

**Caracterización de la Frataxina de *Dictyostelium discoideum*:**  
**Estudio de la complementación funcional y estructural del**  
**supercomplejo humano para la formación de centros ferrosulfurados**

Diciembre 2022

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires



Laboratorio de bioquímica estructural de proteínas involucradas en enfermedades poco frecuentes; Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (IB3); FCEN UBA

- Autor: Justo Facundo Olmos
- Directora: María Florencia Pignataro
- Co-director: Francisco Velázquez Duarte

Justo Olmos

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "J. Olmos".

María Florencia Pignataro

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Velázquez Duarte".

Francisco Velázquez Duarte

## **Agradecimientos**

A Javier por abrirme las puertas del laboratorio con total confianza desde el primer momento y por toda la ayuda durante mi formación, especialmente los primeros años.

A mi codirector Pako y a mis compañeros del laboratorio por la constante disposición a ayudarme y aconsejarme, ya sea en las tareas de laboratorio o en cualquier aspecto de mi vida académica.

A mi familia por la paciencia que me tuvieron siempre y por haber puesto mi crecimiento personal y profesional como prioridades.

A mis amigos por la compañía y por la sinceridad, realmente aprendí muchísimo de ustedes.

Y sobre todo a mi directora Flor, por las incontables horas de paciencia y dedicación para formarme y ayudarme estos años.

## Índice:

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Title</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>6</b>
<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>7</b>
<b>Parte 1: Introducción</b>	<b>8</b>
1.1. El supercomplejo para la formación de centros ferrosulfurados en mamíferos	8
1.1.1. El rol de FXN en el supercomplejo y la Ataxia de Friedreich	10
1.2. <i>D. discoideum</i> como modelo en el estudio de la maquinaria para ensamblado de centros ferrosulfurados	13
1.2.1. Conservación en la vía de síntesis de centros ferrosulfurados entre humanos y <i>D. discoideum</i>	14
<b>Resultados</b>	<b>19</b>
<b>Parte 2: Evaluación de la complementación estructural y funcional del supercomplejo humano con Dd FXN</b>	<b>19</b>
2.1. Introducción: Evaluación de la complementación estructural mediante ensayos de anisotropía de fluorescencia	19
2.2. Competencia entre hFXN marcada con Texas-red y DdFXN por la interacción con el supercomplejo humano NFS1-ISD11-ACP-ISCU	21
2.3. Interacción de DdFXN marcada con Texas-red con el complejo humano NFS1-ISD11-ACP-ISCU	24
2.3.1. Preparación de DdFXN marcada	24
2.3.2. Ensayos de anisotropía de fluorescencia utilizando DdFXN C35A marcada	26
2.4. Complementación funcional del supercomplejo humano con DdFXN y seguimiento de la actividad cisteína desulfurasa mediante el método del azul de metileno	28
2.5. Discusión	30
<b>Parte 3: Evaluación de la posible formación de un puente disulfuro intracatenario en DdFXN</b>	<b>32</b>
3.1. Introducción	32
3.2. Obtención de un nuevo modelo de DdFXN utilizando AlphaFold2	32
3.3. Análisis del grado de conservación evolutiva de las cisteínas involucradas en el puente disulfuro	34
3.4. Evaluación experimental de la formación del puente disulfuro	35
3.5. Predicción del efecto de la formación del puente disulfuro sobre la flexibilidad de DdFXN mediante dinámicas moleculares	40
3.6. Discusión	45
<b>Parte 4: Discusión general y conclusiones</b>	<b>46</b>
4.1. Caracterización funcional de DdFXN	46
4.2. Evaluación de la formación del puente disulfuro	47
<b>Parte 5: Materiales y métodos</b>	<b>48</b>

5.1. Purificación de DdFXN	48
5.2. Marcación con Texas-red	50
5.3. Ensayo de anisotropía para competencia entre hFXN y DdFXN	50
5.4. Marcación con IAA	51
5.5. Cuantificación de tioles libres	51
5.6. Mutagénesis	52
5.7. Ensayo de anisotropía para interacción de DdFXN C35A con el supercomplejo	54
5.8. Obtención del alineamiento de FXNs de Amoebozoa	54
5.9. Ensayo actividad	55
5.10. Determinación de la presencia de unión S-S en Dd FXN por espectrometría de masa	56
5.11. Dinámicas moleculares	56
5.12. Tratamiento estadístico de resultados de cuantificación de tioles y actividad desulfurasa	57
<b>Bibliografía</b>	<b>58</b>

## Resumen

La síntesis de centros, o *clusters* ferrosulfurados [Fe-S] es uno de los procesos biológicos más predominantes a lo largo del árbol de la vida. Numerosos procesos biológicos dependen de estos centros, ya que son cofactores esenciales de proteínas involucradas en respiración celular, reparación de ADN, entre otros.

Se conocen varias vías metabólicas para su síntesis, en particular la vía mitocondrial está presente en prácticamente todos los eucariotas con mitocondria u organelas derivadas (mitosomas, hidrogenosomas, etc). En humanos el supercomplejo mitocondrial involucrado en esta vía de síntesis está compuesto por varias proteínas, alteraciones en la expresión o secuencia de estas resultan en varias enfermedades humanas. Particularmente, la disminución en los niveles mitocondriales de frataxina (FXN), una de las proteínas del supercomplejo, resulta en una enfermedad neurodegenerativa, conocida como Ataxia de Friedreich.

En trabajos anteriores, hemos propuesto a la ameba *Dictyostelium discoideum* como un modelo biológico para el estudio de los mecanismos asociados a esta enfermedad, basándonos en la hipótesis general de que el proceso de biosíntesis de centros [Fe-S] está conservado entre esta ameba y los humanos. Se realizaron varias observaciones que apoyan esta hipótesis, y el presente trabajo de tesis ahonda en esta línea de investigación.

Durante el presente trabajo se plantearon dos grandes objetivos. En primer lugar, buscamos determinar el grado de similitud funcional entre la frataxina humana (hFXN) y la frataxina de *D. discoideum* (DdFXN). Nuestra hipótesis es que el rol de DdFXN en *D. discoideum* es semejante al de hFXN en humanos, y por ende DdFXN será capaz de interactuar y activar al supercomplejo humano en su actividad generadora de centros.

Con este objetivo en mente, se analizó por un lado la capacidad de DdFXN de interactuar con el supercomplejo humano, y por otra parte la capacidad de esta proteína para promover la actividad desulfurasa del supercomplejo. Los resultados mostraron que DdFXN logra interactuar con el supercomplejo humano con una alta afinidad, comparable a la observada para hFXN, y que además es capaz de activar moderadamente la actividad desulfurasa del mismo. Estas observaciones sugieren un mecanismo conservado entre humanos y *D. discoideum* para la formación de centros ferrosulfurados.

En segundo lugar, ahondamos en la descripción biofísica de DdFXN. Más particularmente nos enfocamos en la posible formación de un puente disulfuro intracatenario en la proteína, con el afán de determinar en qué condición es posible formar este puente y si podría llegar

a tener algún efecto sobre la estructura y dinámica de DdFXN, así como sobre su actividad. Los resultados muestran que la formación de este puente tiene una baja eficiencia, al menos en las condiciones experimentales probadas, pero que él mismo podría tener algún efecto sobre la flexibilidad de DdFXN y su interacción con el supercomplejo.

## Title

Characterization of *Dictyostelium discoideum*'s Frataxin: Structural and functional complementation of the human iron-sulfur cluster assembly supercomplex

## Summary

Iron-sulfur cluster [Fe-S] biogenesis is one of the most predominant biological processes throughout the tree of life. Numerous biological functions depend on these clusters, since they are essential cofactors in proteins involved in the respiratory chain, DNA repair, and others.

A number of metabolic pathways for cluster synthesis are known, among these, the mitochondrial pathway is present on virtually all eukaryotic life forms that possess mitochondria or derived organelles (mitosome, hydrogenosome, etc). In humans, the mitochondrial supercomplex involved in these pathways is made up of five different proteins, and changes in their expression or sequence leads to a number of diseases. Particularly, reduced levels of mitochondrial frataxin (FXN), one of the supercomplex proteins, results in a neurodegenerative disease known as Friedreich's Ataxia.

In previous works we have proposed the amoeba *Dictyostelium discoideum* as a model organism for the study of the underlying mechanisms in this disease, based on the general hypothesis that the [Fe-S] cluster synthesis pathway is shared between humans and this amoeba. A number of observations in favour of this hypothesis were made, and this thesis continues with this line of research.

In the present work we established two main objectives. First, we sought to determine the degree of functional conservation between human frataxin (hFXN) and *D. discoideum*'s frataxin (DdFXN). We hypothesize that the function of FXN is similar in humans and *D. discoideum*, and thus DdFXN will be able to both interact with the human supercomplex and enhance its activity in a similar fashion to hFXN.

With this objective in mind, we analyzed the ability of DdFXN to interact with the human supercomplex and whether this interaction promotes the desulfurase activity of the complex. Our results indicate that DdFXN shows a high affinity for the human supercomplex, comparable to the one observed for hFXN, and that it is also capable of moderately activating its desulfurase activity.

On the other hand, during this thesis we have also advanced on the biophysical characterisation of DdFXN. We have focused specifically on the possible formation of a disulfide bond between residues Cys 35 and Cys 110, wondering on which conditions the formation of this bond is favored and what effects it could have on the structure, dynamics and function of DdFXN. Our results show that the formation of this disulfide bond has a low efficiency, at least in the experimental conditions we tested; however, if formed, this bond could potentially affect the flexibility of DdFXN, as well as its interaction with the supercomplex.

## **Hipótesis y objetivos**

Esta tesis se separa en dos grandes ejes, cada uno con su propia hipótesis y objetivos:

### Caracterización funcional de DdFXN:

**Hipótesis:** El mecanismo por el cual FXN interactúa con el supercomplejo y lo activa está conservado evolutivamente. En consecuencia, DdFXN será capaz de interactuar con el supercomplejo humano y activarlo en su actividad Cys desulfurasa.

### **Objetivos:**

- Determinar mediante ensayos de anisotropía de fluorescencia la interacción de DdFXN con el supercomplejo humano, determinando su constante de disociación (Kd) y comparándolo con el correspondiente a la interacción con hFXN.
- Evaluar la actividad desulfurasa del supercomplejo humano activado con DdFXN, relativa a la actividad del mismo activado con hFXN.

### Análisis de la formación del puente disulfuro:

**Hipótesis:** DdFXN forma un puente disulfuro intracatenario entre sus cisteínas 110 y 35, pero dicha formación podría no encontrarse favorecida en las condiciones normales de purificación.

## Objetivos:

- Evaluar la cepa SHuffle de *E.coli* como una alternativa para la obtención de DdFXN recombinante, favoreciendo la formación del puente disulfuro intracatenario.
- Predecir computacionalmente, mediante análisis evolutivos y dinámicas moleculares, la relevancia del puente disulfuro y posibles efectos de este sobre DdFXN y su actividad.

## Parte 1: Introducción

### 1.1. El supercomplejo para la formación de centros ferrosulfurados en mamíferos

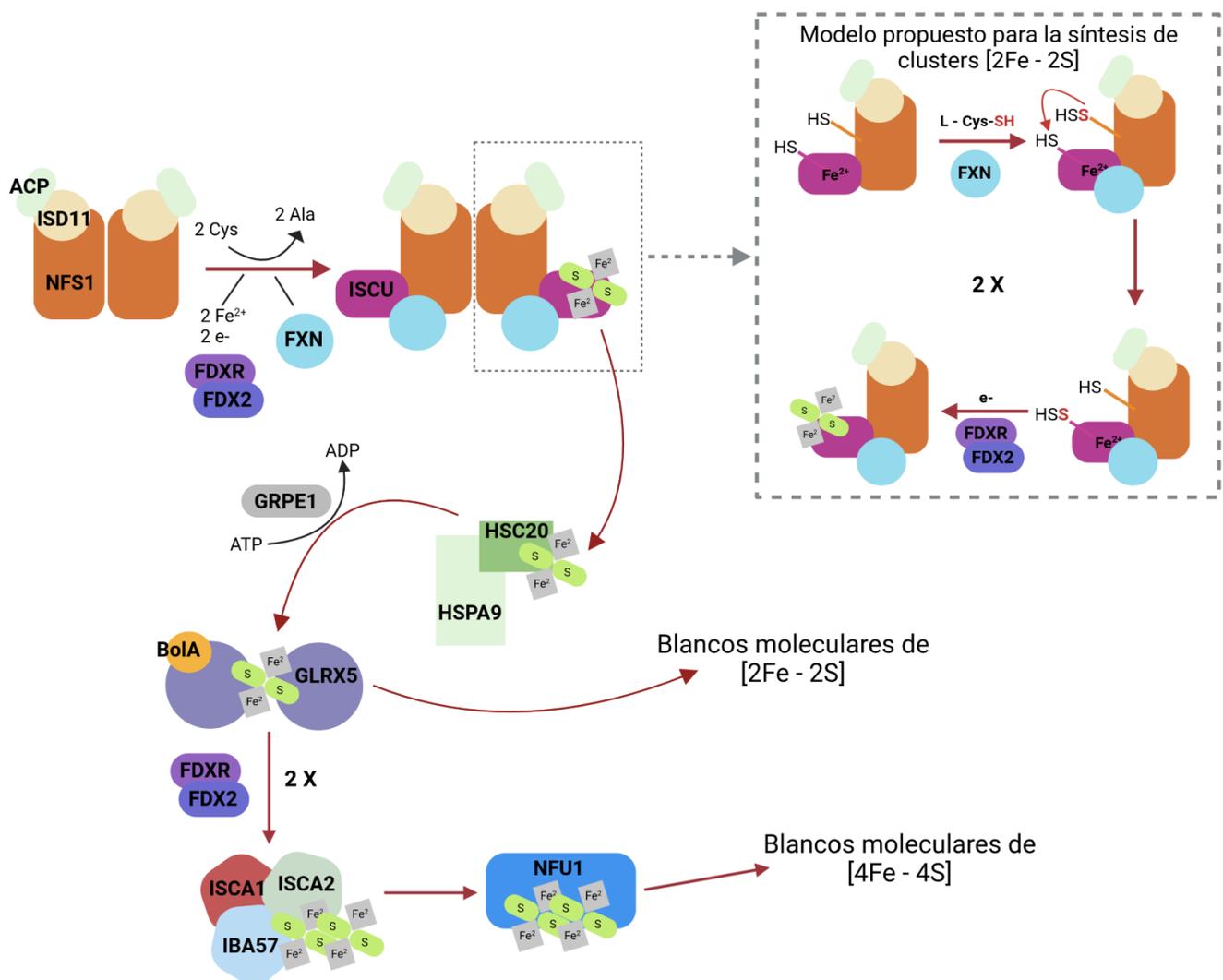
Los centros ferrosulfurados [Fe-S] son un cofactor esencial para la vida, numerosas funciones enzimáticas dependen de estos cofactores, algunos ejemplos incluyen los complejos de la cadena respiratoria [1,2], succinato deshidrogenasa y aconitasa [3], reparación del ADN [4], modificaciones químicas de los tRNAs [5], etc.

Si bien se conocen varios mecanismos para la síntesis de centros ferrosulfurados [6], la vía de síntesis mitocondrial, encontrada en la bibliografía como vía Nif o Isc, es la predominante a lo largo del árbol de la vida. La maquinaria proteica necesaria para ésta se encuentra en prácticamente todos los eucariotas con mitocondrias u organelas derivadas, así como en bacterias y *archaeas* (con algunas excepciones y modificaciones) [7,8].

En mamíferos, el supercomplejo mitocondrial para la síntesis de estos centros se presenta como un complejo entre dos hetero-multímeros iguales (Figura 1), cada uno de los cuales tiene un sitio activo sobre el que se forma un centro Fe-S [9–12]. La cisteína desulfurasa NFS1 es la enzima clave. NFS1 se traduce como un precursor de 50 kDa, el cual es luego importado y procesado en la matriz mitocondrial, en su forma madura se encuentra como un dímero. La actividad catalítica de la NFS1 depende del piridoxal-fosfato (PLP) y de su interacción con la proteína ISD11, que a su vez forma un heterodímero con la proteína ACP (del inglés Acyl carrier protein) [13].

La proteína ISCU actúa como andamiaje para la formación de los centros ferrosulfurados, esta proteína une hierro (II) e interactúa con el sitio activo de NFS1. Otra de las proteínas esenciales es la Frataxina (FXN). FXN interactúa con ISCU y ambas NFS1s, ubicándose en cercanía al sitio activo, y actúa como activador cinético modulando positivamente la actividad de NFS1 y la formación de los centros [14–16].

El proceso de formación de centros ferrosulfurados [2Fe-2S] se puede dividir, a grandes rasgos, en tres etapas (Figura 1). En un primer paso NIA (NFS1-ISD11-ACP) consume L-cisteína libre y forma un persulfuro (-SSH) sobre la cisteína 381 de NFS1 [15,17,18], liberando L-alanina como subproducto. En un segundo paso, este persulfuro se transfiere a la cisteína 138 de ISCU, quedando en cercanía al sitio de unión de hierro sobre la misma proteína (conformado por Cys69, Cys95, Asp71 y His137). El tercer y último paso involucra la acción de la ferredoxina FDX2, que genera a partir del persulfuro sobre ISCU el sulfuro necesario para el ensamblado del centro [2Fe-2S] [19–21]. FXN modula los dos primeros pasos [16,20,22,23].



**Figura 1: Esquema del proceso de formación y redistribución de centros ferrosulfurados.** Se muestra en el recuadro punteado el proceso de síntesis de centros [2Fe-2S] separado en 3 pasos: primero se da la desulfuración de una L-cisteína libre, formándose el persulfuro sobre NFS1; luego ocurre el traspaso de este persulfuro al sitio catalítico sobre ISCU previamente cargada con Fe<sup>2+</sup>; finalmente FDX2 reduce el persulfuro a

sulfuro libre que reacciona con  $\text{Fe}^{2+}$  para formar el centro. Se muestran también las vías de redistribución de los centros [2Fe-2S] y de síntesis y distribución de centros [4Fe-4S].

Una vez que los centros [2Fe-2S] están formados, varias proteínas participan en el proceso de síntesis de centros [4Fe-4S] y transporte de ambos tipos de arreglos. La liberación del centro formado sobre ISCU está mediada por un sistema dedicado de chaperonas (HSPA9, HSC20 y GRPE1), que realiza el paso del centro de ISCU a la glutarredoxina GLRX5, que transfiere los centros [2Fe-2S] a sus blancos moleculares [24]. En humanos se forma posteriormente un complejo GLRX5-BolA [25] que transfiere los centros [2Fe-2S] a las proteínas ISCA1, ISCA2 e IBA57 donde, en presencia de un agente reductor como el par FDX2 y FDXR, se forma un centro [4Fe-4S] [26], que es luego transferido a NFU1 y de ahí a distintos receptores [27] (Figura 1).

