al menos 3 veces para garantizar la reproducibilidad de los experimentos. En todos los casos, los espectros fueron perfectamente coincidentes entre los diferentes experimentos.

### *Estudios espectroscópicos*

Los espectros de fluorescencia se registraron en un Varian Cary Eclipse, en un rango de emisión de 305-450 nm, excitando las muestras a 295 nm. Las muestras de frataxina se prepararon diluyendo las proteínas madre a 3  $\mu\text{M}$  con agua Milli-Q a pH 7. Las valoraciones con Cu (II) se realizaron en tampón Tris 20 mM pH 7.4 a una concentración de proteína de 3  $\mu\text{M}$ . Los espectros de emisión fluorescente (autofluorescencia de proteínas) se tomaron entonces y tras adiciones sucesivas de 1  $\mu\text{L}$  de Cu (II) (1 mM) hasta que se alcanzó una relación Cu (II)/proteína de 3. Los espectros de emisión de fluorescencia se recogieron después de cada adición. Finalmente, se añadió un doble exceso de DAHK (con respecto al cobre) a cada muestra tratada con cobre y se recogieron los espectros de emisión de fluorescencia.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) de las muestras de frataxina se registraron usando un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con un soporte de celda controlado por Peltier. Los espectros se registraron a 37 °C, utilizando una celda de cuarzo de precisión de 2 mm de longitud, de 190 a 250 nm con un ancho de banda de 1 nm y una velocidad de exploración de 100 nm/min. Las muestras de frataxina se prepararon diluyendo las proteínas madre a 0.5  $\mu\text{M}$  con agua Milli-Q a pH 7. Los espectros se promediaron en 5 escaneos y se suavizaron con Spectra Analysis (*software* espectropolarímetro). Los contenidos de la estructura secundaria se obtuvieron mediante el procedimiento CONTIN<sup>49</sup> programa modificado por Sreerama *et al.*<sup>50</sup>. La influencia del O<sub>2</sub> en las estructuras de frataxina se estudió mediante el registro de

espectros de fluorescencia y CD en muestras frescas y luego, 24 h después de la incubación a 37 ° C en condiciones aeróbicas.

Los espectros de UV-Vis se registraron en un Spectronic Unicam UV300. La sal disódica del ácido bathocuproinedisulfónico (BCS) se usó para detectar el Cu (I) generado por la reducción de Cu (II) por frataxinas. Los experimentos se realizaron con frataxinas (40 µM) en 20 mM de tampón Tris pH 7.4 con un exceso de BCS (200 µM). Las muestras se purgaron con argón y luego, cloruro de cobre (II) (80 µM). Se detectó Cu (I) después de 5 min de reacción mediante espectroscopia UV-Vis. Las absorbancias se recogieron a 480 nm debido a la formación del complejo  $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^+$  ( $\epsilon^{480} = 14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>51</sup>.

### *Etiquetado de frataxinas con 2-yodoacetamida.*

La reacción con yodoacetamida se realizó en tampón fosfato (20 mM, pH 8) con una concentración de frataxina de 45 µM. Se añadió un exceso de 2-yodoacetamida (200 µM) a la frataxina y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37 °C. Finalmente, la mezcla se dializó exhaustivamente contra agua Milli-Q usando un Spectra/Por Float-A-Lyzer con un límite de peso molecular (MWCO) de 8 kDa para eliminar el exceso de yodoacetamida.

### **4.5. Referencias.**

1. Koutnikova, H. *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345–351 (1997).
2. Busi, M. V, Zabaleta, E. J., Araya, A. & Gomez-casati, D. F. Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from Arabidopsis

- thaliana. *FEBS Lett.* **576**, 141–144 (2004).
3. Gakh, O. *et al.* Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 467–479 (2006).
  4. O'Neill, H. A. *et al.* Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* **44**, 537–545 (2005).
  5. Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M. & Isaya, G. The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 38589–38595 (2002).
  6. Busi, M. V. *et al.* Deficiency of Arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J.* **48**, 873–882 (2006).
  7. Vazzola, V., Losa, A., Soave, C. & Murgia, I. Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in Arabidopsis. *FEBS Lett.* **581**, 667–672 (2007).
  8. Maliandi, M. V. *et al.* The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J.* **278**, 470–481 (2011).
  9. Martin, M., Colman, M. J. R., Gómez-Casati, D. F., Lamattina, L. & Zabaleta, E. J. Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient Arabidopsis plants. *FEBS Lett.* **583**, 542–548 (2009).
  10. Busi, M. V. & Gomez-Casati, D. F. Exploring frataxin function. *IUBMB Life* **64**, 56–63 (2012).
  11. Priller, J., Scherzer, C. R., Faber, P. W., MacDonald, M. E. & Young, A. B. Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann. Neurol.* **42**, 265–269 (1997).
  12. Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O. & Isaya, G. Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase: Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J. Biol. Chem.* **275**, 41469–41475 (2000).
  13. Gordon, D. M., Shi, Q., Dancis, A. & Pain, D. Maturation of frataxin within mammalian and yeast mitochondria: One-step processing by matrix processing peptidase. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2255–2262 (1999).
  14. Branda, S. S. *et al.* Yeast and human frataxin are processed to mature