#### 1.1.1. El rol de FXN en el supercomplejo y la Ataxia de Friedreich

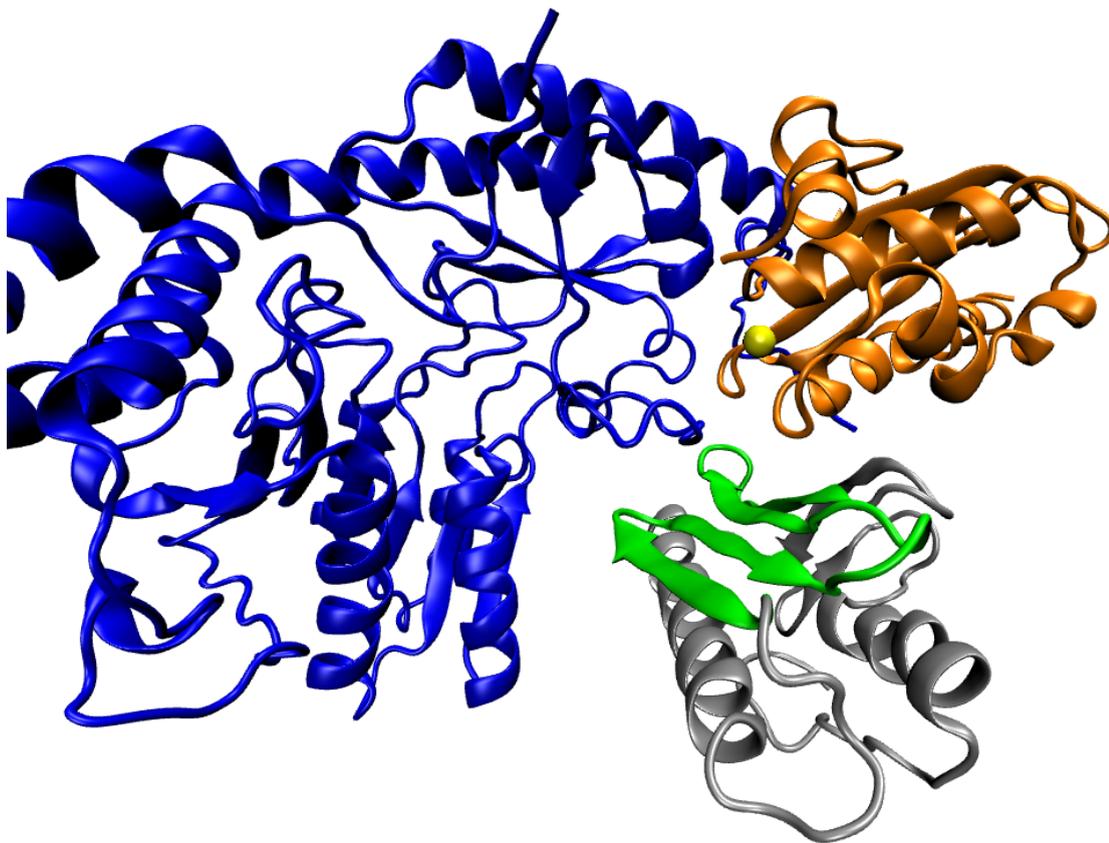
Como se mencionó anteriormente, la FXN actúa como activador cinético del proceso de síntesis de centros ferrosulfurados (Sección 1.1). La disminución en la expresión de FXN, o ciertas mutaciones puntuales, resulta en una enfermedad neurodegenerativa grave, denominada Ataxia de Friedreich (FA o FRDA) [28]. Esta es la forma más común de Ataxia hereditaria. En el ~95% de los casos está causada por homocigosis para una expansión de una repetición GAA en el primer intrón del gen de la FXN, lo que lleva a un menor nivel de transcripción. El ~5% restante se trata de heterocigotas compuestas, con una expansión GAA y una mutación puntual en el alelo restante que causa un codón stop prematuro, un cambio en el marco de lectura o una mutación puntual en la secuencia de aminoácidos [29].

El efecto de las mutaciones puntuales asociadas a FA en la interacción con el supercomplejo y subsecuente activación del mismo no ha sido descrito en detalle salvo algunas mutaciones que involucran residuos de relevancia conocida (mutaciones sobre el triptofano 155 por ejemplo [30]), principalmente porque las bases moleculares de la activación por FXN aún se desconocen. Los experimentos disponibles han demostrado que muchas de estas mutaciones resultan en variantes inestables de FXN y con una capacidad disminuida para la activación del supercomplejo [15,31], pero aún hay mucha incertidumbre respecto al rol preciso de FXN.

Con respecto a las características de la FXN humana, resulta relevante aclarar que es una proteína pequeña, codificada nuclearmente, se importa a la matriz mitocondrial como un

precursor de 210 residuos que es luego procesado en dos pasos [32,33] y la forma madura de 14.2 kDa consta de los residuos 81 a 210.

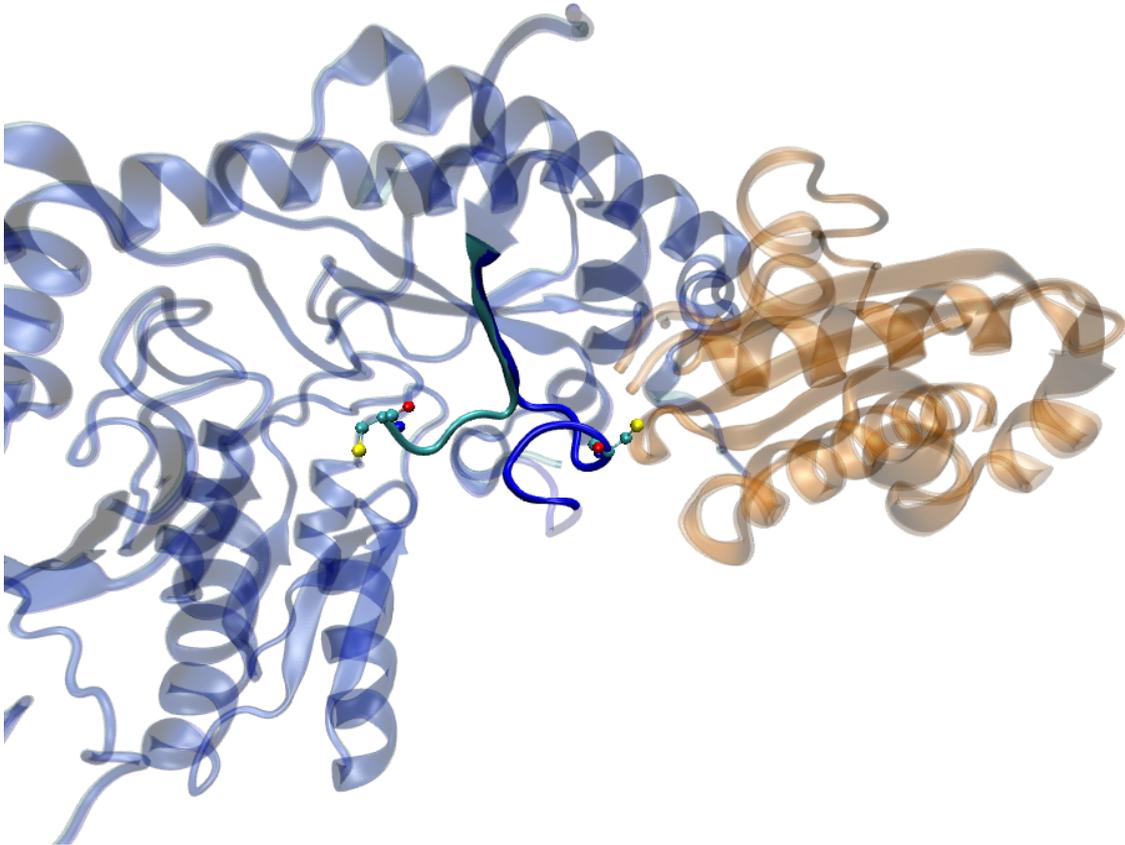
La FXN interactúa en simultáneo con NFS1 e ISCU, principalmente mediante una lámina beta, posicionándose en cercanía al sitio activo (Figura 2) donde se da la transferencia del persulfuro de NFS1 a ISCU y la subsecuente reducción y formación del centro Fe-S.



**Figura 2: Acercamiento al sitio activo del supercomplejo.** En azul NFS1, naranja ISCU y gris FXN, el átomo amarillo es un ión de Zn ubicado en el sitio activo sobre ISCU. En verde se muestra la lámina beta de FXN que media la interacción con el supercomplejo (PDB: 6NZU).

Como mencionamos previamente, mediante esta interacción, FXN actúa como un activador cinético del proceso de formación de centros ferrosulfurados, modulando positivamente dos de los tres pasos de síntesis (Sección 1.1). El primer paso de este proceso es la desulfuración de cisteína libre dependiente de PLP y formación de un persulfuro sobre la cisteína 381 de NFS1, esta cisteína se posiciona sobre un *loop* móvil (residuos 375 a 385 aproximadamente) en cercanía al cofactor PLP (conformación “cerrada” del *loop*). El

segundo paso, la transferencia del persulfuro de NFS1 a la cisteína 138 de ISCU, involucra un cambio conformacional del *loop* de NFS1, que pasa a ubicarse en cercanía al sitio activo sobre ISCU (conformación “abierta” del *loop*) (Figura 3) [34,35].



**Figura 3: Detalle del cambio conformacional del *loop* móvil de NFS1.** Se muestra la interfaz de interacción entre NFS1 (azul y cian) e ISCU (naranja). Se muestran las dos conformaciones del *loop*, abierta (azul, PDB: 6UXE) con la cisteína 381 en cercanía a ISCU y cerrada (cian, PDB: 6WI2) con la cisteína alejada. La forma cerrada no tiene la estructura completamente resuelta, pero muestra perfectamente la diferencia en la ubicación relativa a ISCU del *loop*.

Se han reportado incrementos en la eficiencia de ambos pasos gracias a la incorporación de FXN en el sistema (incremento de 6.5 veces en la eficiencia de desulfuración y de 31 veces en la transferencia del persulfuro). Esta observación se realizó en distintas condiciones [14–16], y es particularmente relevante para el segundo paso, ya que el cambio conformacional del *loop* de su forma cerrada a su forma abierta es sumamente ineficiente en ausencia de FXN.

Por otra parte, la FXN posee la capacidad adicional de unir hierro II con una Kd moderada gracias a un grupo de residuos ácidos ubicados en su alfa hélice N terminal [36], con lo que originalmente se le asignó un rol como fuente de hierro para el proceso de síntesis de los

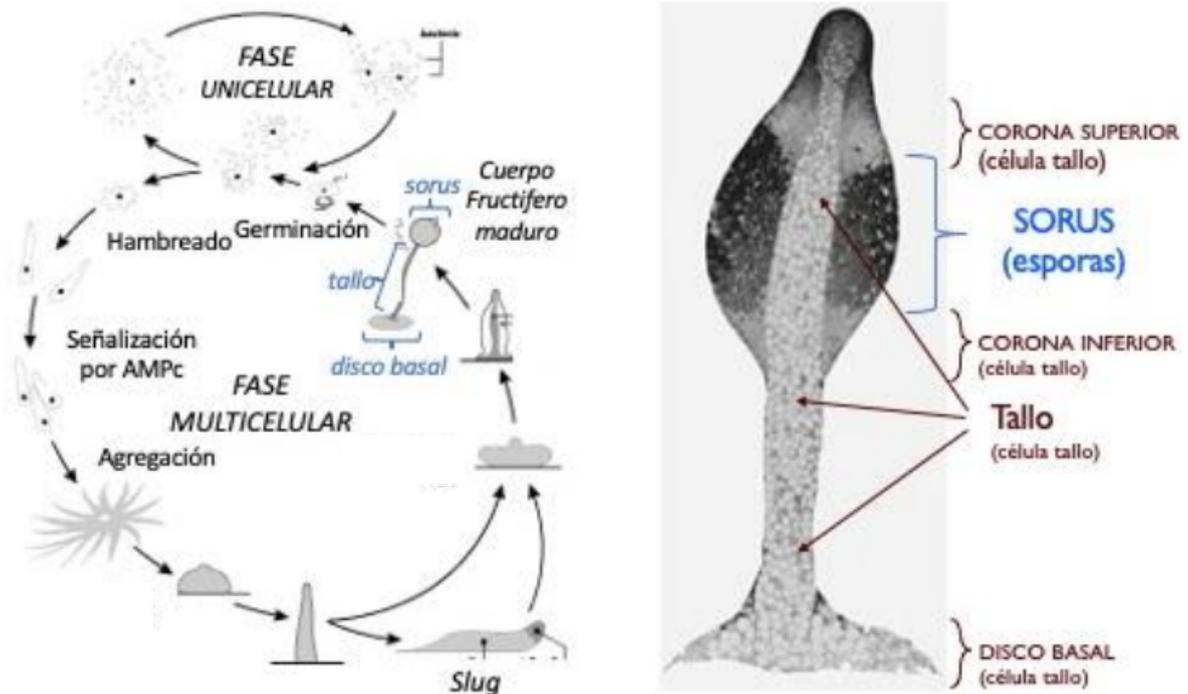
centros Fe-S. Mutaciones en los residuos involucrados en la unión a hierro han demostrado disminuir la capacidad de FXN para interactuar con el supercomplejo [36], sin embargo, las estructuras tridimensionales disponibles muestran que esta hélice no se encuentra cerca del sitio activo. Actualmente no está claro si esta capacidad de FXN tiene efectivamente algún aporte en el proceso de síntesis de centros ferrosulfurados.

### **1.2. *D. discoideum* como modelo en el estudio de la maquinaria para ensamblado de centros ferrosulfurados**

Con el objetivo de utilizar un modelo celular rápido, versátil, de fácil manipulación y barato para el estudio y diseño de terapias de las enfermedades asociadas a este supercomplejo mitocondrial, hemos comenzado a explorar al protista ameboide *Dictyostelium discoideum*.

*D. discoideum* es un organismo ampliamente utilizado en estudios de señalización, con un bajo costo de mantenimiento y genoma completamente secuenciado, es un organismo haploide lo que lo hace de fácil manipulación genética y posee un alto grado de conservación de la maquinaria celular con metazoos [37]. De esta forma, estudios realizados en este organismo pueden dar indicios mecanísticos de fenómenos biológicos presentes en organismos más complejos [35].

*D. discoideum* posee un ciclo de vida característico, que combina una fase unicelular con una multicelular. En condiciones normales, las células se alimentan de bacterias y proliferan como amebas unicelulares, por fisión binaria. La falta de alimento dispara la entrada en la fase multicelular, primero ocurre una agregación de las amebas, luego se agrupan formando una unidad (fase *slug* en inglés) que migra en función de distintas condiciones (luz, gradiente de temperatura, etc); y finalmente se forma el cuerpo fructífero, que incluye diferenciación celular en dos grupos principales, las células del tallo y las esporas. En particular las esporas, que son formas de resistencia, serán liberadas en busca de nuevas fuentes de alimento (Figura 4) [38].



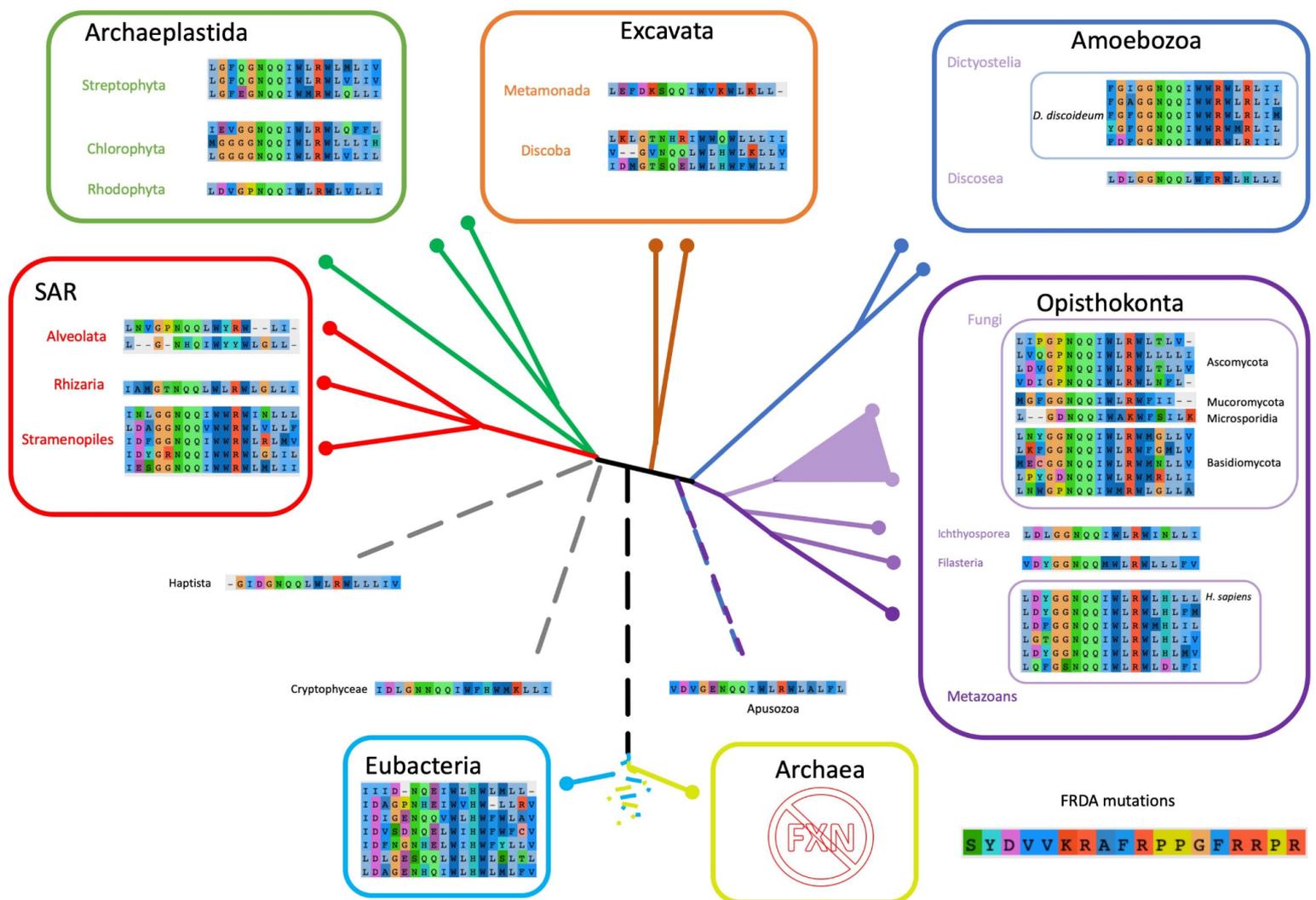
**Figura 4: Ciclo de vida de *D. discoideum*.** Se muestran el ciclo celular de *D. discoideum* (izquierda) y un detalle de la anatomía del cuerpo fructífero (derecha), la última fase de la etapa multicelular del ciclo de vida. (figura modificada de [39])

Esta ameba ofrece una amplia variedad de fenotipos de fácil detección que sirven como reporteros. En los últimos años *D. discoideum* se ha convertido en modelo para el estudio de las bases moleculares y mecanismos celulares subyacentes a distintas patologías neuronales como el trastorno bipolar, esquizofrenia, etc, así como enfermedades mitocondriales humanas [40].

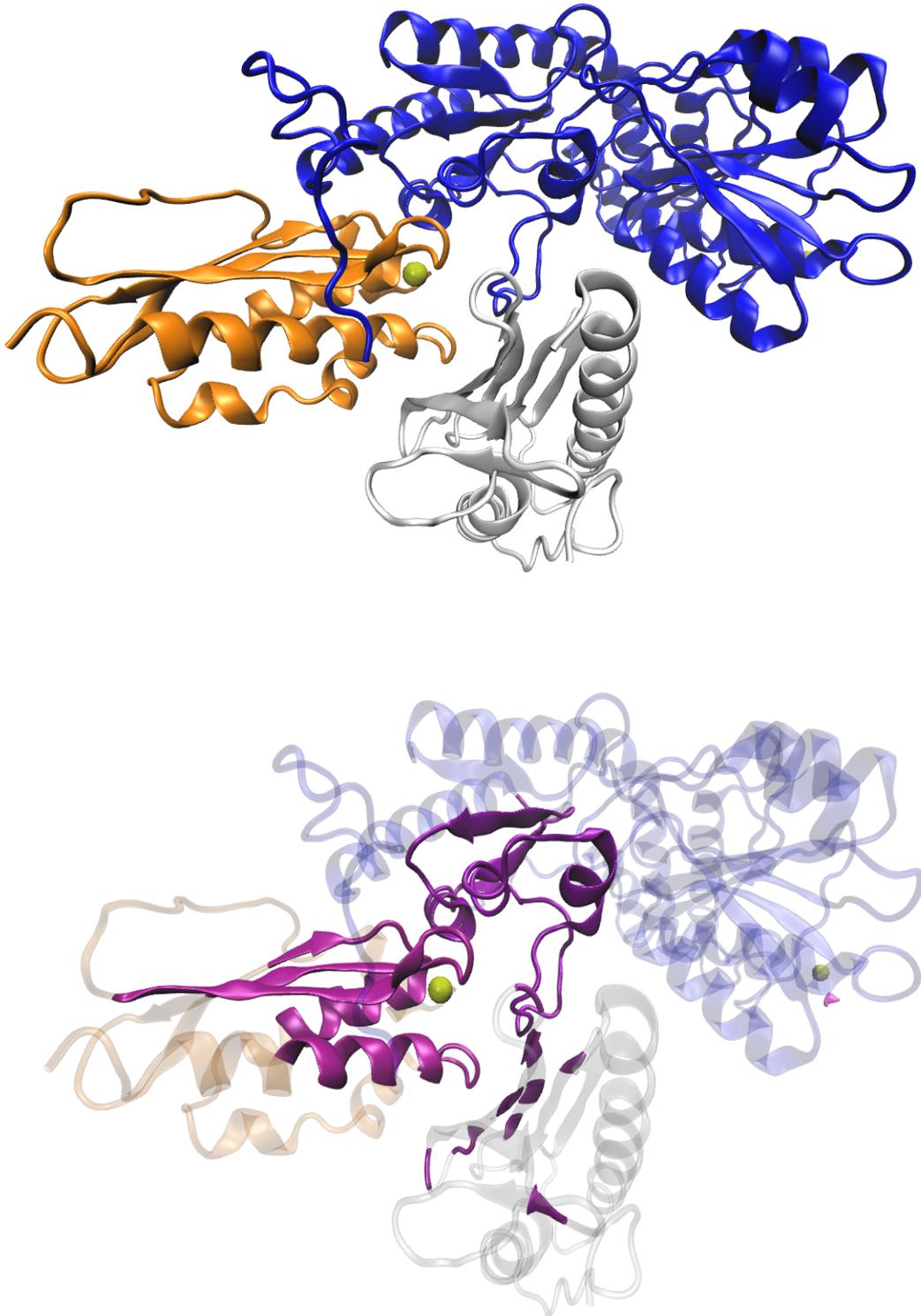
### 1.2.1. Conservación en la vía de síntesis de centros ferrosulfurados entre humanos y *D. discoideum*

En un trabajo anterior nos planteamos el objetivo de establecer las bases para una comparación en detalle entre los supercomplejos humano y de *D. discoideum*, tanto a nivel estructural como funcional [41]. Analizamos el genoma de *D. discoideum* e identificamos los potenciales ortólogos para todas las proteínas del supercomplejo, así como varias otras proteínas asociadas a post procesamiento y traslado de los centros ferrosulfurados, con lo que la vía metabólica estaría, en principio, conservada en la totalidad de sus partes.

Las proteínas del supercomplejo presentan un elevado grado de conservación a lo largo del árbol de la vida. Particularmente en el caso de FXN la mayoría de las posiciones involucradas en mutaciones asociadas a FA presentan un elevado grado de conservación (Figura 5) sugiriendo que los mecanismos moleculares que subyacen el rol de FXN en el proceso de formación de centros ferrosulfurados son un carácter ancestral conservado evolutivamente. Adicionalmente las posiciones conservadas de FXN se disponen preferencialmente sobre la superficie de interacción con el supercomplejo (Figura 6), lo que podría indicar que las bases físicas de la interacción están también conservadas.



**Figura 5: Conservación en la secuencia de FXN:** Esquema filogenético mostrando residuos involucrados en FA a lo largo del árbol de la vida. Las posiciones asociadas a FA se muestran para especies representativas de cada grupo (figura tomada de Olmos et al. [41]).

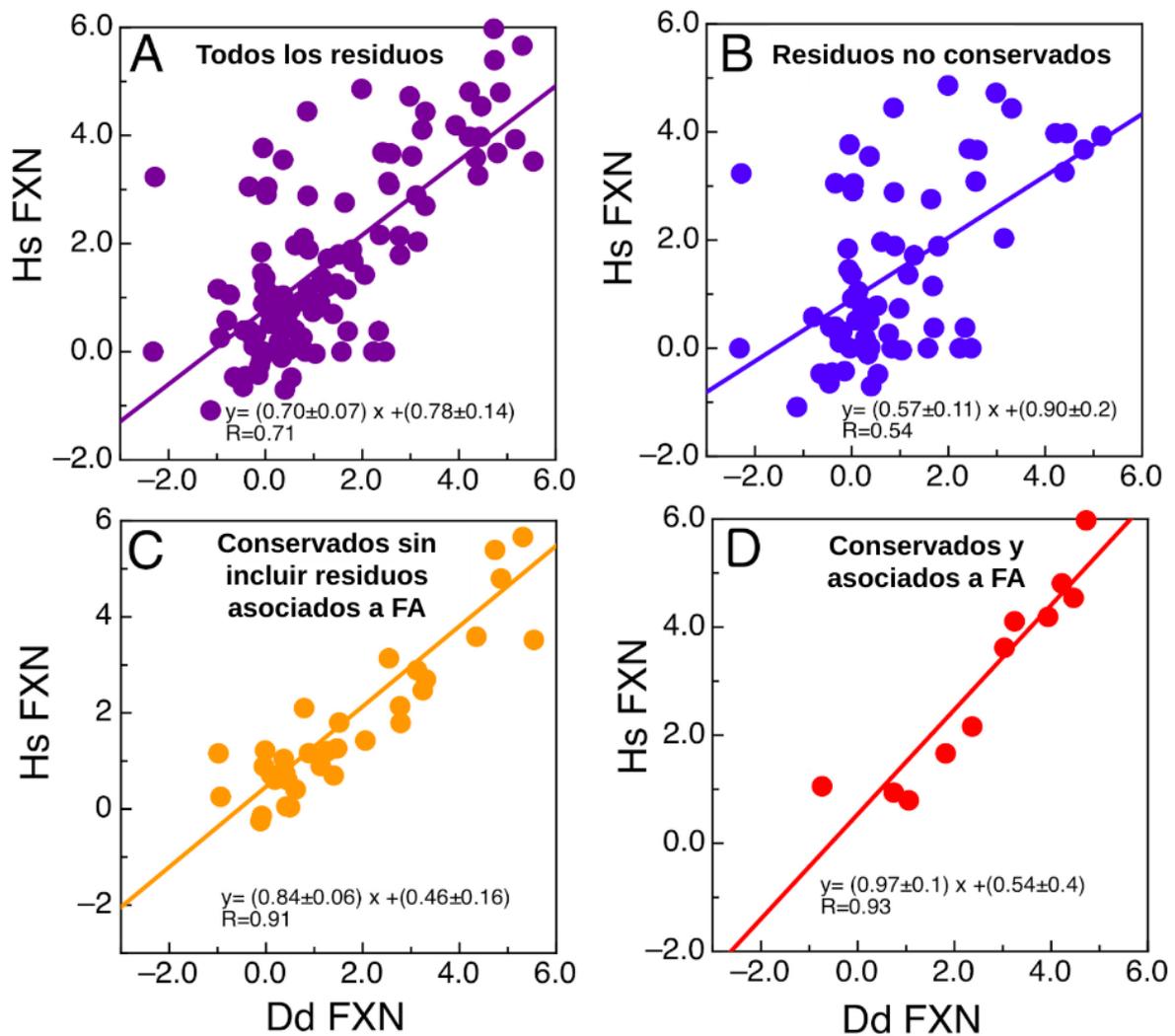


**Figura 6: Disposición de los residuos conservados sobre FXN:** Panel superior: acercamiento al sitio catalítico del supercomplejo, en naranja ISCU, en azul parte de NFS1 y en blanco FXN. Panel inferior: en violeta las posiciones conservadas a más del 90% en alineamientos múltiples de especies eucariotas, en el caso de FXN estas posiciones se ubican mayormente sobre la lámina beta que media su interacción con el resto del supercomplejo.

En dicho trabajo, decidimos enfocarnos en la FXN en primera instancia, por ser esta la proteína clave en FA. Se expresó y purificó exitosamente al ortólogo de FXN en *D. discoideum* (DdFXN). Esta proteína posee una similitud de secuencia de alrededor del 45% con la FXN humana (hFXN), similitud que está concentrada en la superficie de interacción. Por otra parte, se realizó una caracterización biofísica extensiva de DdFXN. La misma posee una estabilidad termodinámica de  $\Delta G^{\circ}_{NU} = 4.3$  kcal/mol, levemente menor a la variante humana ( $\Delta G^{\circ}_{NU} = 9.0$  kcal/mol), su desplegamiento es reversible y, a diferencia de la FXN humana, posee dos cisteínas que se encuentran reducidas tras el protocolo de purificación habitual.

Para completar el análisis entre ambas proteínas, dimos también algunos pasos en cuanto a la comparación entre DdFXN y hFXN en el contexto de la enfermedad, particularmente evaluamos computacionalmente la respuesta de ambas proteínas a las mutaciones puntuales relacionadas con FA. Para esto obtuvimos un modelo 3D de DdFXN mediante modelado por homología, utilizando hFXN como molde. La respuesta de la estabilidad de ambas proteínas a mutaciones puntuales fue predicha utilizando FoldX [42] y se observó que la correlación entre los cambios de estabilidad en hFXN y DdFXN es mayor para residuos conservados y para residuos involucrados en mutaciones puntuales que causan FA (Figura 7). Esto sugiere que la relevancia estructural de estos residuos se encuentra conservada, siendo quizá posible inducir un fenotipo similar FA en *D. discoideum* a través de las mismas mutaciones observadas en humanos.

Con este trabajo como antecedente directo, la presente tesis pretende ahondar en la caracterización de la proteína DdFXN y el grado de conservación funcional entre esta y hFXN, comparando la capacidad de ambas para interactuar y activar el supercomplejo humano. Adicionalmente exploramos la formación de un puente disulfuro intracatenario en DdFXN en distintas condiciones de purificación, así como los posibles efectos del mismo en la actividad de la proteína.



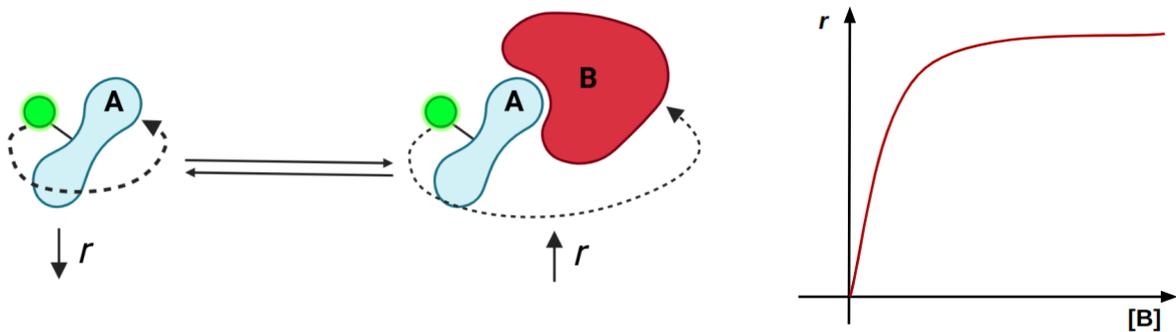
**Figura 7: Comparación del efecto de mutaciones puntuales en DdFXN y hFXN.** Se muestra la correlación en las diferencias de energía calculadas para un scan de alanina entre frataxina humana (Hs FXN) y DdFXN para: **A)** todos los residuos de la proteína, **B)** residuos no conservados, **C)** residuos conservados sin incluir los involucrados en FA y **D)** residuos conservados involucrados en FA. Una mayor correlación indica que el cambio en energía asociado a la mutación de ese residuo es semejante en ambas proteínas. (figura modificada de [41])

## Resultados

### Parte 2: Evaluación de la complementación estructural y funcional del supercomplejo humano con Dd FXN

#### 2.1. Introducción: Evaluación de la complementación estructural mediante ensayos de anisotropía de fluorescencia

Con el objetivo de evaluar la capacidad de DdFXN para interactuar con el complejo humano decidimos realizar una serie de ensayos de anisotropía de fluorescencia. Estos ensayos se realizan habitualmente con numerosos propósitos, uno de los más usuales es detectar y caracterizar la interacción de una molécula fluorescente con otras moléculas, siguiendo el cambio en su valor de anisotropía [43] (Figura 8).



**Figura 8: Esquema de un ensayo de anisotropía.** *Izq.*, La molécula A se marca con una sonda fluorescente, ésta molécula en solución gira a una velocidad dada y produce un valor de anisotropía ( $r$ ); al interactuar con la molécula B forma un complejo de mayor tamaño, con lo que su velocidad de giro disminuye y su valor de anisotropía aumenta. *Der.*, La respuesta esperada para un incremento en la concentración de B es un incremento de  $r$  que eventualmente se satura.

El valor de anisotropía ( $r$ ) de una sonda fluorescente está basado en la relación entre la intensidad de emisión polarizada en el eje paralelo y el perpendicular, definidos respecto al eje de polarización de la luz de excitación. Este valor es intrínseco para un fluoróforo rotando a una determinada velocidad y emitiendo a una dada longitud de onda; alteraciones del movimiento del fluoróforo en solución genera cambios en este valor, ya que altera la relación de intensidades entre ejes.

Para una molécula globular, como es el caso de la mayoría de proteínas, el valor de anisotropía depende de muchos factores, como viscosidad del medio, temperatura y tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo; en nuestro caso nos interesa su relación con el

coeficiente de difusión rotacional ( $D$ ), el cuál es mayor mientras más rápido gira el fluoróforo. Partiendo de una proteína marcada fluorescentemente, es posible observar cambios en su anisotropía por alteraciones en la velocidad de rotación y por ende en su coeficiente de difusión rotacional, disminuciones de la velocidad asociadas a oligomerización de la proteína resultan en un incremento de los valores de anisotropía [44].

La selección del fluoróforo es sumamente relevante, algunas de las características deseables para el mismo son que tenga un buen rendimiento cuántico, que tenga un máximo de emisión por fuera de los rangos de emisión intrínsecos de las proteínas, entre otras. Para el caso de la anisotropía de fluorescencia, es importante que el fluoróforo tenga un tiempo de vida media (tiempo entre la absorción y la emisión) compatible con las velocidades de rotación que se pretenden evaluar, ya que si el fluoróforo rota demasiado antes de emitir no será posible detectar cambios en la anisotropía, y el valor de esta se corresponderá siempre al valor mínimo posible.

Los fluoróforos más comúnmente utilizados en ensayos de fluorescencia incluyen derivados de fluoresceína y rodamina, fluoróforos BODIPY y sondas Alexa Fluor [43]. Una lista completa y detallada de los fluoróforos más usados se puede encontrar en la referencia [45].

Otra cualidad relevante es que el espectro de emisión sea el mismo independientemente de en qué complejo se encuentra el fluoróforo, es decir, que el fluoróforo emita con la misma intensidad durante todo el ensayo, independientemente de con qué interactúe. La anisotropía total de una muestra está dada por la siguiente sumatoria:

$$r = \sum f_i \cdot r_i \quad (1)$$

Donde  $i$  es cada especie emitiendo en la longitud de onda medida,  $f_i$  es su fracción de intensidad de fluorescencia y  $r_i$  su valor de anisotropía. En estos ensayos se utiliza el valor de anisotropía como indicador de la fracción molar de cada especie, cuando en realidad la anisotropía depende de la fracción de intensidad de cada especie; estos dos valores, sin embargo, son iguales si el espectro de emisión del fluoróforo es independiente del complejo que forma. Es por esto que se busca esta cualidad en el mismo.

De esta manera, podemos marcar FXN con una sonda fluorescente y evaluar en tiempo real cambios en su estado de oligomerización a partir de alteraciones en sus valores de anisotropía. Esta aproximación presenta varias ventajas en contraposición a otras técnicas para evaluar interacción entre proteínas, la principal es la posibilidad extraer de los

resultados valores de constantes de disociación (Kd), que nos permiten comparar la afinidad de hFXN y DdFXN por el supercomplejo .

Dos diseños experimentales fueron propuestos con este fin. El primero consistió en utilizar el supercomplejo con hFXN previamente marcada fluorescentemente, y seguir por anisotropía la liberación de esta al agregar concentraciones crecientes de DdFXN como competidor. El segundo consistió en marcar DdFXN y seguir por anisotropía la oligomerización de esta al agregar concentraciones crecientes de NIAU (complejo NFS1, ISD11, ACP, ISCU).

## **2.2. Competencia entre hFXN marcada con Texas-red y DdFXN por la interacción con el supercomplejo humano NFS1-ISD11-ACP-ISCU**

En este experimento seguimos por anisotropía la disociación de hFXN del supercomplejo humano ante el agregado de concentraciones crecientes de DdFXN como competidor.

Este diseño se basa en la caracterización de inhibidores competitivos mediante la determinación del IC50, la concentración de competidor a la cual se desplaza la mitad del ligando. Existen varios métodos para la obtención de este parámetro, en nuestro caso optamos por un ajuste logístico que relaciona la fracción de ligando unido y la concentración de competidor:

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{X}{IC50}\right)^H} \quad (2)$$

Donde **Y** es la fracción de hFXN unida al supercomplejo (fracción de ligando unido), **X** es la concentración total de DdFXN (competidor), **Min** es el valor mínimo de Y alcanzado, **Max** el máximo y **H** es el coeficiente de Hill. Este ajuste requiere estimar 4 parámetros, Min, Max, H y el IC50.

El valor de IC50 puede luego utilizarse para determinar la constante de disociación del inhibidor (Ki), que en nuestro caso sería el Kd de la unión entre DdFXN y el supercomplejo humano, mediante la siguiente ecuación [46]:

$$IC50 = \left( \frac{f_0 \cdot Kd}{(1 - f_0) \cdot (2 - f_0)} + \frac{f_0 \cdot L_0}{2} \right) \left( \frac{Ki \cdot (2 - f_0)}{Kd \cdot f_0} + 1 \right) \quad (3)$$

Donde **f0** es la fracción de hFXN unida inicialmente, **L0** es la concentración total de hFXN y **Kd** es la constante de disociación de hFXN y el supercomplejo, que tiene un valor bibliográfico de 3.32 µM [20]. Es importante mencionar que esta relación entre IC50 y Ki

tiene como supuestos que DdFXN compite por el mismo sitio de unión que hFXN, y que la relación entre sitios de unión para hFXN y DdFXN es 1 a 1.