- form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 22763–22769 (1999).
15. Koutnikova, H., Campuzano, V. & Koenig, M. Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1485–1489 (1998).
  16. Turowski, V. R. *et al.* Frataxin is localized to both the chloroplast and mitochondrion and is involved in chloroplast Fe-S protein function in Arabidopsis. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
  17. Murgia, I., Tarantino, D. & Soave, C. Mitochondrial iron metabolism in plants: Frataxin comes into play. *Plant Soil* **325**, 5–14 (2009).
  18. Foury, F. & Cazzalini, O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**, 373–377 (1997).
  19. Koeppen, A. H. *et al.* Friedreich's ataxia causes redistribution of iron, copper, and zinc in the dentate nucleus. *Cerebellum* **11**, 845–860 (2012).
  20. Soriano, S. *et al.* Metal homeostasis regulators suppress FRDA phenotypes in a drosophila model of the disease. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
  21. Han, T. H. L. *et al.* Mechanisms of iron and copper–frataxin interactions. *Metallomics* **9**, 1073–1085 (2017).
  22. Orihuela, R. *et al.* Ferritin and metallothionein: dangerous liaisons. *Chem. Commun.* **47**, 12155 (2011).
  23. Carmona, F. *et al.* Ferritin iron uptake and release in the presence of metals and metalloproteins: Chemical implications in the brain. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2752–2764 (2013).
  24. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.-I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal Structure of Human Frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753–30756 (2000).
  25. Cho, S. J. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8932–7 (2000).
  26. Faraj, S. E., Roman, E. A., Aran, M., Gallo, M. & Santos, J. The alteration of the C-terminal region of human frataxin distorts its structural dynamics

- and function. *FEBS J.* **281**, 3397–3419 (2014).
27. Carrie, C., Giraud, E. & Whelan, J. Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J.* **276**, 1187–1195 (2009).
  28. Babcock, M. *et al.* Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709–1712 (1997).
  29. Bencze, K. Z. *et al.* The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269–291 (2006).
  30. Vivian, J. T. & Callis, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109 (2001).
  31. Leidgens, S., de Smet, S. & Foury, F. Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its  $\beta$ -sheet. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 276–286 (2009).
  32. Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. & Nussinov, R. Protein-protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5772–5777 (2003).
  33. Trapaidze, A., Hureau, C., Bal, W., Winterhalter, M. & Faller, P. Thermodynamic study of Cu 2+ binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 37–47 (2012).
  34. Sechi, S. & Chait, B. T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **70**, 5150–5158 (1998).
  35. Balk, J. & Lobréaux, S. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* **10**, 324–331 (2005).
  36. Balk, J. & Pilon, M. Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.* **16**, 218–226 (2011).
  37. Carmona, F. *et al.* Chemically and biologically harmless versus harmful ferritin/ copper-metallothionein couples. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 808–813 (2015).
  38. Pons, J. L. & Labesse, G. @TOME-2: A new pipeline for comparative

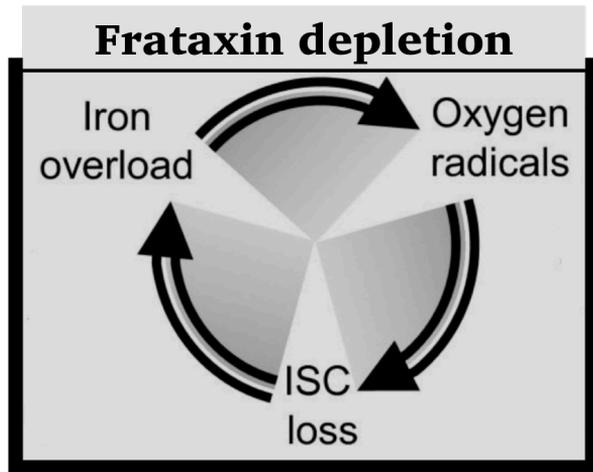
- modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res.* **37**, 485–491 (2009).
39. Sippl, M. J. Recognition of Errors in Three Dimensional Structures of Proteins. *PROTEINS Struct. Funct. Genet.* **17**, 357–362 (1993).
  40. Wiederstein, M. & Sippl, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, 407–410 (2007).
  41. Lüthy, R., Bowie, J. U. & Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**, 83–85 (1992).
  42. Maiti, R., Van Domselaar, G. H., Zhang, H. & Wishart, D. S. SuperPose: A simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.* **32**, 590–594 (2004).
  43. Claros, M. G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786 (1996).
  44. Emanuelsson, O., Nielsen, H. & Heijne, G. Von. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**, 978–984 (1999).
  45. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
  46. Yoo, S. D., Cho, Y. H. & Sheen, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 1565–1572 (2007).
  47. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
  48. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
  49. Provencher, S. W. & Glöckner, J. Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry* **20**, 33–37 (1981).

## QUÍMICA REDOX EN FRATAXINAS DE PLANTAS

---

50. Sreerama, N. & Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252–260 (2000).
51. Frederick Smith, G. & Wilkins, D. H. New Colorimetric Reagent Specific for Copper: Determination of Copper in Iron. *Anal. Chem.* **25**, 510–511 (1953).





## **CAPÍTULO 5: ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?**



### 5.1. Introducción.

Dado que la frataxina es una proteína altamente conservada (presenta homólogos en casi todos los organismos conocidos), sería de esperar que tuviese una función común dentro de los diferentes organismos en los que está presente.

Como ya abordamos en la Introducción de esta Tesis, las funciones más ampliamente aceptadas para la frataxina están íntimamente ligadas al metabolismo de Fe en mitocondria. Los resultados existentes se ciñen a frataxinas recombinantes humanas, de levaduras y bacterias, sin embargo, no hay estudios rigurosos y amplios sobre la química del Fe de frataxinas de plantas. En este capítulo presentamos resultados preliminares de la interacción de hierro con la frataxina de *Zea mays*, ZmFH-2.