Dado que hFXN no posee cisteínas que puedan ser marcadas, se utilizó una mutante con el cambio serina 202 por cisteína (hFXN S202C). El diseño experimental que se utilizó está basado en un trabajo previo por Das et al. donde se utilizó la sonda Texas-red maleimida para marcar hFXN S202C [47].

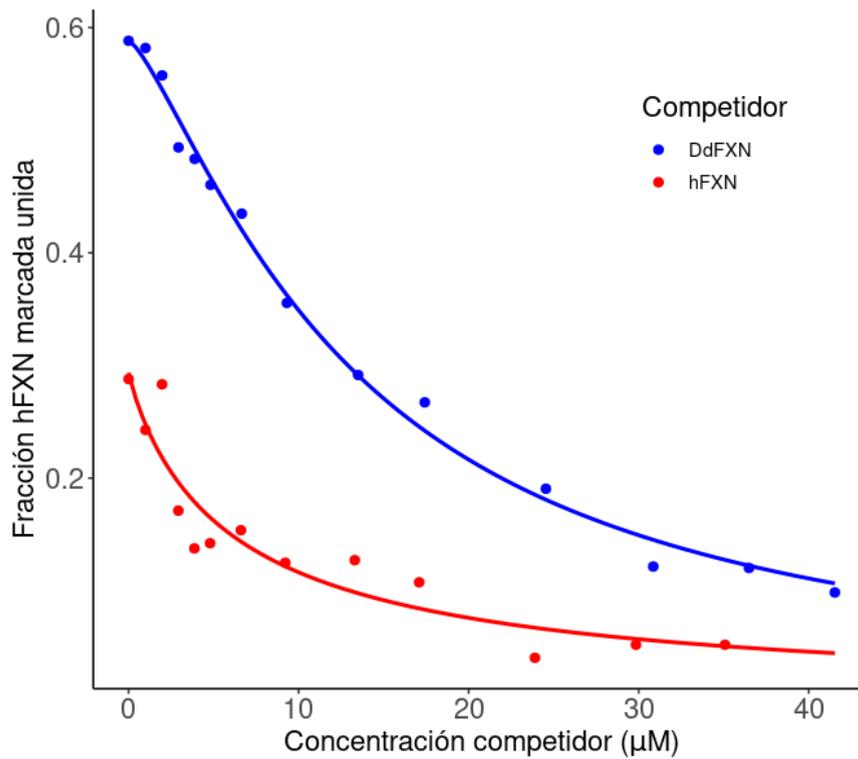
El experimento en sí parte de una mezcla de hFXN S202C marcada, NIA e ISCU, luego se sigue el cambio de anisotropía para concentraciones crecientes de DdFXN. A modo de control de la técnica, repetimos el experimento utilizando hFXN sin marcar como competidor en lugar de DdFXN, el valor de Kd para hFXN obtenido de este experimento debería coincidir con los valores bibliográficos.

El primer ajuste que se le realizó a los datos predijo los 4 parámetros de la ecuación logística (Min, Max, H e IC50), los supuestos del ajuste se cumplen pero los valores predichos para estos parámetros poseen demasiada incertidumbre (Tabla 1).

**Tabla 1:** Parámetros obtenidos del ajuste logístico a los datos. Los valores presentados representan intervalos de confianza al 95%.

	<b>DdFXN</b>	<b>hFXN</b>
<b>Max</b>	0.285 ± 0.025	0.29 ± 0.07
<b>Min</b>	0.09 ± 0.12	0.01 ± 0.2
<b>H</b>	2.515 ± 2.865	0.945 ± 1.175
<b>IC50 (µM)</b>	<b>14.545 ± 9.515</b>	<b>5.895 ± 10.325</b>
<b>Suma de residuos cuadrados</b>	0.00344	0.00935

Para mejorar la precisión de los resultados decidimos fijar el valor de uno de los parámetros, de manera que no deba ser predicho por el ajuste. Fijamos Min en 0, ya que teóricamente la fracción unida de hFXN en exceso de DdFXN es cercana a 0, y se realizó el ajuste nuevamente (Figura 9).



**Figura 9. Ajuste logístico a los resultados de competencia entre hFXN y DdFXN seguida por anisotropía.** Se muestran los ajustes a la ecuación 2 de los resultados del ensayo de competencia, utilizando DdFXN o hFXN como competidores, los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los ajustes.

Los resultados de este nuevo ajuste (Tabla 2) muestran valores de  $K_i$  que no difieren significativamente entre FXNs, sin embargo aún hay mucha incertidumbre en los valores obtenidos, sobre todo para hFXN. El valor de  $K_i$  obtenido para hFXN no difiere significativamente del bibliográfico ( $3.24 \pm 2.55 \mu\text{M}$  vs  $3.32 \mu\text{M}$ ).

**Tabla 2:** Parámetros obtenidos del ajuste fijando Min = 0. Se muestra también el Ki ( $\mu\text{M}$ ) obtenido a partir del IC50. Los valores presentados representan intervalos de confianza al 95%.

	<b>DdFXN</b>	<b>hFXN</b>
<b>Max</b>	0.585 $\pm$ 0.025	0.295 $\pm$ 0.065
<b>H</b>	1.325 $\pm$ 0.155	0.915 $\pm$ 0.435
<b>IC50 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>13.285 <math>\pm</math> 1.455</b>	<b>6.31 <math>\pm</math> 4.24</b>
<b>Ki (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>3.65 <math>\pm</math> 0.56</b>	<b>3.24 <math>\pm</math> 2.55</b>
<b>Suma de residuos cuadrados</b>	0.00373	0.00936

De estos resultados vale la pena resaltar que la existencia de competencia sugiere que DdFXN se une al mismo sitio que hFXN en el supercomplejo. Sin embargo, los resultados no son conclusivos en cuanto a la diferencia en las afinidades de las FXNs por el supercomplejo.

### **2.3. Interacción de DdFXN marcada con Texas-red con el complejo humano NFS1-ISD11-ACP-ISCU**

Con el objetivo de evaluar de una manera directa la complementación estructural entre DdFXN y el supercomplejo humano, utilizamos DdFXN marcada fluorescentemente y seguimos por anisotropía la interacción de la misma a concentraciones crecientes de NIAU.

#### **2.3.1. Preparación de DdFXN marcada**

Al igual que hFXN, decidimos marcar DdFXN utilizando la sonda Texas-red maleimida. Convenientemente, DdFXN cuenta con dos cisteínas en su secuencia (C35 y C110), previo a la marcación con Texas Red y para evaluar la accesibilidad de ambas cisteínas, realizamos una marcación con iodoacetamida (IAA). La IAA reacciona con los tioles libres bloqueandolos irreversiblemente (Figura 10). Se trató una solución concentrada de DdFXN con IAA en relación 1:10, se separó la proteína del exceso de IAA y se evaluó el estado de oxidación de los tioles mediante tratamiento con DTNB (reactivo de Ellman, ver materiales y

métodos, sección “cuantificación de tioles libres”). El resultado mostró que la proteína marcada no poseía tioles libres, indicando que ambas se encontraban modificadas. En consecuencia, este resultado implicó que, en esas condiciones, ambas cisteínas de DdFXN estarían disponibles para ser marcadas con Texas Red maleimida.



**Figura 10: Esquema de la reacción entre el tiol libre de una cisteína y una molécula de iodoacetamida.** El enlace covalente resultante no es reversible y la cisteína deja de estar disponible para ser marcada.

Sin embargo, marcar ambas cisteínas con Texas-red podría traer varios problemas. El primero es que esta sonda tiene un tamaño relativamente elevado (625.2 g/mol de Texas red contra 13.7 kg/mol de proteína) con lo que la unión de dos moléculas podría causar cambios en la estabilidad de la proteína. Por otra parte, si suponemos que la superficie de interacción DdFXN-NIAU es similar a la de hFXN-NIAU (suposición validada por el mayor grado de conservación evolutiva en la región de interacción de hFXN respecto al resto de la proteína), debemos considerar la posición relativa de cada cisteína a esta superficie de interacción. Además, en vista del resultado de la marcación con IAA, no existirían grandes diferencias en la accesibilidad de dichas cisteínas. Por estas razones, decidimos no marcar DdFXN *wt*, sino mutar una de sus cisteínas de manera de poder marcar exclusivamente la restante. Decidimos marcar con la sonda fluorescente a la cisteína 110, ya que esta es la más alejada de la superficie hipotética de interacción, con lo que se mutó la cisteína 35 por alanina (DdFXN C35A) de manera de no marcarla.

La mutación se realizó mediante mutagénesis dirigida sobre el plásmido original de DdFXN. El vector obtenido fue utilizado para expresar la mutante DdFXN C35A. El protocolo de purificación utilizado fue el mismo de DdFXN *wt* (ver materiales y métodos, sección “Purificación de DdFXN”). Se cuantificaron los tioles libres de la proteína obtenida para corroborar la mutación, partiendo de una concentración de 22  $\mu\text{M}$  de proteína determinamos una concentración de tioles de 20  $\mu\text{M}$  aproximadamente, corroborando la presencia de un único tiol por proteína.

La proteína purificada fue luego marcada con Texas-red maleimida, obteniéndose finalmente una concentración de 128  $\mu\text{M}$  de proteína total y 63  $\mu\text{M}$  de proteína marcada, la marcación tuvo una eficiencia de alrededor del 50%.

### 2.3.2. Ensayos de anisotropía de fluorescencia utilizando DdFXN C35A marcada

Una vez realizada y caracterizada la marcación de DdFXN C35A con Texas Red maleimida, pasamos a realizar los experimentos de anisotropía. Como se mencionó anteriormente, el diseño consiste en evaluar la interacción de DdFXN a medida que se incrementa la concentración de NIAU.

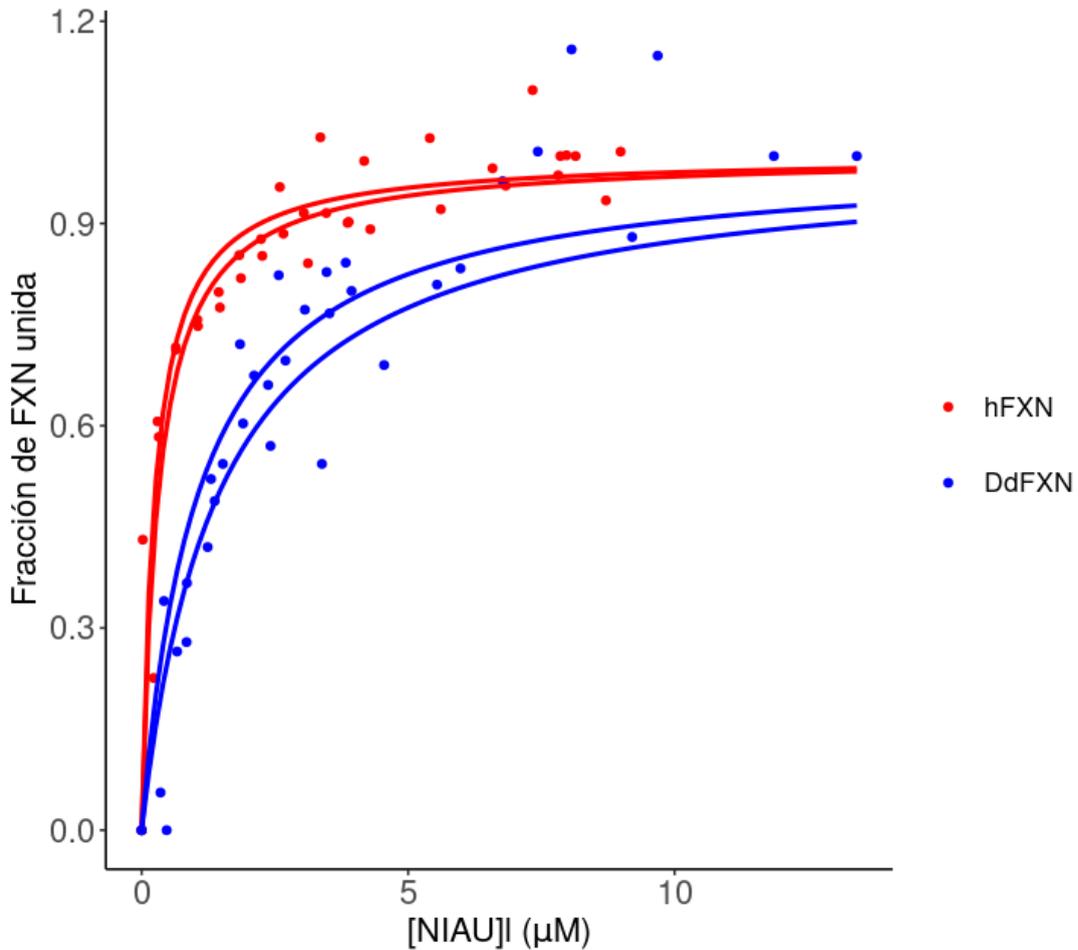
Se partió de una mezcla de DdFXN C35A marcada e ISCU a concentración elevada (25  $\mu\text{M}$ ) para asegurar que esta no sea un factor limitante para la formación del complejo. Luego se registró el cambio de anisotropía a concentraciones crecientes de NIA.

Al igual que en el experimento de competencia, las medidas de anisotropía se transforman a fracción de proteína unida, valor que se relaciona con la constante de disociación ( $K_d$ ) DdFXN-NIAU mediante la siguiente ecuación:

$$X = \frac{[NIAU]l}{K_d + [NIAU]l} \quad (4)$$

Donde **[NIAU]** es la concentración de NIAU (NFS1-ISD11-ACP-ISCO) libre en el medio. Esta ecuación parte del supuesto de que NIAU y FXN interactúan como dos moléculas, cuando en realidad NIAU está conformada por varias proteínas. A pesar de esto, tratar al sistema como uno de solo dos componentes no es del todo errado, ya que la afinidad de FXN por NIA o ISCU por separado es despreciable, mostrando solo una interacción fuerte por el complejo NIAU [48].

Finalmente realizamos el ajuste no lineal a la ecuación 4 sobre los resultados. Este experimento se realizó dos veces para DdFXN y dos para hFXN (Figura 11). Los supuestos de los ajustes se cumplen, y los valores de  $K_d$  estimados (Tabla 3) poseen mucha menos incertidumbre que los obtenidos en los experimentos de competencia, este hecho resulta esperable ya que se estima un único parámetro en lugar de tres.



**Figura 11: Interacción de DdFXN con el supercomplejo humano formador de centros Fe-S monitoreada por anisotropía.** Los puntos discretos representan los datos experimentales, las líneas llenas representan el ajuste a los datos experimentales de interacción entre DdFXN y el supercomplejo humano (azul) e interacción entre hFXN y supercomplejo (rojo), se muestran dos réplicas por ensayo.

Los resultados de este experimento muestran un valor de  $K_d$  mayor para DdFXN con respecto a hFXN en su interacción con el supercomplejo humano, denotando una menor afinidad por el mismo (Tabla 3). La diferencia entre valores sin embargo es muy baja, DdFXN muestra una afinidad considerable por el supercomplejo humano. Esto es consistente con el mayor grado de conservación que se observa sobre la superficie de interacción entre FXNs, y sugiere que el mecanismo por el cual FXN interactúa con el supercomplejo es muy similar entre humanos y *D. discoideum*.

**Tabla 3:** Kds obtenidos del ajuste a los datos para ambas réplicas de los experimentos de *binding*.

	<b>hFXN 1</b>	<b>hFXN 2</b>	<b>DdFXN 1</b>	<b>DdFXN 2</b>
<b>Kd (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>0.248 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>0.313 <math>\pm</math> 0.094</b>	<b>1.06 <math>\pm</math> 0.36</b>	<b>1.455 <math>\pm</math> 0.385</b>
<b>Suma de residuos cuadrados</b>	0.09239	0.07642	0.1258	0.0997

Demostrada la capacidad de DdFXN para interactuar con el supercomplejo humano, resta evaluar si esta interacción se traduce en una activación del mismo.

#### **2.4. Complementación funcional del supercomplejo humano con DdFXN y seguimiento de la actividad cisteína desulfurasa mediante el método del azul de metileno**

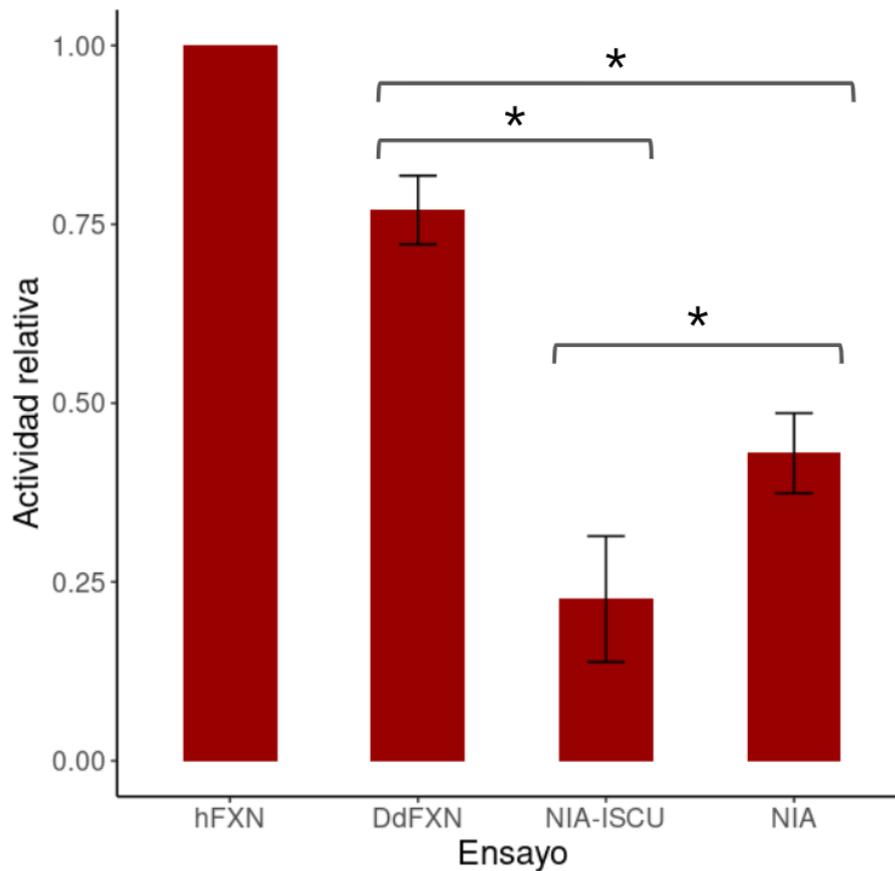
Con el objetivo de evaluar el grado de conservación en el mecanismo de formación de centros ferrosulfurados, pasamos a determinar la capacidad de DdFXN para activar al supercomplejo humano, en comparación con hFXN.