Nuestro objetivo es establecer un escenario básico en la química del hierro de las frataxinas vegetales como una nueva pieza en el rompecabezas de esta enigmática proteína. En particular nuestro interés es saber si esta proteína es capaz de unir Fe (II) y/o Fe (III), y si esto genera oligomerización, una propiedad, que como se ha comentado, parece estar relacionada con la función de esta proteína.

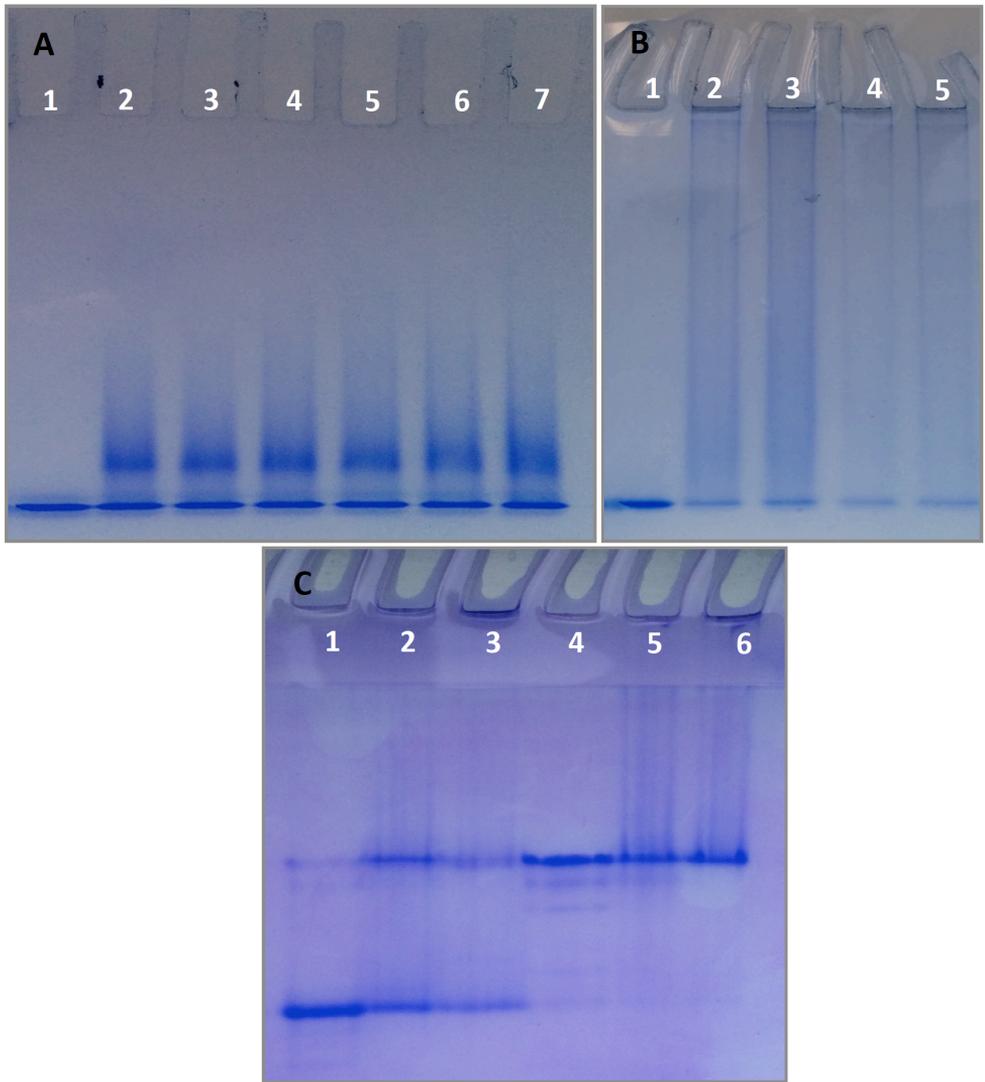
### 5.2. Resultados y discusión.

En primer lugar se utilizó la electroforesis nativa para comprobar la capacidad del hierro para ensamblar frataxinas de planta. La frataxina (ZmFH-2) fue incubada con cantidades crecientes de Fe (II) y Fe (III) en condiciones aeróbicas.

Cuando se incubó Fe (II)/Fe (III) en estequiometrias 6, 12 y 18 con respecto a la proteína ZmFH-2, aparecieron en la electroforesis bandas correspondientes a dímeros de la proteína. La adición de mayores cantidades de Fe (II) y Fe (III) (exceso molar de 50-100 veces) (Fig. 1 B), hizo desaparecer la banda del dímero y produjo una banda continua y no resuelta en todo el gel, mientras que parte de la proteína permaneció en los pocillos (precipitada) cuando el gel se corrió. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas con Fe (II) y Fe (III). Estos resultados parecen indicar que las adiciones de pocos iones de hierro por proteína provocan una dimerización parcial, mientras que el efecto de adiciones mayores de hierro provocarían una mezcla de agregados de alto peso molecular.

En una segunda etapa, se evaluó la posibilidad de que la oligomerización se pudiera producir a partir del dímero previamente formado. Para ello se trató ZmFH-2 con 2 Cu (II) por proteína, puesto que como se ha descrito en el capítulo anterior, el Cu (II) produce la formación de un dímero de la proteína mediante puente disulfuro <sup>1</sup>. Una vez formado el dímero (Fig. 1 C, carril 4), se trató con 6 Fe (II) o 6 Fe (III), así como con excesos mayores. El resultado fue el mismo, la aparición de bandas continuas no resueltas en todo el gel. (Fig. 1 C, carriles 5-6).

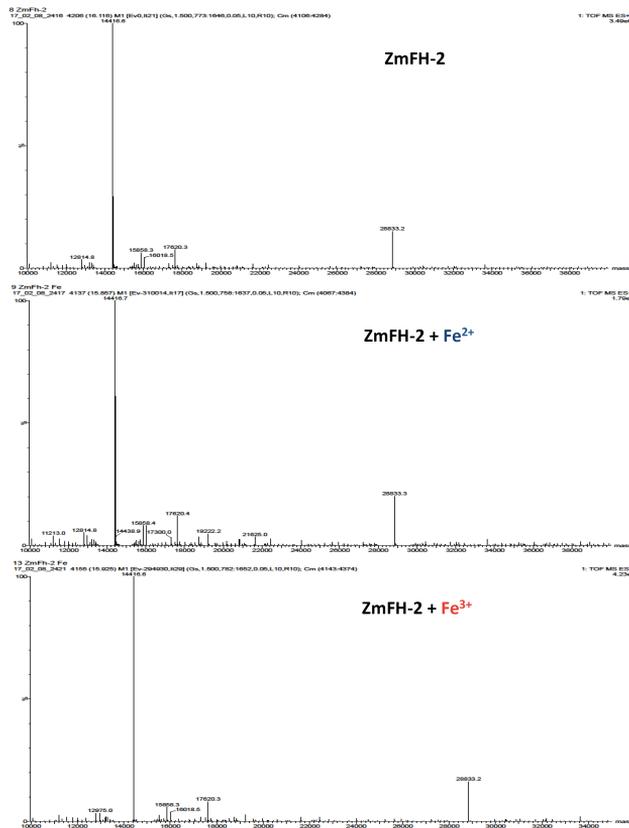
## ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?



**Fig. 1:** Electroforesis nativa comparativa de ZmFH-2 antes y después de la incubación con Fe (II)/Fe (III) durante 6 horas a 37 °C y con diferentes proporciones de Fe/proteína: (A) La línea 1 es ZmFH-2; Los carriles 2-3, 4-5, 6-7 son ZmFH-2 después de la adición de Fe (II)-Fe (III) en 6-, 12 (2 adiciones de 6 Fe ) y 18 veces molares (3 adiciones de 6 Fe). (B) El carril 1 es ZmFH-2, los carriles 2-3, 4-5 son ZmFH-2 después de la adición de Fe (II)-Fe (III) en 50- y 100 veces molar en una sola adición. (C) La calle 1 es ZmFH-2; Los carriles 2-3 son ZmFH-2 después de la adición de 2 eq. de Fe

(II)–Fe (III), el Carril 4 es el dímero ZmFH-2, los Carriles 5-6 son dímeros ZmFH-2 después de la adición de 6 eq. de Fe (II)–Fe (III).

Cuando se estudiaron mediante espectroscopia de masas las disoluciones resultantes de mezclar la frataxina con las diferentes cantidades de hierro, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Fig. 2), se observaron únicamente picos correspondientes al monómero de proteína, con cierta cantidad de dímero. En ningún caso se observaron picos correspondientes a especies oligoméricas de mayor peso molecular. Asimismo, tampoco se observaron especies Fe-proteína.



## ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?

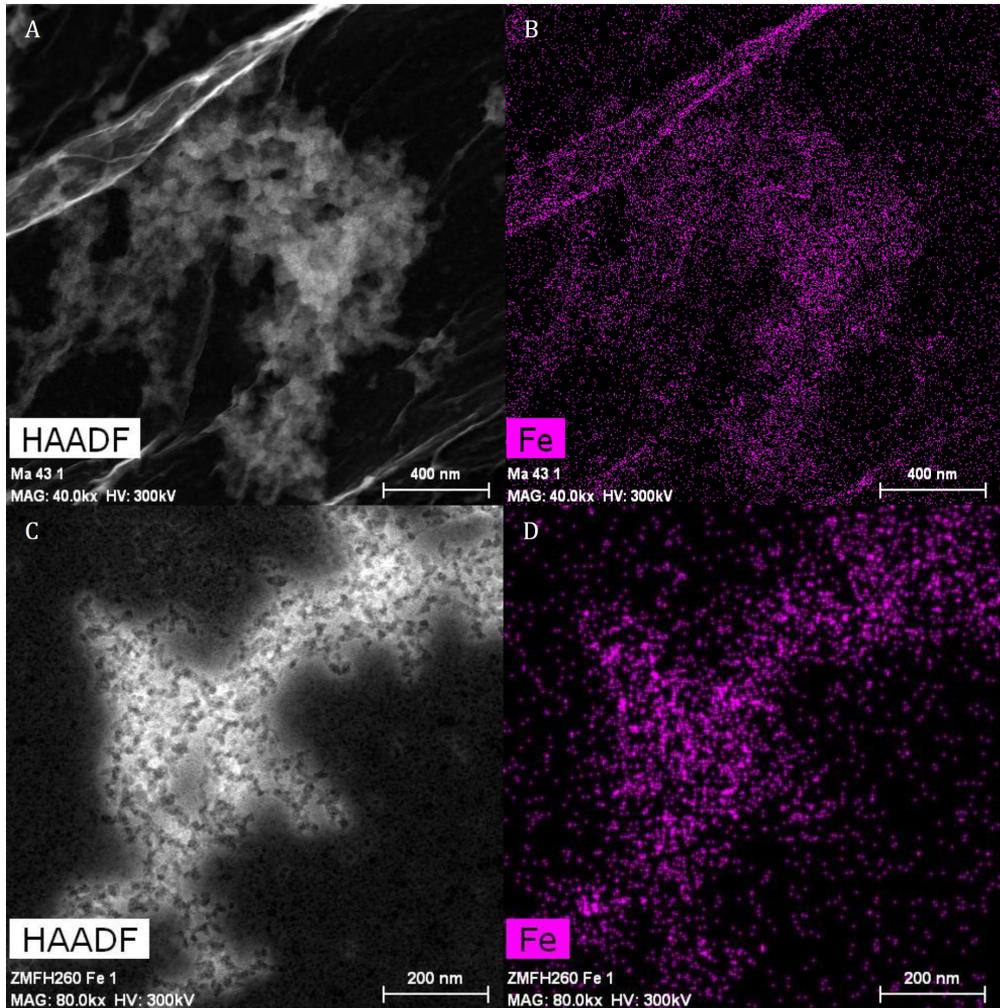
---

**Fig. 2:** HPLC-MS de ZmFH-2, y ZmFH-2 tratada con Fe (II) y Fe (III).

Estos resultados pueden explicarse mediante dos hipótesis: i) las frataxinas de plantas no interactúan con el hierro *in vitro* (en las condiciones experimentales utilizadas) o ii) la espectroscopia de MS no nos permiten ver las especies Fe-proteína, debido a que la interacción entre el hierro y la frataxina serían débiles y reversibles (las muestras no resisten la ionización en MS), o bien que estas especies son de elevado peso molecular y no pueden ser volatizadas y por tanto detectadas mediante esta técnica.

En este sentido, muestras similares de frataxina tratadas con hierro (II y III) vistas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran la presencia de grandes agregados de proteína con hierro acumulado.

La existencia de estos grandes agregados de proteína se visualizaron especialmente bien en modo HAADF-STEM (High-annular dark field microscopy). Como se muestra en la figura 3 (A y C), se forman agregados de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  que contienen partículas esféricas brillantes de tamaños heterogéneos, entre 20-50 nm. Para confirmar la presencia de hierro asociado a la proteína, se realizaron experimentos de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX). La yuxtaposición del hierro (en rosa) y la proteína (Fig. 3 B y D) confirman la presencia de Fe en estos agregados.



**Fig. 3:** Imágenes contrastadas de TEM que muestran la presencia de agregados formados después de la adición de (A-B) 6 eq. de Fe (II) a ZmFH-2 y (C-D) 15 eq. de Fe (III) a ZmFH-2. (A-C) Micrografías HAADF-STEM. (B-D) Los mapas composicionales EDX de Fe (rosa) recogidos sobre las imágenes completas de HAADF-STEM.

Con objeto de conocer si la interacción del Fe con ZmFH-2 conlleva cambios de estado de oxidación de los iones Fe (II)

## ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?

---

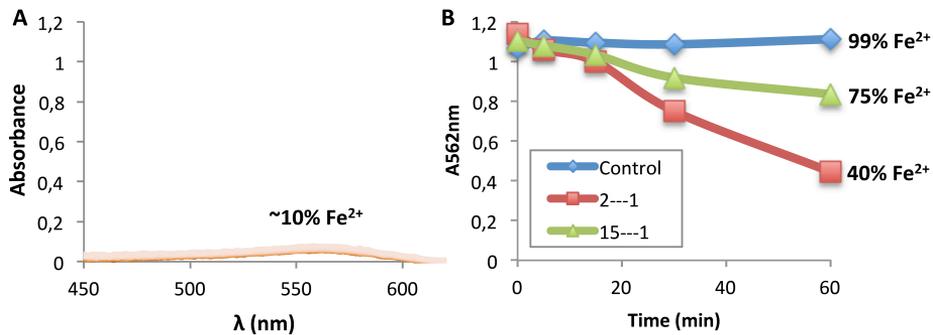
y/o Fe (III), se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopia UV-Vis de las mezclas de proteína con los iones de hierro.

En primer lugar, monitorizamos la concentración de Fe (II) con el tiempo, al incubar la frataxina con una disolución de Fe (II). Controlamos la disminución de Fe (II) disponible en un lote de muestras frescas, que inicialmente contenía Fe (II) y la frataxina en estequiometría 2:1 y 15:1, mediante la adición, a diferentes tiempos de reacción, de un exceso de ferrozina (fz). La ferrozina sirve como un indicador de Fe (II) mediante la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ , que puede ser medida monitorizando la banda típica de este complejo, centrada a 562 nm. Controlar la concentración que se forma de  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ , es decir, registrar la dependencia del tiempo con la absorbancia a 562 nm, permite evaluar la capacidad de la frataxina para oxidar Fe (II) o bien para captarlo: cuanto más rápido sea el proceso de oxidación o de captación de Fe (II) por parte de la proteína, más rápida será la disminución de la absorbancia en UV-Vis a 562 nm. Como se muestra en la figura 4 B, la concentración de Fe (II) libre, disminuye en presencia de ZmFH-2, mientras que la disminución de Fe (II) libre en ausencia de frataxina (control) durante el tiempo del experimento (1h) fue insignificante. Estos resultados indican cierta actividad ferroxidasa de ZmFH-2 o bien cierto grado de complejación de Fe (II), ya que la cantidad de Fe (II) disponible después de 1 hora es solo aproximadamente del

40% del valor inicial, para una estequiometría 2:1 y del 75% para 15:1.

De forma análoga se aplicó un protocolo para medir actividad de ferrirreductasa (actividad catalítica para reducir Fe (III) a Fe (II)). En este caso se basó en el control del aumento de la concentración de Fe (II) con el tiempo en un lote de muestras frescas que inicialmente contenían Fe (III), fz en exceso y ZmFH-2 en una proporción de 4:1.