Como mencionamos previamente, la FXN actúa como modulador cinético de los dos primeros pasos en el proceso de formación de centros [2Fe-2S]. La técnica aquí ensayada, utiliza como indicador de la actividad cisteína desulfurasa a la formación del persulfuro sobre NFS1 [14], detectándolo mediante el método del azul de metileno [49]. Esto implica que estaremos evaluando la capacidad de DdFXN de activar sólo el primero de los dos pasos modulados por FXN.

Se prepararon mezclas de NIA, ISCU, hFXN o DdFXN, PLP y DTT y se inició la reacción mediante el agregado de L-cisteína y hierro(II). Se prepararon adicionalmente 3 (tres) controles, uno de NIA e ISCU sin FXN, uno de solo NIA y un blanco sin proteínas. La reacción se deja transcurrir y luego se cuantifica el persulfuro formado mediante el método de azul de metileno.

La actividad enzimática del supercomplejo es sumamente sensible al oxígeno. El proceso de formación de centros ferrosulfurados ocurre en la matriz mitocondrial, un ambiente considerablemente anaerobio, la presencia de oxígeno disminuye considerablemente la actividad desulfurasa [14]. Óptimamente este ensayo debería realizarse en una atmósfera empobrecida en oxígeno; dado que este no es nuestro caso, es posible que las actividades

observadas sean menores a las fisiológicamente esperables, y esto podría tener efectos sobre la sensibilidad del método.



**Figura 12: Actividad desulfurasa de distintos complejos, relativas a la actividad del complejo humano.** Referencias: hFXN: complejo humano con hFXN, DdFXN: complejo humano con DdFXN, NIA-ISCU: complejo sin FXN, NIA: soloNFS1, ISD11 y ACP. Los valores de actividad se muestran relativizados a la actividad promedio de hFXN. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% obtenidos mediante un ANOVA. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparaciones de Tukey, todos los valores difieren significativamente entre sí.

Los resultados de actividad (Figura 12) muestran una actividad moderada del supercomplejo humano complementado con DdFXN. Esta actividad es menor a la alcanzada por el supercomplejo humano en presencia de hFXN, y alcanza valores de alrededor del 75% relativo a la activación por hFXN. Este valor es superior a la actividad cisteína desulfurasa basal de NIA (en ausencia de hFXN), lo que demuestra que DdFXN efectivamente actúa como un activador del proceso.

Por otra parte, el valor menor de NIA-ISCU en comparación con NIA coincide con reportes previos [50], la conformación que asume el complejo NIA-ISCU en ausencia de FXN claramente representa un impedimento para la actividad cisteína desulfurasa de NIA. En base a estos resultados, DdFXN sería capaz de recuperar, al menos parcialmente, la conformación activa del supercomplejo humano.

## **2.5. Discusión**

En este capítulo se evaluó la capacidad de DdFXN para interactuar con el supercomplejo humano para la formación de centros ferrosulfurados y para activar la actividad desulfurasa del mismo, comparando en ambos casos con hFXN.

En principio, la interacción DdFXN con el supercomplejo humano se evaluó mediante ensayos de anisotropía de fluorescencia (Sección 2.3). Estos ensayos mostraron una clara interacción entre DdFXN y el supercomplejo humano, tanto en el ensayo de competencia como el de interacción.

Ambos ensayos, sin embargo, muestran diferencias notables en cuanto a la precisión de los parámetros que se desprenden del ajuste. Los parámetros obtenidos en los ensayos de competencia, presentan mucha más incertidumbre (Sección 2.2, Tabla 1). En este sentido, en un ajuste no lineal, la precisión global de los resultados depende en gran medida del número de datos medidos y el número de parámetros a estimar. En nuestro caso, la ecuación utilizada para el ajuste a los resultados de competencia tiene 4 (cuatro) parámetros que deben ser estimados, Máx, Mín, IC50 y H, tres en el caso donde se fijó el valor de Mín a 0.

Adicionalmente, la incertidumbre en los parámetros depende del número de datos que hay en la región de la curva que define este parámetro. En el caso del ensayo de competencia, se puede ver que hay pocas, o ninguna, mediciones correspondientes a la región de máxima interacción entre hFXN marcada y NIA, valores que aportan a la predicción del parámetro Máx. Esta falta de representación resulta en una estimación pobre y poco precisa de este parámetro, perjudicando también la estimación del resto de los parámetros. Para ejemplificar esto, si se repiten estos ajustes fijándose también el valor del parámetro Máx, podemos ver que los parámetros estimados son considerablemente más precisos (Tabla 4), el IC50 para DdFXN pasa de un intervalo de confianza de alrededor de 3  $\mu\text{M}$  a uno de 1.7  $\mu\text{M}$  y para hFXN el intervalo pasa de 8.5  $\mu\text{M}$  a 4  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 4:** Parámetros estimados de los ensayos de competencia al fijar tanto Máx como Mín. Los valores de Máx utilizados son un punto medio del intervalo de confianza obtenido anteriormente.

	<b>DdFXN</b>	<b>hFXN</b>
<b>Máx (fijado)</b>	0.6	0.3
<b>IC50 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	12.75 $\pm$ 0.85	6.00 $\pm$ 2.00
<b>H</b>	1.28 $\pm$ 0.12	0.9 $\pm$ 0.3

El efecto del número de parámetros estimados es tal que los ajustes de los ensayos de interacción, cuyos datos aparentan tener mucha más dispersión que los de competencia, resultaron mucho más precisos ya que se estima tan solo un parámetro en comparación a tres (Tabla 3 vs. Tabla 2).

Estas observaciones resaltan la importancia del diseño experimental racional, considerando el análisis de los datos que se pretenden obtener. El conocimiento del método de ajuste y su potencia, así como las limitaciones del mismo (número de parámetros a estimar, densidad de datos en distintas regiones de la curva, etc) ayudan a decidir qué tipos de ensayos son los mejores para responder cada pregunta.

Dicho esto, los valores de Kd estimados para hFXN y DdFXN, tanto en el ensayo de competencia como el de *binding*, difieren muy poco entre sí. Estos hallazgos refuerzan la noción de que la interacción entre FXN y el supercomplejo está conservada evolutivamente, y se coinciden con nuestras observaciones computacionales previas [41] sobre el mayor grado de conservación de la superficie de interacción de FXN.

Adicionalmente, las mediciones de actividad demostraron que DdFXN es capaz de activar al supercomplejo humano en su actividad desulfurasa. Como se mencionó antes, el ensayo realizado evalúa sólo uno de los dos pasos modulados por FXN en la síntesis de los centros Fe-S, con lo que estos resultados muestran una conservación parcial en el proceso de activación por FXN, pero no son representativos de la totalidad del efecto de la misma sobre la formación efectiva de centros Fe-S.

El segundo paso, que no está siendo evaluado, implica grandes cambios conformacionales dentro del supercomplejo que permiten la relocalización del persulfuro formado sobre NFS1 al sitio activo sobre ISCU [16], valdría la pena en futuros experimentos evaluar la capacidad

de DdFXN para activar esta transferencia del persulfuro, ya que esto permitiría determinar más ampliamente el grado de conservación funcional de la misma respecto a su homóloga humana.

### **Parte 3: Evaluación de la posible formación de un puente disulfuro intracatenario en DdFXN**

#### **3.1. Introducción**

En trabajos anteriores, hemos obtenido un modelo 3D de DdFXN mediante modelado por homología utilizando como molde hFXN [41]. Para evaluar la confianza en ese tipo de modelos se utilizan habitualmente dos parámetros, GMQE y QMEAN-Z. El valor de GMQE refleja la precisión esperada para el modelo resultante de un dado alineamiento y molde. Es un valor que oscila entre 0 y 1, valores más cercanos a 1 indican mayor confianza en el modelo. QMEAN-Z indica la verosimilitud de que el modelo obtenido sea de semejante calidad a la estructura obtenida de un cristal, valores cercanos a 0 indican una buena correlación mientras que valores menores a -4 una estructura de baja calidad [51,52]. En particular, este modelo posee un GMQE = 0.75 y QMEAN-Z = -0.64.

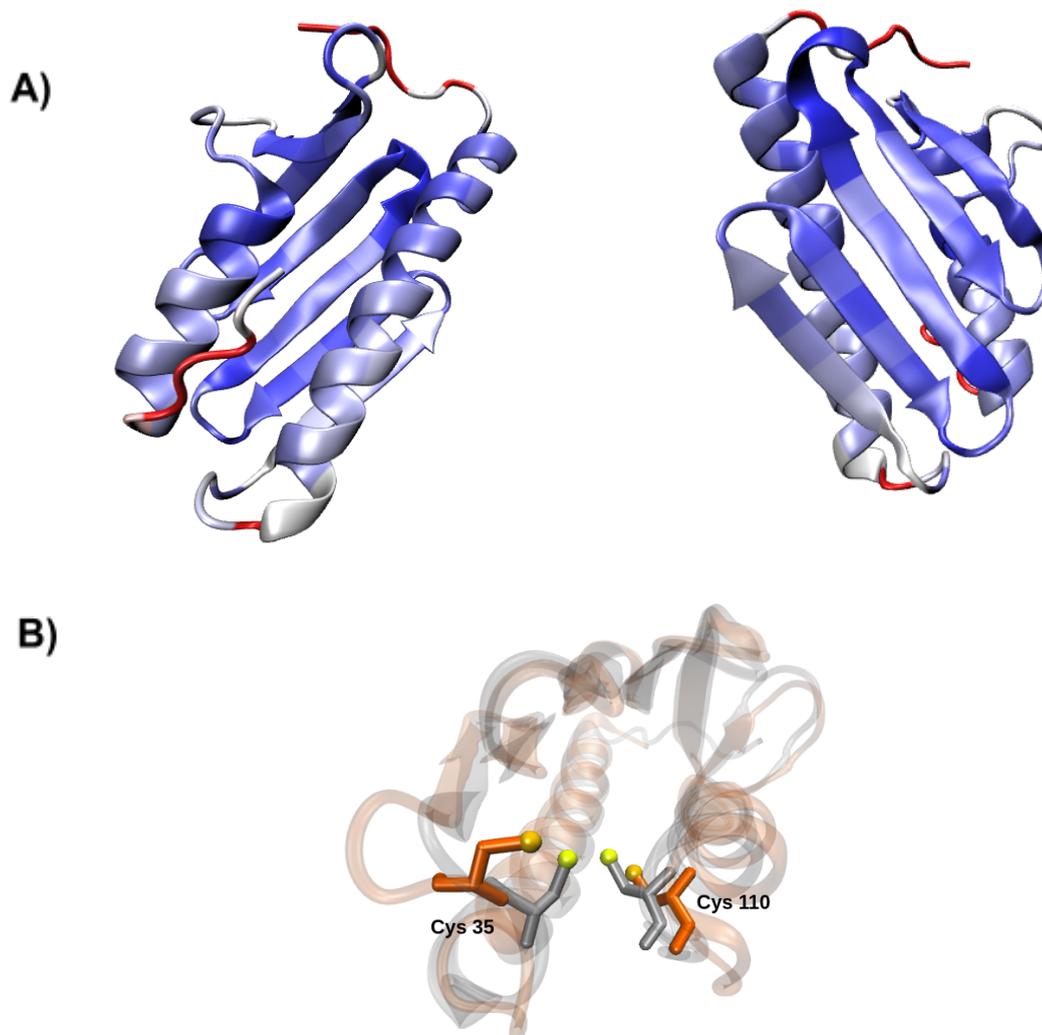
Es un hecho conocido que los modelados por homología pueden presentar algunos problemas. De especial relevancia para nuestros estudios es el hecho de que una DdFXN modelada utilizando hFXN como molde está sesgada indefectiblemente a presentar una gran similitud con hFXN. Este hecho dificulta los análisis de tipo comparativos entre estas dos proteínas ya que los resultados podrían indicar un parentesco estructural mayor al real. Lo óptimo sería contar con una estructura de DdFXN resuelta experimentalmente, o en su defecto, una estructura predicha por un método de modelado sin moldes como por ejemplo AlphaFold2.

#### **3.2. Obtención de un nuevo modelo de DdFXN utilizando AlphaFold2**

Durante la realización de esta tesis se hizo público el algoritmo de predicción estructural AlphaFold2 [53], el cual utilizamos para preparar un nuevo modelo de DdFXN. Este algoritmo ha demostrado un nivel de precisión ampliamente superior al de otros métodos, con un RMSD promedio entre pares predicción-cristal de 1.5 Å y se ha observado una buena predicción de rotámeros cuando la calidad del esqueleto de carbono es alta [53]. Este nuevo modelo de DdFXN posee un valor de pLDDT superior a 80 (en una escala que

va de 0 a 100) para la mayor parte de la proteína, el IDDT es una métrica que indica que tan bien representadas están las interacciones locales de una estructura predicha, utilizando otra estructura como referencia. AlphaFold2 utiliza como parámetro de calidad una predicción del IDDT para los carbonos alfa llamada pLDDT [54], valores superiores a 70 son considerados confiables, con lo que la estructura obtenida es confiable tanto en carbonos alfa como rotámeros.

Al superponer las estructuras de ambos modelos (el modelo por homología realizado previamente y el modelo realizado mediante AlphaFold2), mediante la realización de un alineamiento estructural usando el programa VMD [55], no se observan grandes diferencias en cuanto a las posiciones de los carbonos alfa salvo para las regiones *loop* que conectan segmentos de estructura secundaria (Figura 13).



**Figura 13: Superposición de los modelos de DdFXN generados mediante modelado por homología y AlphaFold2** A) Se muestra sobre el modelo de AlphaFold el RMSD entre estructuras (AlphaFold y homología),

siendo rojo un valor alto (poca coincidencia entre estructuras) y azul un valor bajo (buena coincidencia entre estructuras). **B)** Se muestra la diferencia en la orientación de las cisteínas 35 y 110 de ambos modelos (gris AlphaFold y naranja modelado por homología).

Los algoritmos utilizados difieren considerablemente en la elección de rotámeros para las cadenas laterales. Particularmente, los modelos difieren en la elección del rotámetro para la cisteína 35, el cual en el modelo de AlphaFold asume una conformación que acerca considerablemente las cisteínas 35 y 110 (distancia menor a 3 Å), y sugiere la formación de un puente disulfuro intracatenario (Figura 13).

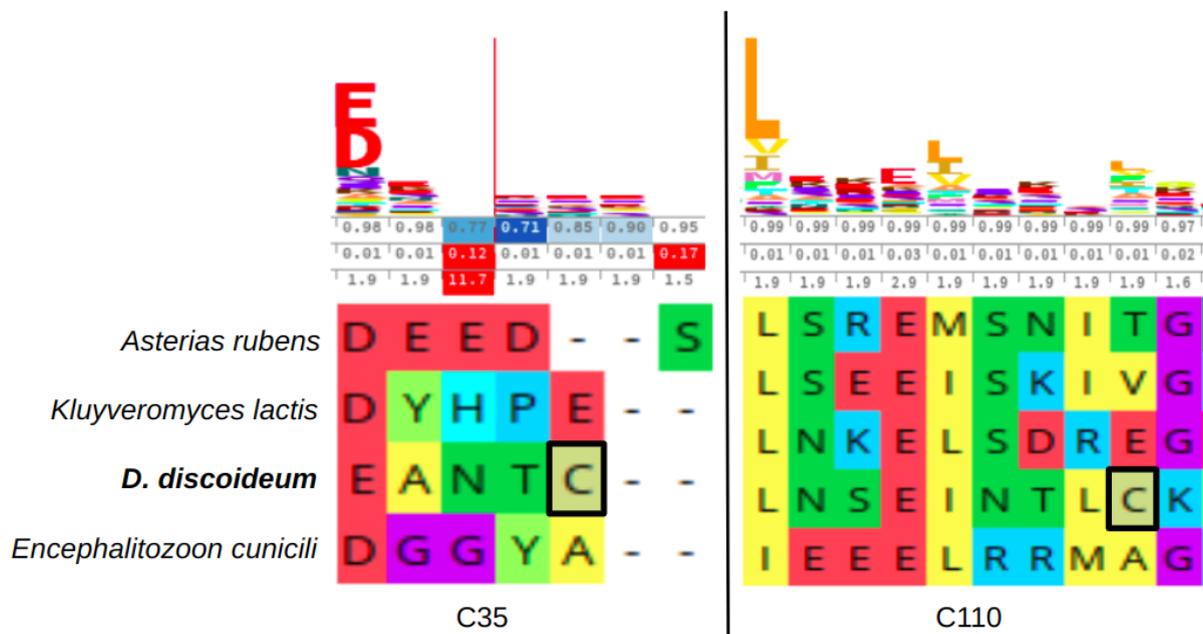
La posible presencia de un puente disulfuro en la estructura no es un detalle menor, ya que la formación del mismo podría resultar en cambios considerables en la estabilidad y flexibilidad de la proteína, pudiendo incluso alterar su función. Por este motivo, ante esta nueva información brindada por el modelo de AlphaFold, consideramos relevante determinar si este puente disulfuro podría efectivamente formarse en nuestras condiciones de trabajo, y si esto llevaría a cambios estructurales o funcionales relevantes en la proteína.

### **3.3. Análisis del grado de conservación evolutiva de las cisteínas involucradas en el puente disulfuro**

Ante este hallazgo estructural, nos planteamos que de ser el puente disulfuro entre las cisteínas 35 y 110 de DdFXN relevante estructural o funcionalmente, sería esperable que las cisteínas involucradas se encontraran conservadas evolutivamente.

Con el objetivo de explorar dicha hipótesis, se tomó un alineamiento múltiple de alrededor de 50 secuencias de FXN eucariotas, preparado durante trabajos anteriores [24], y se determinó el grado de conservación de estas cisteínas. Luego de este análisis, encontramos que la cisteína 110 se encuentra conservada solo en el 22% de las secuencias, mientras que la cisteína 35 es un rasgo único de *D. discoideum*.

Adicionalmente, evaluamos la relevancia que posee cada una de estas posiciones, para esto buscamos en pfam [56] la familia de proteínas correspondiente a FXN (*Frataxin\_Cyay*, PF01491) e identificamos en el logo del HMM las posiciones de ambas cisteínas (Figura 14). La cisteína 110 pertenece a una posición moderadamente informativa, denotado por la altura en el logo, mientras que la cisteína 35 parece pertenecer a una inserción, de hecho, estructuralmente se ubica en una región *loop*, donde es habitual encontrar inserciones.



**Figura 14: Identificación de las posiciones del HMM correspondientes a las cisteínas en el MSA.** Se puede observar que la región a la que pertenece C35 potencialmente se trate de una inserción, en el HMM se observa una línea roja que indica una alta probabilidad de inserciones en esa posición.

Finalmente, realizamos un nuevo alineamiento limitándonos a organismos del grupo *Amoebozoa*, al cual pertenece *D. discoideum*. Este alineamiento está conformado por 37 secuencias recortadas para limitarnos al dominio frataxina y excluir señales de localización mitocondrial. En el alineamiento se observa una conservación de la cisteína 110 del 71%, marcadamente superior al 20% del alineamiento original. Si bien es esperable que al alinear organismos más cercanos evolutivamente se observe un incremento en el grado de conservación en las secuencias, el incremento observado para la cisteína 110 es superior al promedio del resto de residuos. Por su parte, la cisteína 35 sigue siendo un evento único, con lo que este puente disulfuro, de formarse, sería una novedad de *D. discoideum*.