Como se puede observar en la Figura 4B, la cantidad de Fe (II) formada fue prácticamente despreciable (< 10%). Esto pone de manifiesto que el Fe (III), a diferencia del Cu (II) no oxida a la proteína. O bien, que si lo hace, el Fe (II) queda fuertemente unido a la proteína y no está disponible para ser captado por la ferrozina.



**Fig. 4:** (A) Fe (II) (como  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ ) producido a partir de la reducción de Fe (III) por ZmFH-2. (B) disponibilidad de Fe (II) en presencia de ZmFH-2. Absorbancia a 562 nm de  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$  después de la adición, en diferentes momentos, de fz a la mezcla ZmFH-2 + Fe (II) (datos rojo y verde). La línea azul corresponde al control sin proteína.

## ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?

---

Con objeto de profundizar más en la posible coordinación de frataxina a Fe (II)/Fe (III), se llevaron a cabo valoraciones de espectrofotometría de la auto-fluorescencia de la frataxina, debida a la presencia de triptófanos en su secuencia aminoacídica, excitando a 295 nm y midiendo la emisión de fluorescencia a 350 nm<sup>2</sup>. Las valoraciones se realizaron en condiciones aeróbicas monitorizando la fluorescencia después de las adiciones de Fe (II) y Fe (III) a ZmFH-2.

La emisión de fluorescencia de ZmFH-2 a 350 nm disminuyó continuamente cuando se añadieron Fe (II) y Fe (III) (Fig. 5). Esta extinción de fluorescencia evidencia la existencia de algún tipo de interacción Fe-frataxina.

Con objeto de profundizar en el tipo de interacción, se añadieron a las mezclas proteína-Fe (II) y proteína-Fe (III), un agente quelante de Fe (III), concretamente DFO (desferrioxamina).

Cuando la mezcla de frataxina y Fe (III) se trató con DFO, la emisión de fluorescencia se restauró hasta los valores iniciales de la autofluorescencia de la proteína. Esto pone de manifiesto que la interacción de Fe (III) con la frataxina es débil, puesto que el DFO es capaz de complejarlo por completo y dejar la frataxina libre de ión metálico, recuperando por tanto su emisión de fluorescencia inicial.

Además, estos datos ponen de manifiesto que la frataxina no tiene actividad ferrireductasa. De tenerla, la mezcla Fe (II) y la propia frataxina oxidada no podría recuperar su autofluorescencia tras la adición de DFO.

Sin embargo, cuando se adicionó DFO a las mezclas de frataxinas con Fe (II), la fluorescencia no sólo no volvió a los valores de inicio, sino que permaneció esencialmente sin cambios. Por tanto, el DFO no es capaz de complejar el hierro que ha interactuado con la frataxina

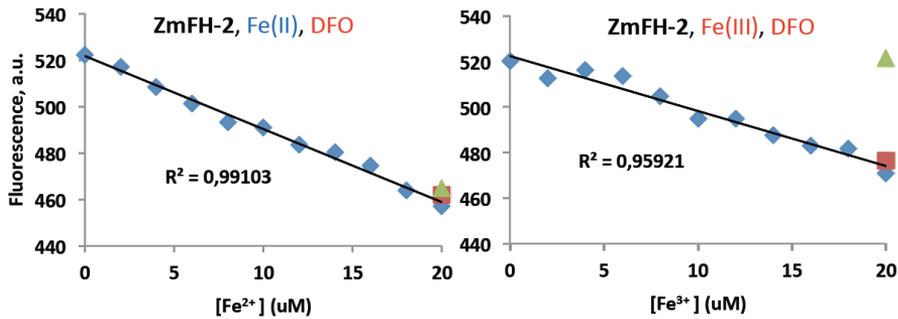


Fig. 5: Emisión de fluorescencia a 350 nm (excitación a 295 nm) tras las adiciones de Fe (II) y Fe (III) a ZmFH-2. La flecha discontinua indica los valores de fluorescencia obtenidos 24 horas después de la adición de un exceso de DFO.

### 5.3. Conclusiones.

La química del hierro de la frataxina ZmFH-2, perteneciente a *Zea Mays*, difiere sustancialmente de la del cobre <sup>1</sup>. El Fe (III) no oxida la proteína como lo hace el Cu (II). Esto quiere decir que el ensamblaje en dímeros con puente disulfuro por oxidación impulsada por cobre no tiene lugar con la incubación con Fe (III). Por lo tanto, los agregados detectados por electroforesis nativa cuando se incubó ZmFH-2 con Fe (II) en presencia de oxígeno o de Fe (III) no son el

resultado de una reacción *redox* entre Fe (III) y frataxina, sino más bien de la interacción del metal con la proteína. De hecho, la incubación de Fe (III) con frataxina no produce Fe (II), como ha sido puesto de manifiesto mediante espectroscopia UV-visible. Además esta interacción es débil puesto que el DFO capta dicho Fe (III) y da lugar a la apoproteína (ausencia de ion metálico).

Sin embargo, la interacción de Fe (II) con la frataxina parece más fuerte. De hecho, parte de los iones Fe (II) dejan de estar disponibles para la ferrozina.

Estos datos sugieren por tanto un papel para la frataxina de tipo chaperona, que pueda captar Fe (II) para evitar posibles reacciones adversas (reacción de Fenton).