### **3.4. Evaluación experimental de la formación del puente disulfuro**

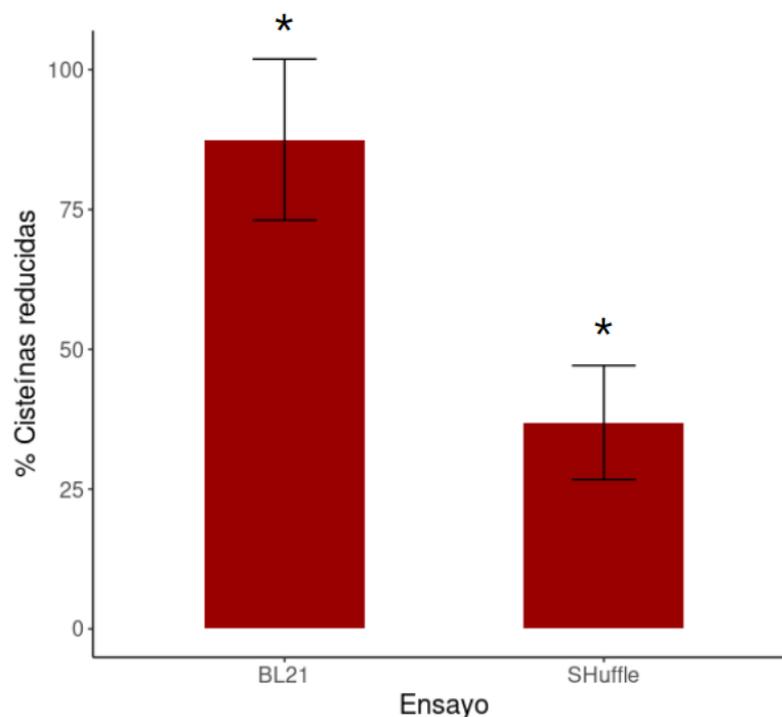
Para explorar la factibilidad de la formación *in vivo* de este puente disulfuro, nos propusimos intentar obtener una forma oxidada de DdFXN. Con este objetivo, se intentó re-expresar la proteína, partiendo del mismo plásmido pero utilizando, en vez de *E. coli* BL21, una cepa de *E. coli* que favorece la formación de puentes disulfuro.

La re-expresión de DdFXN se realizó en la cepa de *E. coli* denominada SHuffle. Esta cepa posee varias modificaciones en sus vías redox citosólicas, particularmente la pérdida de las reductasas Gor y TrxB, así como la sobreexpresión en el citosol de la disulfuro isomerasa de periplasma DsbC. Las modificaciones mencionadas, transforman el citosol de la bacteria en un ambiente oxidante que favorece la expresión y correcto plegado de proteínas con puentes disulfuro intracatenarios [57].

Los protocolos de transformación y purificación para esta cepa son iguales a los utilizados para las purificaciones previas con *E.coli* BL21, con la salvedad de que los precultivos para la purificación se crecieron ON a 30°C y la inducción fue también a 30°C en lugar de 37°C.

El rendimiento obtenido con SHuffle fue algo menor (aprox. 20 mg/litro de cultivo vs. 5 mg/litro de cultivo). El espectro de absorbancia de la proteína coincide con el de DdFXN purificada previamente desde *E.coli* BL21 (ver Materiales y métodos, Sección “Purificación de DdFXN”).

Posteriormente, evaluamos el estado de oxidación de sus cisteínas mediante una cuantificación de tioles libres por tratamiento con DTNB y la comparamos con la proteína purificada en BL21 (Figura 15).



**Figura 15: Cuantificación de tioles libres para DdFXN expresada en BL21 y en SHuffle.** Tioles libres expresados como porcentaje del total de tioles de la muestra. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95% y los asteriscos diferencias significativas.

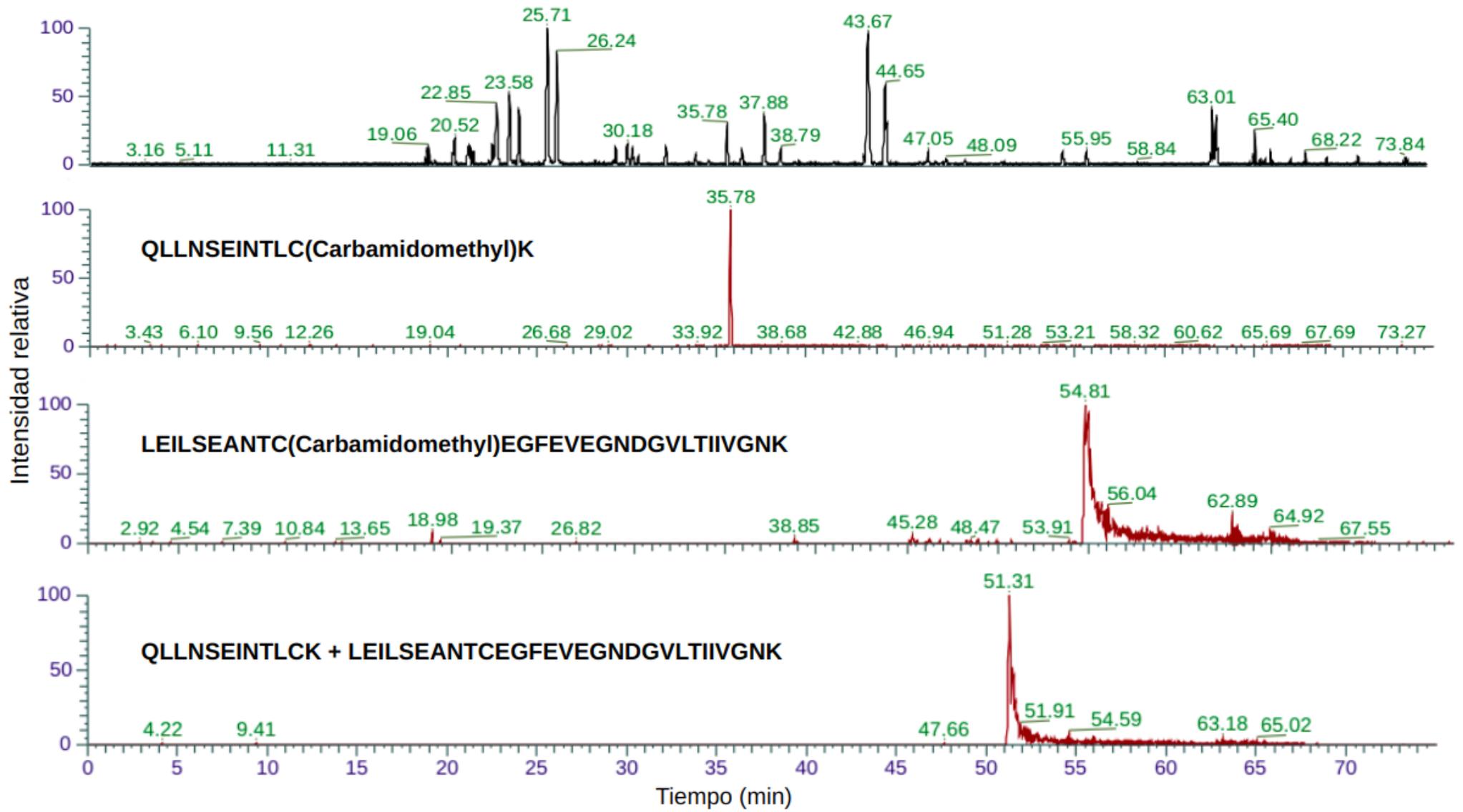
Los resultados muestran un porcentaje total de cisteínas reducidas claramente menor en la proteína purificada en *E. coli* SHuffle. Por otra parte, para verificar el estado de oligomerización de la proteína, la misma fue sometida a un SDS-PAGE en ausencia de Beta Mercaptoetanol. La proteína parece no formar dímeros, con lo cual, de estar formándose el puente disulfuro éste sería intracatenario (tal como se esperaba, resultados no mostrados).

Estos resultados, sin embargo, no permiten determinar con certeza que el puente disulfuro se encuentre formado, para esto decidimos realizar un análisis de espectrometría de masa sobre DdFXN purificada desde la cepa SHuffle. Estos análisis fueron llevados a cabo por el CEQUIBIEM (FCEN, UBA). Resulta importante aclarar que previo a la obtención de los espectros de masa se trató la muestra de DdFXN con iodoacetamida en exceso, de manera de modificar la totalidad de cisteínas reducidas de la muestra. Ésta marca evita que se formen enlaces inesperados entre cisteínas, lo que dificultaría el análisis de la muestra. Luego se realizó una digestión trípica de la proteína.

En la Figura 16 se presentan los resultados obtenidos luego del análisis mediante nanoLC-MS/MS (*nano liquid chromatography - tandem mass spectrometry*). De todos los péptidos trípticos obtenidos, nos interesan 3 en particular, los dos péptidos que incluyen las cisteínas modificadas y el péptido con ambas cisteínas unidas por un puente disulfuro. La presencia de los dos primeros es una señal inequívoca de que en la muestra existe la especie reducida de DdFXN, mientras que la presencia del tercero indica la existencia de la especie oxidada y formando el puente disulfuro intracatenario.

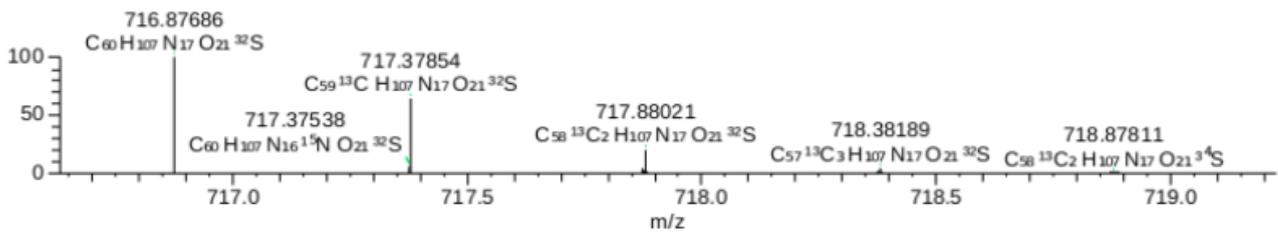
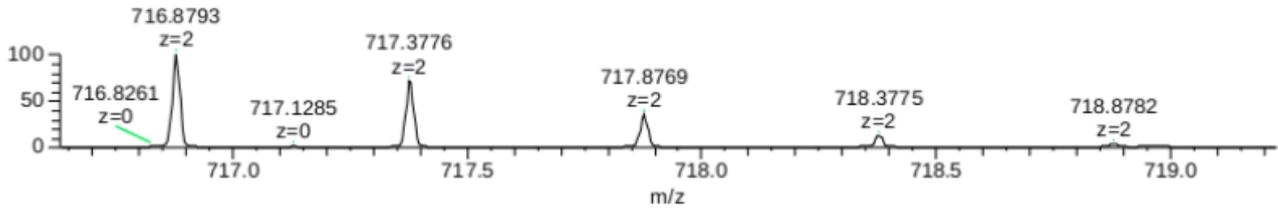
La identidad de cada péptido se corrobora comparando el espectro de masa obtenido con el espectro teórico, predicho a partir de los productos teóricos de la digestión trípica. Los espectros de masa permitieron identificar la presencia en simultáneo de los 3 péptidos buscados (Figura 16 A y B), dejando en claro que la proteína purificada desde SHuffle es una mezcla de las especies con y sin puente disulfuro intracatenario formado, en concordancia con lo hallado de manera general con los experimentos de determinación de tioles libres por DTNB (Figura 15).

A)

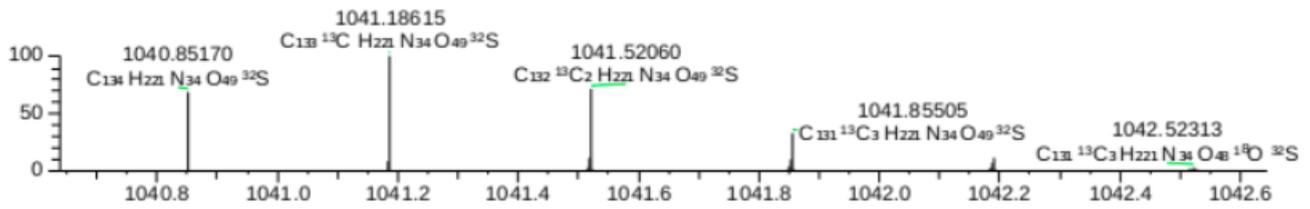
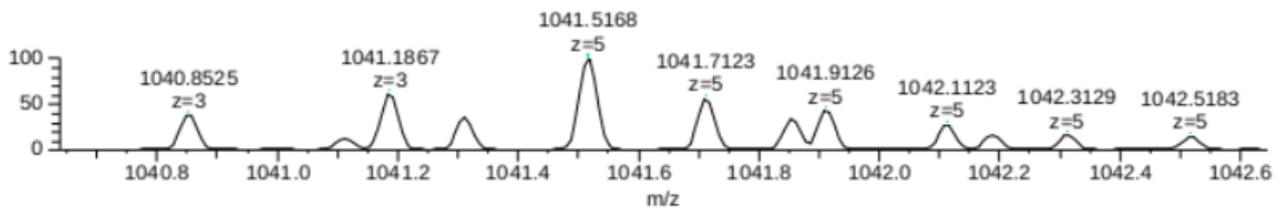


B)

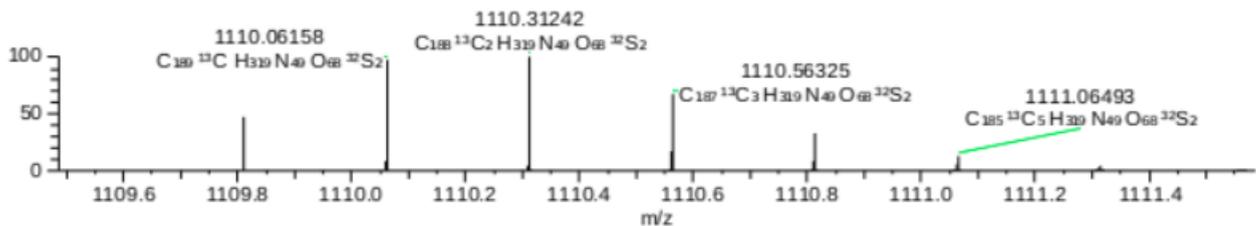
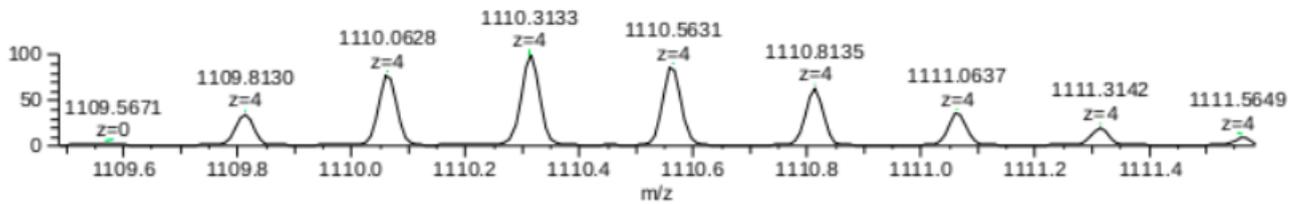
**QLLNSEINTLC(Carbamidomethyl)K**



**LEILSEANTC(Carbamidomethyl)EGFEVEGNDGVLTIIVGNK**



**QLLNSEINTLCK + LEILSEANTCEGFEVEGNDGVLTIIVGNK**



**Figura 16: Resultados del análisis por espectrometría de masa. A)** Cromatograma de la proteína tras marcación con iodoacetamida y digestión triptica. Se resaltan luego los picos correspondientes a las tres especies de interés, en orden de arriba hacia abajo son el segmento que contiene la cisteína 35 marcada con iodoacetamida, el que contiene la cisteína 110 y el que se corresponde a los dos anteriores unidos por un puente disulfuro. La intensidad relativa de los picos no es representativa de las masas originales de cada especie en la muestra original, ya que la detección depende de la capacidad de cada fragmento de ser correctamente ionizado. **B)** Espectros de masa de cada uno de los fragmentos, para cada uno se muestra primero su espectro de masa y luego su espectro teórico, la concordancia entre ambos corrobora la identidad de cada fragmento.

### **3.5. Predicción del efecto de la formación del puente disulfuro sobre la flexibilidad de DdFXN mediante dinámicas moleculares**

La presencia del puente disulfuro intracatenario ha sido demostrada para estas condiciones de expresión en SHuffle de DdFXN, el siguiente paso sería evaluar los posibles efectos del mismo sobre la estructura y funcionamiento de DdFXN. Para este fin, decidimos realizar una serie de dinámicas moleculares.

Se realizaron dinámicas por duplicado para 3 variantes de DdFXN, la versión *wild type* con el puente disulfuro formado, la mutante C35A (la misma que se utilizó en los ensayos de anisotropía) y la mutante C110A. Estas mutantes no poseen el puente disulfuro, ya que tienen mutadas una de las cisteínas involucradas en el mismo.

Con estas dinámicas, nos interesó evaluar si la presencia del puente disulfuro resulta en cambios considerables en la flexibilidad de la proteína y en qué regiones se hacen más notables esos cambios. En particular, evaluamos el RMSD y el RMSF, los dos parámetros por excelencia para evaluar la flexibilidad durante una dinámica molecular.