Nuestros hallazgos sugieren que ZmFH-2 y por lo tanto las frataxinas vegetales, podrían estar relacionadas con la detoxificación del hierro, actuando como chaperona del Fe mitocondrial, uniendo en principio Fe (II), evitando así posibles reacciones adversas, como las reacciones de Fenton y Heber-Weiss<sup>3,4</sup>.

### **5.4. Materiales y métodos.**

#### *Síntesis de frataxinas recombinantes.*

ZmFH-2 se sintetizó en matraces Erlenmeyer de 2 L inoculados con un precultivo de una noche de células *E. coli* BL21 DE3 transformadas con las correspondientes construcciones de plásmidos pGEX 4-T1. Los cultivos a  $OD_{600nm} = 0.8$  se indujeron con

isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM y se cultivaron durante 3 horas a 37 °C. Luego, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón fosfato salino helado (PBS). La lisis celular se llevó a cabo mediante sonicación en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.5% para evitar la oxidación de la proteína. Todos los siguientes pasos se realizaron usando buffers saturados de argón. Después de la sonicación y la centrifugación, las proteínas de fusión GST se aislaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad por lotes Glutación Sefarosa 4B (Amersham Pharmacia). Luego, las construcciones de fusión se escindieron por escisión de trombina. Finalmente, la proteína se purificó a través de FPLC, en una columna de filtración en gel Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, como se reportó anteriormente <sup>1</sup>.

#### *Electroforesis PAGE no desnaturalizante.*

La PAGE nativa se llevó a cabo en la célula Mini-PROTEAN Tetra de Bio-Rad. La preparación del reactivo y las soluciones madre se realizaron según los Protocolos de Ornstein-Davis (manual de Bio-Rad). Se prepararon muestras de proteínas para agregar 7  $\mu$ g de proteína por ranura. Los geles se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue R-250* al 0,5%.

Las muestras de ZmFH-2 se prepararon a una concentración de proteína de 45  $\mu$ M y se incubaron a 37 °C con diferentes relaciones de Fe (II)/proteína. El carril 1 es ZmFH-2, en los carriles 2-4 se

## ¿ES LA FRATAXINA UNA PROTEÍNA DE HIERRO?

---

realizaron varias adiciones de Fe (II) cada 15 minutos, 6 veces molar cada una. Los carriles 5-6 son ZmFH-2 después de la adición de Fe (II) en 50- y 100 veces molar en una sola adición y 2 horas de incubación. Se añadió Fe (II) a partir de soluciones acuosas recientes de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 (\text{NH}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Los geles consistieron en un gel de resolución 12% de acrilamida y un gel de apilamiento 6% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 100 minutos.

### *Estudio de la actividad ferroxidasa de frataxinas.*

La actividad ferroxidasa de ZmFH-2 se ensayó a una concentración de proteína de 40  $\mu\text{M}$  en tampón TRIS 20 mM, pH 7.0. Se añadió Fe (II) a partir de soluciones acuosas recién preparadas (desgasificadas previamente durante 15 min bajo una corriente de nitrógeno) de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en una relación Fe (II)/frataxina de 2/1. El control consiste en una solución de Fe (II) sin proteína. Los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas. Fe (II) disponible se monitorizó a los 0, 5, 15, 30 y 60 minutos con ferrozina (sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico). Las mediciones de absorbancia se tomaron a una longitud de onda de 562 nm debido a la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}} (\text{fz})_3]^{2+}$  ( $\epsilon^{562} = 27900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Los espectros se tomaron en estos tiempos de reacción en un intervalo de 450-650 nm, con Spectronic Unicam UV 300.

### *Estudio de la actividad ferrirreductasa de frataxinas.*

La actividad ferrirreductasa de ZmFH-2 se ensayó a una concentración de proteína de 30  $\mu\text{M}$  en tampón Tris 20 mM, pH 7.0. Se añadieron Fe (III) a partir de soluciones acuosas de  $\text{FeCl}_3$  en una relación Fe (III)/frataxina de 4/1. Se agregó ferrozina en exceso. Las medidas de absorbancia se tomaron a una longitud de onda de 562 nm debido a la formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{fz})_3]^{2+}$ . Los espectros se registraron cada minuto en un rango de 450-650 nm durante un tiempo total de 30 minutos, con Spectronic Unicam UV 300.

#### *Titulación de fluorescencia de frataxinas con Fe (II)/ Fe (III).*

Los espectros se tomaron con espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse. Los anchos de rendija del monocromador para excitación y emisión se ajustaron a 10 nm. Para las valoraciones de fluorescencia, después de cada adición de Fe (II)/Fe (III), la muestra de proteína se excitó a 295 nm para minimizar la contribución de fluorescencia de los residuos de tirosina y los espectros de emisión se adquirieron de 305 nm a 500 nm. Las valoraciones se realizaron con  $[\text{ZmFH-2}] = 2 \mu\text{M}$  en tampón TRIS 20 mM, pH 7.0. Se tomaron los primeros espectros (auto-fluorescencia de proteínas) y más tarde se realizaron varias adiciones de 2  $\mu\text{L}$  de una disolución 1 mM de Fe (II)/Fe (III), hasta que la relación Fe/proteína alcanzó 10/1 (Fe final 20  $\mu\text{M}$ ). El Fe (II) se añadió a partir de disoluciones acuosas recién preparadas (desgasificadas previamente durante 15 min bajo una corriente de nitrógeno) de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 (\text{NH}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y Fe (III) se añadió a partir de disoluciones acuosas recientes de  $\text{FeCl}_3$ . Finalmente, la sal mesilato

de deferoxamina (DFO, N'-[5-(acetil-hidroxi-amino)pentil]-N-[5-[3-(5-aminopentil-hidroxi-carbamil)propanilamino]pentil]-N-hidroxi-butano diamida) se añadió en un exceso de 5 veces, a las proteínas tratadas con Fe (II)/Fe (III). Las muestras se dejaron reaccionar durante 24 horas antes de que se realizara la última medición.

### *Microscopía electrónica de transmisión (TEM).*

La muestra de ZmFH-2 se realizó a 80  $\mu$ M de concentración de proteína y se incubó durante 2 horas a 37 °C con 6 Fe (II) por proteína. La rejilla TEM se preparó colocando una gota sobre una rejilla de Cu revestida con carbono. Los mapas HAADF-STEM y EDX se obtuvieron con un microscopio FEI TITAN G2.

### **5.5. Referencias.**

1. Sánchez, M. *et al.* Copper redox chemistry of plant frataxins. *J. Inorg. Biochem.* **180**, 135–140 (2017).
2. Eftink, M. R. & Ghiron, C. A. Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* **114**, 199–227 (1981).
3. Fenton, H. J. H. Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron. *J. Chem. Soc. Trans.* **65**, 899–910 (1894).
4. Haber, F. & Weiss, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London. Ser. A - Math. Phys. Sci.* **147**, 332 LP-351 (1934).



## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**



1. La ferritina posee propiedades de fotocatalizador. Una vez excitada con una fuente de radiación UV, la ferritina es capaz de actuar en reacciones de oxidación y reducción de moléculas orgánicas y otras especies como cationes metálicos pero el mecanismo difiere de lo que había sido publicado. Proponemos un nuevo mecanismo en el que los electrones excitados por la luz UV reducen automáticamente el núcleo mineral de la ferritina para producir iones Fe (II), los cuales no son reoxidados en los centros ferroxidasas de la ferritina, sino que estos iones Fe (II) saldrían de la cápside ferritínica para reducir posibles receptores de electrones externos, como Cu (II) o Au (III). En ausencia de aceptores de electrones, el Fe (II) estaría disponible para el reingreso a la ferritina.
2. Los iones Zn (II) son capaces de bloquear parcialmente la actividad ferroxidasa de los centros catalíticos presentes en las subunidades H de la ferritina.
3. El núcleo de Fe de la ferritina tiene una influencia pequeña en la oxidación de Fe (II) a Fe (III) en comparación con el centro ferroxidasa. Por tanto, todos los Fe (III) del núcleo de la ferritina han sido oxidados en los centros ferroxidasa de las cadenas H. El proceso de oxidación de ferritinas puras L sigue siendo un enigma.
4. La presencia de fosfato en el núcleo ferritínico no favorece la oxidación de Fe (II) a Fe (III), lo que también descarta un papel significativo del núcleo de ferritina en la oxidación de Fe (II).

5. En cuanto a la liberación de Fe de la ferritina, podemos concluir que el Fe sigue un camino distinto al de la entrada (canales C<sub>3</sub>-centros ferroxidasa). De nuestros datos se deriva que los centros ferroxidasa no fijan el Fe que va siendo liberado, aunque no se descarta que esta liberación se produzca vía los mismos canales de entrada, es decir los canales de simetría C<sub>3</sub>.

6. Nuestros datos confirman que los núcleos de ferritina formados en presencia de fosfato son químicamente más lábiles y por lo tanto el Fe se libera de la proteína con mayor facilidad.

7. Las producciones recombinantes tanto de ZmFH-1 como de ZmFH-2 a pequeña escala producen apo-monómeros, con presencia reducida de dímeros. Sin embargo, la síntesis de estas frataxinas en una escala de fermentación proporciona dos grupos de proteínas, una de alto peso molecular (HMW) y otra que contiene un monómero apo con las mismas características que el obtenido por cultivos Erlenmeyer.

8. La exposición de los monómeros ZmFH-1 y ZmFH-2 (denominados monómeros  $\alpha$ ) a la aerobiosis (O<sub>2</sub>) durante 24 h causa un cambio conformacional a un estado parcialmente desplegado (el llamado monómero  $\beta$ ).

9. La química del cobre de frataxinas de plantas ha sido abordada por primera vez. ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH presentan un equilibrio *redox* monómero-dímero. Estos dímeros se producen por la oxidación del Cu (II) con la consiguiente formación de puentes

disulfuro entre residuos Cys existentes en sus cadenas C-terminales.

10. La inclinación a la interconversión monómero-dímero es diferente para cada proteína (ZmFH-1, ZmFH-2 y AtFH). Cu (II) oxida fácilmente a ZmFH-2 transformándola en dímero, el cual se reduce fácilmente de forma química para dar el monómero de partida. Sin embargo, ZmFH-1 es poco propensa a oxidarse y existe principalmente en su forma monomérica. AtFH por contra resiste la reducción del dímero al monómero. Este tipo de química *redox* no había sido reportado para frataxinas y describe un nuevo esquema plausible para comprender la función de la frataxina en plantas. Además, hemos puesto de manifiesto la participación de las frataxinas en el metabolismo general del cobre aunque estos resultados requieren mayor investigación.

11. La química del hierro de las frataxinas de plantas difiere sustancialmente de la del cobre. El Fe (III) no oxida la proteína como lo hace el Cu (II), por lo que el ensamblaje en dímeros por puente disulfuro impulsado por cobre no tiene lugar con la incubación con Fe (III).

13. Nuestros resultados sugieren que ZmFH-2 actuaría como una proteína chaperona de Fe (II), estabilizándolo y evitando la formación de radicales tóxicos vía reacción de Fenton.