RMSD (Root Mean Square Deviation) es un parámetro que indica la desviación media de la posición de los residuos en un determinado momento de la simulación respecto a su posición inicial. Se calcula como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad (6)$$

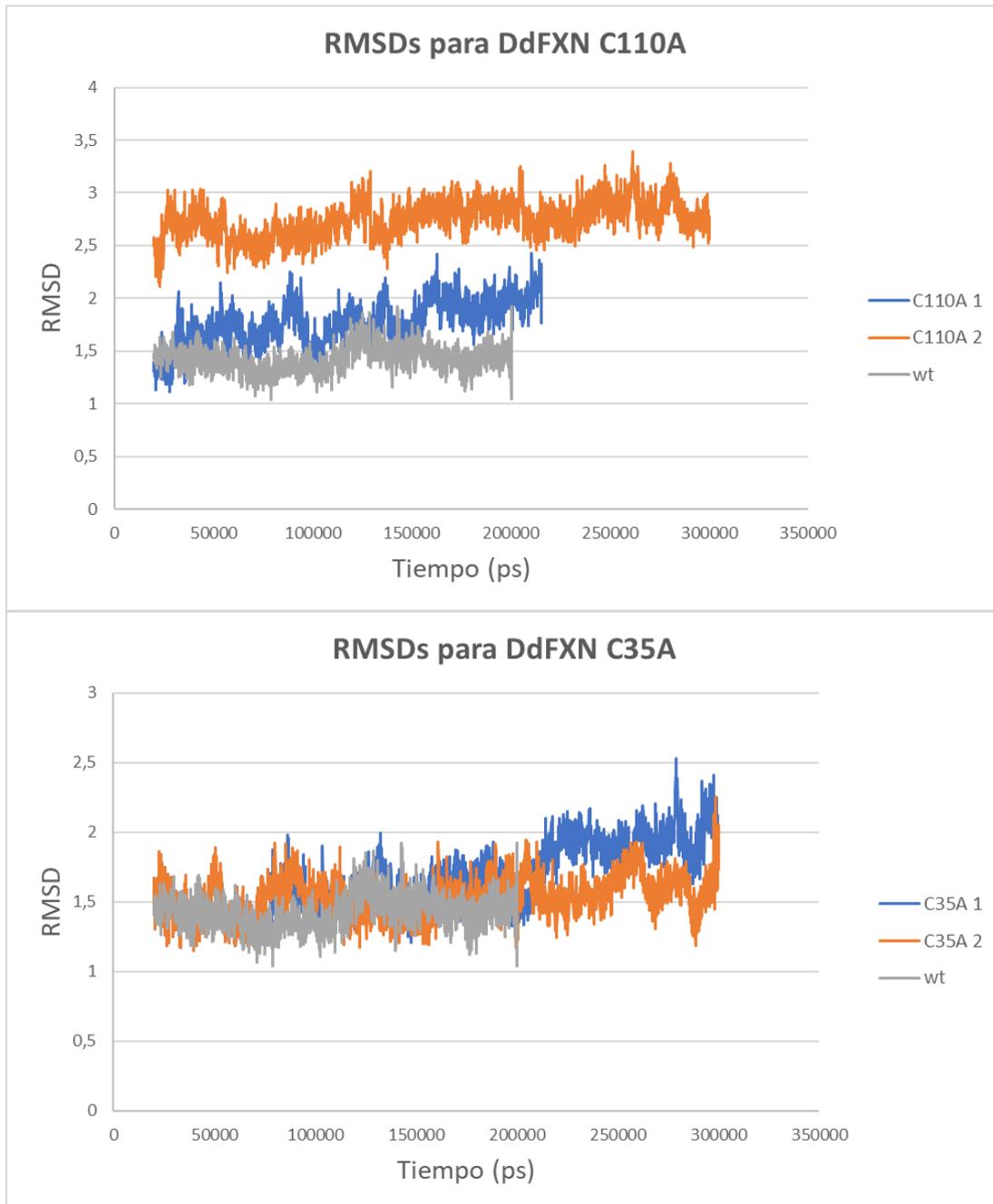
Donde  $\delta$  es la distancia entre la posición actual del residuo y su posición inicial y N es el número de residuos. Este valor es un promedio para toda la proteína que se determina a distintos tiempos de simulación, se puede calcular como un valor promedio para la totalidad de los átomos de un residuo o para los átomos del esqueleto de carbono.

RMSF (Root Mean Square Fluctuation) indica la desviación media de la posición de cada residuo durante toda la dinámica.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \delta_i^2} \quad (7)$$

Donde T es el *frame* de la simulación. Este valor es 1 (uno) por residuo y es un promedio de la desviación del mismo durante toda la dinámica, se grafica en función del residuo.

Es importante aclarar que, usualmente, las dinámicas moleculares atraviesan una etapa de equilibrio durante la cual las posiciones de los residuos pueden sufrir cambios considerables, esta etapa suele recortarse de los cálculos de RMSF y RMSD ya que causa que los valores obtenidos sean muy grandes y no representativos del comportamiento en solución de la proteína. En nuestro caso, el gráfico de RMSD (Figura 17) se muestra a partir de los 20 ns de simulación, y los valores de RMSF (Figura 18) se obtuvieron también excluyendo estos primeros 20 ns.



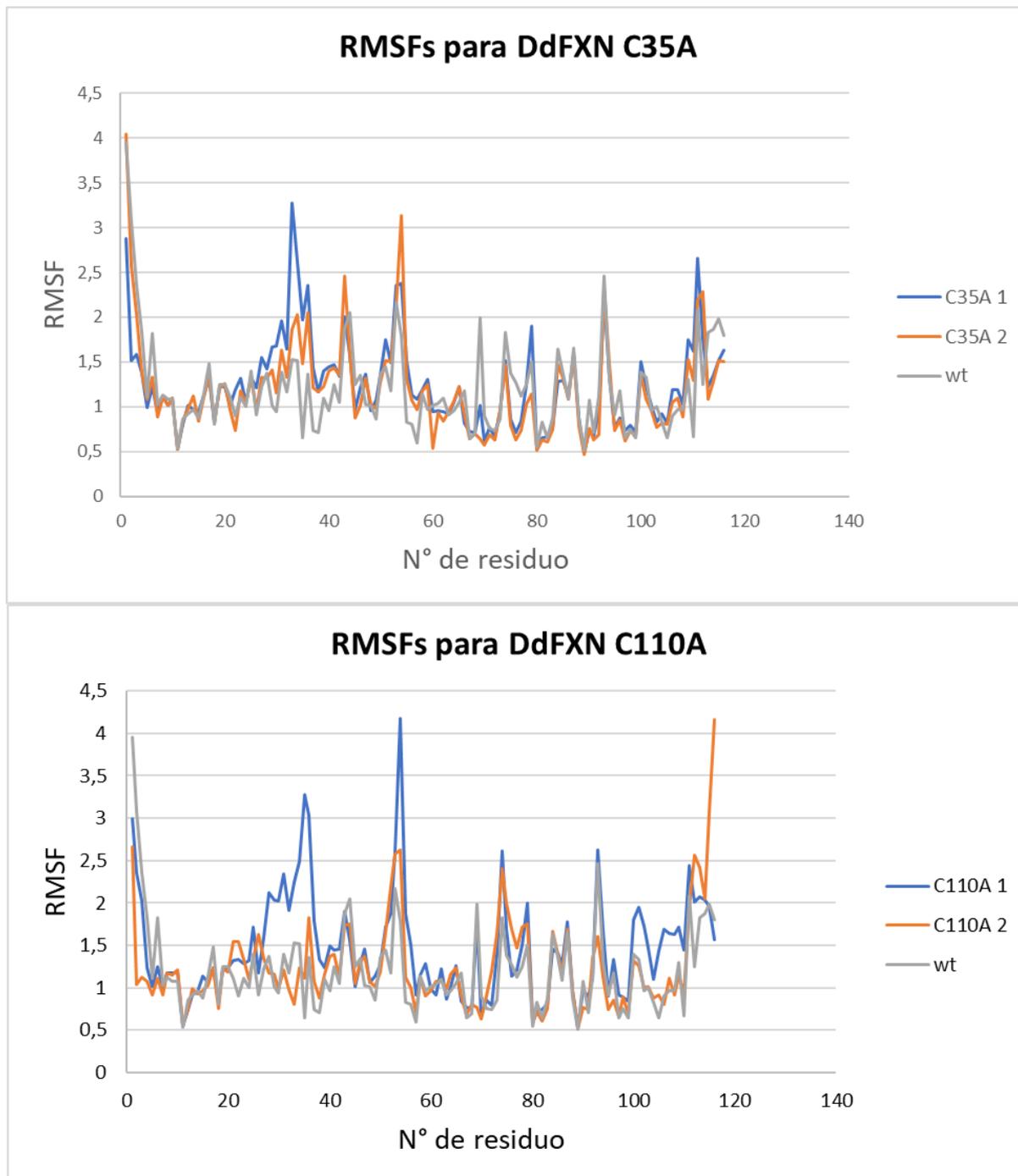
**Figura 17: Análisis de dinámicas moleculares mediante RMSD.** Se muestra el RMSD en función del tiempo de las mutantes en comparación a la DdFXN wt, se realizaron dos dinámicas por mutante.

El desvío de los RMSDs (Tabla 5) muestra que todas las dinámicas alcanzaron una conformación relativamente estable pasados los 20 ns. Estas conformaciones no difieren demasiado de la inicial salvo por la C110A 2, que posee el valor más alto de RMSD promedio.

**Tabla 5:** Valor promedio y desvío estándar para el RMSD de cada dinámica

	<b>Media</b>	<b>Desvío</b>
<b><i>Wild type</i></b>	1.42	0.122
<b>C35A 1</b>	1.66	0.24
<b>C35A 2</b>	1.53	0.15
<b>C110A 1</b>	1.76	0.22
<b>C110A 2</b>	2.75	0.17

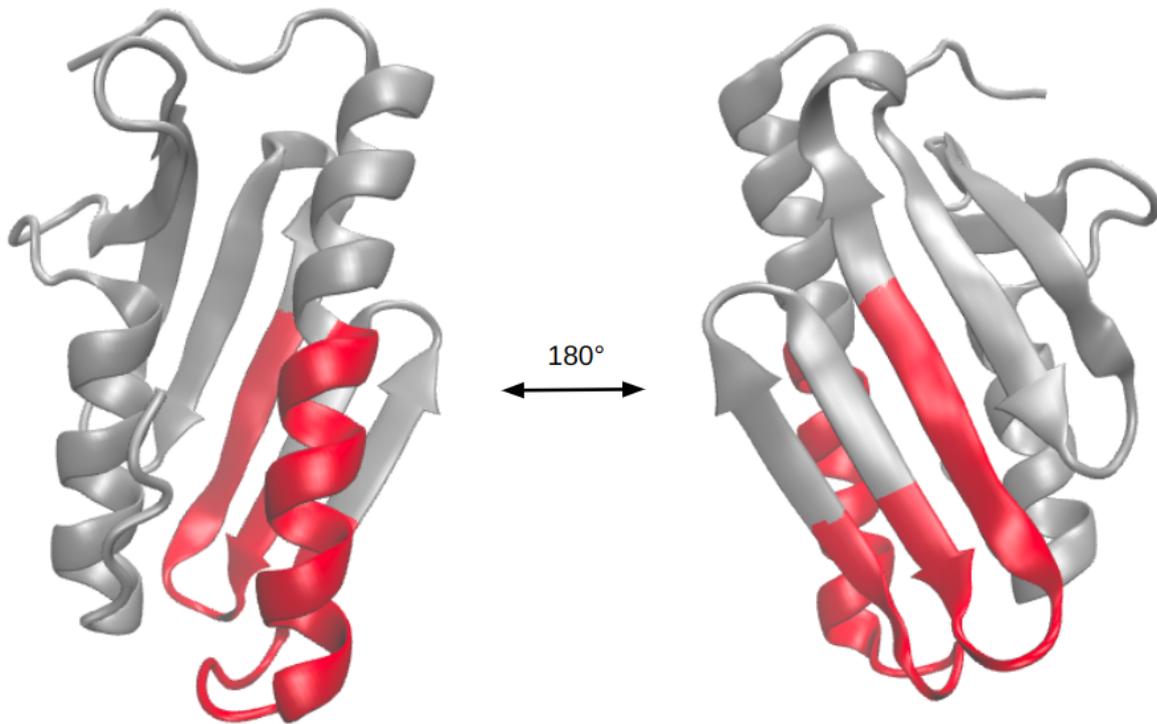
Los gráficos de RMSF muestran que hay 3 regiones que parecen tener una movilidad mayor en las mutantes, la región entre los residuos 20 y 40, entre 50 y 60 (Figura 19) y la región C-terminal. El incremento de flexibilidad en las primeras dos se observa consistentemente en todas las mutantes, la región C terminal se observa sobre todo en las C110A, particularmente en el caso de C110A 2 se da un pico considerable de flexibilidad en esta región terminal y es posiblemente lo que explica el valor de RMSD tan alto observado para esta simulación.



**Figura 18: Análisis de dinámicas moleculares mediante RMSF.** RMSF de cada residuo, se muestran las mutantes en comparación a la DdFXN wt.

Si asumimos que la interacción entre el supercomplejo y la FXN se da de igual manera en humanos y en *D. discoideum*, estas dos regiones (20 a 40 y 50 a 60) podrían ser de relevancia en dicha interacción. La primera contiene la región de hFXN que interactúa con

una de las desulfurasas NFS1, y la segunda es parte de la lámina beta de hFXN que interactúa con la desulfurasa restante.



**Figura 19: Regiones de mayor cambio en su flexibilidad.** Detalle en rojo de las regiones de mayor RMSF en las mutantes C35A y C110A. En particular, residuos 20 a 40 y 50 a 60.

### **3.6. Discusión**

Como mencionamos previamente, el análisis de conservación de secuencias dejó en claro que este puente disulfuro no es un rasgo evolutivamente conservado. Experimentalmente, pareciera que la formación del puente no está muy favorecida y solo logró observarse en una fracción de la población de proteínas (Figura 16), al menos en las condiciones evaluadas de expresión en SHuffle. Las dinámicas moleculares muestran diferencias leves en cuanto a la flexibilidad de DdFXN entre las variantes con y sin el puente formado.

Todos estos resultados parecen indicar que el efecto de este puente sobre la estructura y funcionamiento de DdFXN es leve, sin embargo, es importante resaltar que estos experimentos no permiten inferir cómo se comporta esta proteína dentro de la mitocondria de *D. discoideum*, con lo que determinar el verdadero rol de este puente requerirá estudios adicionales.

Uno de los aspectos en los que valdría la pena ahondar es en la puesta a punto de un método *in-vitro* que permita desplazar el equilibrio hacia la formación del puente, de manera de obtener muestras de DdFXN con el puente mayormente formado y poder compararlas en cuanto a estabilidad y actividad con las formas reducidas de la misma.

## **Parte 4: Discusión general y conclusiones**

### **4.1. Caracterización funcional de DdFXN**

A lo largo de la primera parte de esta tesis, se buscó determinar el grado de conservación en la actividad de la proteína FXN entre humanos y *D. discoideum*, para esto se evaluó la capacidad de DdFXN para interactuar con el supercomplejo humano y para activar la actividad desulfurasa del mismo.

Los dos ensayos de anisotropía difirieron considerablemente en los valores de  $K_d$  obtenidos (ver resultados Figuras 9 y 11, y Tablas 2 y 3), pero permitieron obtener información valiosa respecto al modo de interacción entre DdFXN y el supercomplejo humano. Los ensayos de competencia entre hFXN y DdFXN dejaron en claro que DdFXN es capaz de competir con hFXN por la unión con el supercomplejo, lo que indicaría que ambas interactúan con el supercomplejo mediante la misma superficie de unión.

Los ensayos de *binding* entre las FXNs y el supercomplejo permitieron obtener valores precisos de  $K_d$ . Si bien el valor obtenido para hFXN ( $K_d = 0.313 \pm 0.094 \mu\text{M}$ ) difiere de los reportados en la bibliografía, el mismo puede ser utilizado con fines comparativos, resultando significativamente menor al  $K_d$  determinado para DdFXN ( $K_d = 1.455 \pm 0.385 \mu\text{M}$ ). La diferencia entre estos  $K_d$  es menor a  $2 \mu\text{M}$ , DdFXN presenta una afinidad alta por el supercomplejo humano.

DdFXN mostró también un incremento en la actividad desulfurasa del supercomplejo humano (Figura 12). Esta activación es significativamente menor a la lograda por hFXN, pero mayor a la actividad basal del supercomplejo, lo que corrobora que DdFXN está actuando como activador del proceso. Sería recomendable comparar también las etapas subsiguientes del proceso de formación de centros ferrosulfurados, lo que permitiría completar la descripción de la actividad de DdFXN en el supercomplejo humano.

A grandes rasgos, estos resultados dejan en claro que las bases biofísicas para la interacción FXN-supercomplejo y el incremento de actividad resultante están conservadas evolutivamente entre *D. discoideum* y humanos.

El hecho de que sea posible complementar de esta manera al supercomplejo humano utilizando DdFXN constituye una fuerte evidencia respecto al elevado nivel de conservación evolutiva que existe en el funcionamiento del supercomplejo. Si bien se han realizado observaciones similares, donde la funcionalidad del supercomplejo se mantiene tras intercambiar proteínas del mismo por homólogos de otras especies [19,20,58], ninguna de estas involucra un intercambio de FXNs y mucho menos a *D. discoideum* como origen de los homólogos, con lo que en este aspecto nuestros resultados resultan novedosos.

Adicionalmente, y de particular interés para nuestro laboratorio, los resultados obtenidos en esta tesis ayudan a validar la utilización de *D. discoideum* como organismo modelo para el estudio de enfermedades asociadas a este supercomplejo mitocondrial. De hecho, ya se está trabajando en la obtención de cepas deficientes en la actividad de DdFXN buscando emular fenotipos símil FA, mediante mutaciones puntuales y deleciones logradas utilizando edición génica por CRISPR/Cas9.

#### **4.2. Evaluación de la formación del puente disulfuro**

La posible formación de un puente disulfuro intracatenario entre las cisteínas 35 y 110 de DdFXN se observó inicialmente como producto del modelado utilizando AlphaFold2. Los análisis evolutivos no mostraron indicios de conservación del mismo, lo que indica que, de formarse este puente dentro de *D. discoideum*, se trataría de una novedad evolutiva de la especie (Figura 14).

Experimentalmente fue posible favorecer la formación del puente mediante expresión en un ambiente oxidante (cepa SHuffle de *E. coli*), sin embargo, no se logró desplazar la totalidad de la muestra a la formación del mismo (Figuras 15 y 16).

Las dinámicas moleculares permitieron explorar las posibles repercusiones de la formación del puente en la actividad de DdFXN (Figuras 17, 18 y 19, y tabla 5). Si bien los resultados sólo son parciales ya que no se simuló la interacción de DdFXN con el supercomplejo, existe la posibilidad de que las regiones más afectadas en cuanto a su flexibilidad como resultado de la formación del puente puedan alterar la dinámica de interacción. El objetivo a futuro es explorar formas de favorecer aún más la formación del puente y ahondar en los efectos del mismo mediante nuevos ensayos tanto *in-vitro*, como el estudio de la estabilidad de plegado de variantes con y sin puente, como *in-vivo*, evaluando por ejemplo los efectos de la pérdida de este puente sobre el fenotipo de *D. discoideum*, mediante la expresión de

DdFXN con mutaciones puntuales de una de las cisteínas involucradas luego de noquear o silenciar a la DdFXN wt.

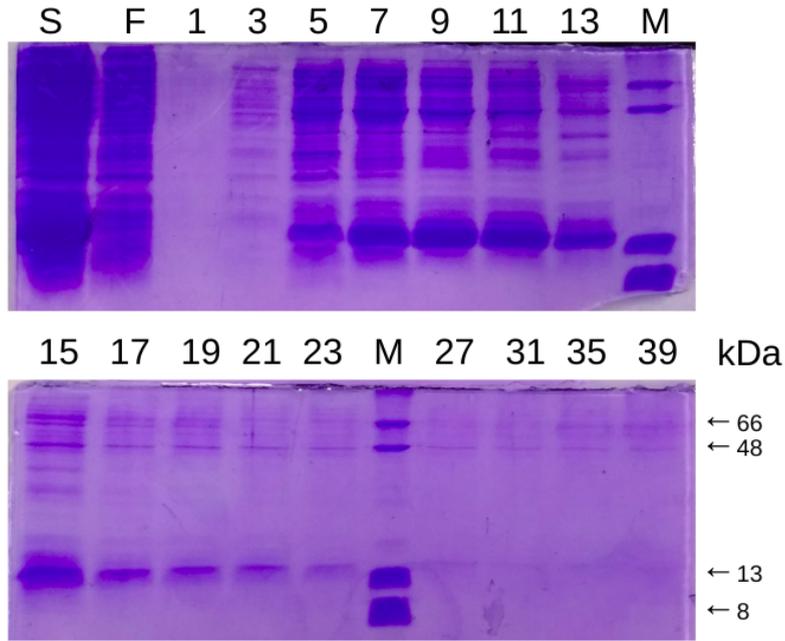
## **Parte 5: Materiales y métodos**

### **5.1. Purificación de DdFXN**

El fragmento codificante para la forma madura de DdFXN optimizado para expresión en *E.coli* fue sintetizado por BIO-BASIC Inc (Toronto, Canada). El cDNA fue clonado en el vector pET9a (resistencia a kanamicina) y secuenciado.

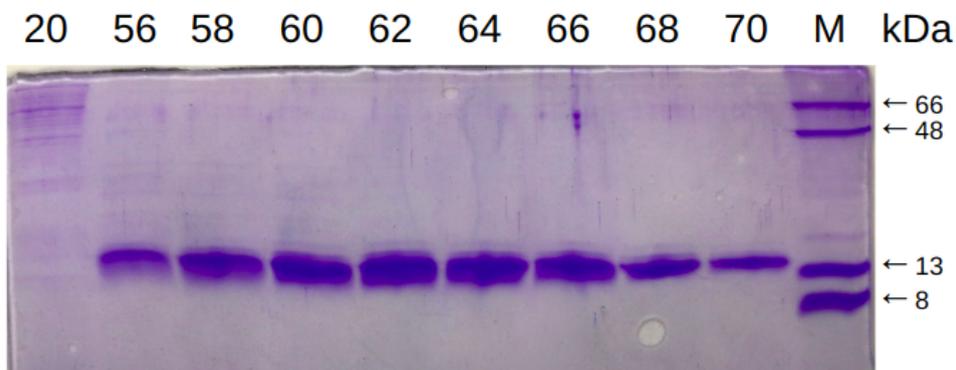
Las bacterias se transformaron mediante *heat shock*. Brevemente, a 100 µl de bacterias se le agregaron 20 ng de plásmido, se incubó 30 min en hielo y luego se pasó a un baño a 42°C durante 30 seg, se dejó en hielo 5 min y luego se agregaron 900 µl de medio SOC, se dejó recuperar en agitación 1 h a 37°C y 280 rpm. Las bacterias luego se sembraron en placas LB agar con kanamicina 50 µg/ml.

Cultivos de *E.coli* BL21 transformadas se crecieron 37 °C en 2 litros de medio Luria-Bertani (LB) con agitación a 280 rpm. La expresión de la proteína fue inducida a OD<sub>600nm</sub> = 1.0 mediante el agregado de IPTG a concentración final de 1.0 mM. Tras 4 h de inducción a 37 °C y 180 rpm, el cultivo fue centrifugado a 6000 rpm y el pellet almacenado a -20 °C. Las bacterias se resuspendieron en 25 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.0) y se las lizó por sonicación en un baño de hielo y agua (3 ciclos de 50 seg a 30% de potencia) seguido por una centrifugación a 10000 rpm por 30 min a 4 °C. Para la purificación de DdFXN (116 residuos, PM teórico 13326.9 Da, PI teórico 4.4) la fracción soluble se cargó en una columna de cromatografía por intercambio iónico DEAE (matriz DE52) y se eluyó usando 200 ml de buffer 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0 con un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl. Las fracciones con DdFXN (identificadas por SDS-PAGE, (Figura 20) se pasaron luego a una columna de exclusión molecular Sephadex G-100 (93 cm, 62.7 cm), previamente equilibrada con buffer 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0.



**Figura 20:** Fracciones de la cromatografía en columna DEAE. S = sonicado, F = *flow through*, M = marcador de peso molecular.

Las fracciones con proteína se identificaron por absorbancia a 280 nm (espectrofotómetro *JASCO V-730 BIO*) y fueron luego reveladas en un gel SDS-PAGE (figura 21). La concentración de proteína fue determinada por espectrometría UV usando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{280\text{nm}} = 20970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , predicho a partir de la secuencia de aminoácidos.



**Figura 21:** Fracciones de la cromatografía en tamiz molecular. M = marcador peso molecular.

## **5.2. Marcación con Texas-red**

Tanto hFXN S202C como DdFXN C35A fueron marcadas con este mismo procedimiento.

Se preparó el stock de sonda Texas-red maleimida (*Thermo Fisher*) pesando la menor masa posible y disolviéndola en DMSO seco para una concentración teórica final de 15 mM (PM Texas-red = 728 g/mol ). Del stock resultante se realizó una dilución 1/400 en buffer de marcación (Tris 20 mM, pH = 7, NaCl 100 mM, EDTA 1mM) y se determinó la concentración efectiva mediante espectrometría UV usando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{586nm} = 116000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . De este mismo espectro se obtuvo el factor de corrección utilizado posteriormente para cuantificar la proteína ya marcada, este factor se corresponde a la relación  $Abs_{280}/Abs_{586}$  y tiene un valor de 0.18.

La marcación se realizó en una relación sonda-proteína de 3 a 1 en 500  $\mu\text{l}$  volumen final, se incubó 3 h en oscuridad. La proteína se separa de la sonda sin reaccionar mediante una cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex G-25 (*GE healthcare*) equilibrada en el mismo buffer de marcación. La concentración de proteína marcada equivale a la concentración final de sonda y se determina por espectrometría UV a 586 nm, la concentración total de proteína se obtiene por espectrometría a 280 nm, corrigiendo la absorbancia con el factor de corrección previamente calculado según la siguiente ecuación:

$$[C] = \frac{Abs_{280nm} - (Abs_{586nm} * f)}{\epsilon_{280nm}}$$

Donde **[C]** es la concentración total de proteína, **f** es el factor de corrección y  $\epsilon_{280nm}$  es el coeficiente de absortividad molar de la proteína sin marcar a 280 nm. Esto permite determinar la concentración de proteína sin marcar restante en la solución.

## **5.3. Ensayo de anisotropía para competencia entre hFXN y DdFXN**

Partimos de una solución hFXN S202C marcada con Texas-red 1  $\mu\text{M}$ , ISCU 15  $\mu\text{M}$  y NIA 5  $\mu\text{M}$  en buffer Tris 20 mM, pH = 8, NaCl 100 mM. Se incrementó progresivamente la concentración de DdFXN, en cada paso se dejó reposar la mezcla 3 minutos y luego se midió la anisotropía de fluorescencia a temperatura ambiente con una longitud de onda de excitación de 590 nm y de emisión de 610 nm (espectrofluorímetro *JASCO FP-8300*).

Los valores de anisotropía se transforman a fracción de hFXN unida, valor que luego se grafica en función de la concentración de inhibidor y se realiza el ajuste logístico. La relación anisotropía fracción unida es la siguiente:

$$x = \frac{r - r_f}{r_b - r_f}$$

Donde **r** es la anisotropía, **rf** es la anisotropía de hFXN libre (sonda libre) y **rb** es la anisotropía de hFXN unida al complejo (sonda totalmente unida). **rf** y **rb** deben ser determinados en cada experimento.

Los valores de **rf** se obtuvieron como anisotropía para hFXN marcada 1 µM en buffer, y los de **rb** como anisotropía para hFXN marcada 1µM, ISCU 15 µM y NIA 20 µM (exceso).

El IC50 a un 95% de confianza fue determinado ajustando los datos a la ecuación 2 utilizando el comando *nls()* en R, este realiza un ajuste no lineal de cuadrados mínimos. Los supuestos de dicho ajuste fueron luego puestos a prueba utilizando el comando *test.nlsResiduals()* del paquete "nlstools" [59], que testea homocedasticidad, normalidad, autocorrelación y presencia de outliers.

#### **5.4. Marcación con IAA**

El stock de IAA se preparó pesando una masa pequeña de IAA sólida y diluyendo para alcanzar una concentración de 500 mM. Se preparó una mezcla de proteína e IAA en una relación IAA:cisteínas de 5 a 1, en buffer Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8. La mezcla se incubó 45 minutos en oscuridad a 35 °C, luego la IAA restante se separó de la proteína mediante una cromatografía en columna de exclusión molecular G-25 (*GE healthcare*). Se midió la concentración de proteína en las distintas fracciones por Abs 280 nm.

#### **5.5. Cuantificación de tioles libres**

La reactividad química hacia el reactivo de Ellman (DTNB) se determinó a temperatura ambiente en un buffer 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0. El DTNB se tomó de una solución stock 20 mM en buffer sodio fosfato 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0.

La reacción se llevó a cabo a concentraciones finales de proteína y DTNB de 20 µM y 200 µM respectivamente, en un volumen de 400 µL. Tras agregar DTNB a la solución se siguió la reacción por absorbancia a 425 nm durante 6 minutos (tiempo tras el cual los valores se estabilizaron). Se midió también un blanco sin proteína, valor que se resta a las demás absorbancias.

## **5.6. Mutagénesis**

La mutagénesis del vector original para obtener la variante C35A de DdFXN se realizó utilizando el *kit* de mutagénesis por PCR Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England BioLabs). Los *primers* para esta mutagénesis fueron obtenidos utilizando la herramienta online *NEBaseChanger*, recomendada por el distribuidor del *kit*, estos primers son complementarios al sitio de mutagénesis pero incluyen en su secuencia el codón mutante en lugar del original.

Brevemente, la mutagénesis consiste en un paso de PCR que utiliza al vector original metilado extraído por miniprep (*kit ADN PuriPrep P-kit (Inbio Highway)*) de los stocks de DH5-Alfa. Se mezclaron 10 ng de vector con 25 µl de primers forward y reverse (concentración final 0.5 µM), 9 µl de agua libre de nucleasas, y 12.5 µl del mix de reacción del kit (dNTPs, Mg<sup>2+</sup> y la DNApol).

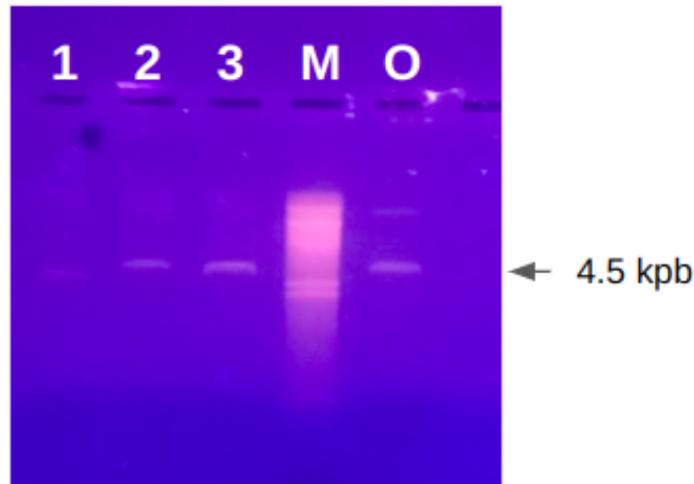
El esquema de PCR utilizado fue el siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 seg
25 ciclos	98 °C	10 seg
	52 °C	30 seg
	72 °C	115 seg
Extensión final	72 °C	2 min

El producto de PCR luego es tratado con un mix de kinasa, ligasa y DpnI (KLD mix). La kinasa fosforila los extremos del ADN plasmídico linealizado para permitir su ligación, la ligasa liga los extremos y circulariza los vectores, y DpnI digiere al vector original por estar este metilado.

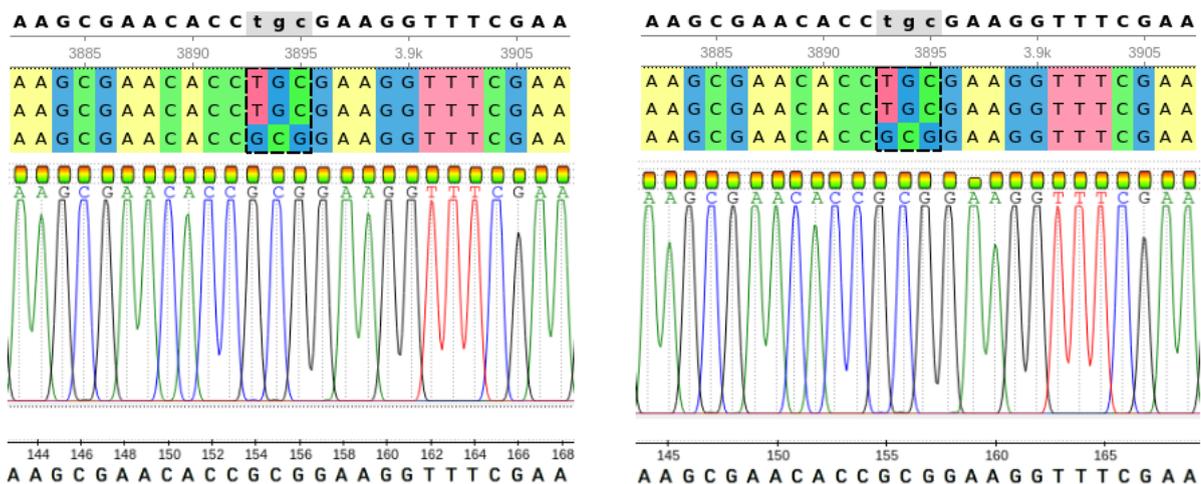
Tras la mutagénesis, los vectores mutados fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* cepa DH5-Alfa, el protocolo de transformación utilizado fue el mismo descrito previamente para la expresión de DdFXN *wt* en cepa BL21. Se aislaron 3 clones y se prepararon cultivos de 10 ml en medio LB de los que se purificó plásmido mediante una *mini prep (inBio Highway, Argentina)*. La integridad de los plásmidos purificados se evaluó

mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 22) y se cuantificaron utilizando un equipo *NanoDrop* (*Thermo Fisher Scientific*).



**Figura 22:** Gel de agarosa mostrando los plásmidos de DdFXN C35A purificados. M = marcador de peso molecular, O = vector original DdFXN. La resolución del marker es mala y no permite distinguir bien el peso de las bandas observadas, pero los clones 2 y 3 muestran un peso muy similar al del vector original y parecen estar puros.

Los 3 clones fueron secuenciados por el servicio *Macrogen* (*Corea del Sur*) y se corroboró la presencia de la mutación buscada en dos de ellos (Figura 23), así como la integridad del plásmido.



**Figura 23:** Secuenciación de los clones 2 (izquierda) y 3 (derecha). El alineamiento muestra en las dos primeras filas la secuencia de DdFXN wt, y en la tercera fila la secuencia de la mutante correspondiente. Abajo se observan los resultados de la secuenciación, la resolución de los picos es muy buena.

### **5.7. Ensayo de anisotropía para interacción de DdFXN C35A con el supercomplejo**

Partimos de una solución de DdFXN C35A marcada con Texas-red 1  $\mu\text{M}$  en buffer Tris 20 mM, pH = 8,0, NaCl 100 mM (tener en cuenta que la concentración de DdFXN C35A total es mayor a 1  $\mu\text{M}$  debido a que la marcación no se logró al 100%), la anisotropía de este punto se utiliza como el valor de **rf** para el ensayo (anisotropía sin complejo), luego se agrega ISCU a una concentración final de 25  $\mu\text{M}$ . Se incrementó progresivamente la concentración de NIA, alcanzando una concentración máxima de 15  $\mu\text{M}$  para la cual la anisotropía ya alcanzó su valor máximo, el cual tomamos como **rb**. En cada punto se dejó reposar la solución 3 minutos y luego se midió la anisotropía de fluorescencia a temperatura ambiente con una longitud de onda de excitación de 590 nm y de emisión de 610 nm.

La ecuación 4 requiere la obtención de los valores de  $[\text{NIAU}]_l$  (NIAU libre) en cada punto. Esta equivale a la concentración total de NIAU ( $[\text{NIAU}]_t$ ) menos la concentración de NIAU unida a DdFXN ( $[\text{NIAU}]_u$ ).

Conociendo las concentraciones de NIA e ISCU se puede determinar  $[\text{NIAU}]_t$ , utilizando la constante de disociación entre estos, la cual tiene un valor de 1.7  $\mu\text{M}$  [48].

$[\text{NIAU}]_u$  se puede obtener multiplicando la concentración total de DdFXN por la fracción de DdFXN unida, previamente calculada a partir de las mediciones de anisotropía. Es importante tener en cuenta que la concentración total de DdFXN incluye tanto DdFXN marcada como no marcada, dado que ambas especies interactúan con NIAU.

El  $K_d$  a un 95% de confianza fue determinado ajustando los datos a la ecuación 4 utilizando el comando *nls()* en R, este realiza un ajuste no lineal de cuadrados mínimos. Los supuestos de dicho ajuste fueron luego puestos a prueba utilizando el comando *test.nlsResiduals()* del paquete “nlstools”, que testea homocedasticidad, normalidad, autocorrelación y presencia de outliers.

### **5.8. Obtención del alineamiento de FXNs de Amoebozoa**

La obtención de las secuencias de FXN de organismos del grupo Amoebozoa se realizó mediante búsquedas por homología contra distintas bases de datos utilizando la página del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En primer lugar se realizó una búsqueda de tipo *blastp* utilizando como secuencia query a DdFXN contra dos distintas bases de datos, “non redundant protein sequences” y “Reference proteins (refseq\_protein)”, se filtraron los resultados para mostrar sólo organismos pertenecientes al clado Amoebozoa

(taxid:554915). Esta búsqueda devolvió muy pocos resultados, tres incluyendo a DdFXN, posiblemente debido a una subrepresentación de organismos de este grupo en estas bases de datos.

Se realizó una segunda búsqueda de tipo *tblastn* utilizando nuevamente a DdFXN como query. Esta búsqueda compara una secuencia proteica contra secuencias de nucleótidos traducidas en sus 6 marcos de lectura. Se utilizó como base de datos "TSA: *Transcriptome Shotgun Assembly*", esta base posee secuencias nucleotídicas obtenidas de experimentos de RNAseq realizados sobre distintos organismos. Nuevamente se limitaron los resultados a organismos del grupo Amoebozoa, y se obtuvieron 34 secuencias adicionales.

Para recortar las secuencias y limitarnos al dominio FXN, excluyendo señales de localización mitocondrial, se incorporó entre las secuencias de FXN una secuencia adicional correspondiente a la FXN de *E.coli* extraída de pfam, esta secuencia ya se encontraba limitada al dominio característico de la familia *Frataxin\_Cyay*. Se alinearon las secuencias y se recortaron todas para limitarlas solo a la región que alinea con esta secuencia de *E.coli*. Luego se descartó dicha secuencia y se volvió a alinear para obtener el alineamiento final.

Los alineamientos se realizaron y recortaron utilizando el software MEGA X, el algoritmo de alineamiento fue CLUSTALW.

## **5.9. Ensayo actividad**

La actividad desulfurasa del complejo NFS1-ISD11-ACP (NIA) complementado con ISCU y hFXN o DdFXN se determinó utilizando el método de azul de metileno. El procedimiento es una modificación del trabajo de Tsai et al. [cita], las reacciones se realizaron a concentraciones finales 1.0  $\mu$ M NIA, 3.0  $\mu$ M ISCU, 1.0  $\mu$ M FXN, y fueron complementadas con 10  $\mu$ M PLP y 2 mM DTT en un volumen final de 400  $\mu$ L, el buffer utilizado fue 50 mM Tris-HCl pH=8,00, 200 mM NaCl.

Las reacciones se comenzaron con el agregado de L-cisteína y Fe(II) a concentraciones finales de 1.0 mM y 1.0  $\mu$ M respectivamente y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente durante 30 minutos. La producción de persulfuro se detuvo mediante el agregado de 50  $\mu$ L de N, N-dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en 7.2 N HCl y 50  $\mu$ L de FeCl<sub>3</sub> 30 mM en 1.2 N HCl. Se dejó formar el azul de metileno durante 20 minutos, las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 13000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 670 nm.

### **5.10. Determinación de la presencia de unión S-S en Dd FXN por espectrometría de masa**

Previo a la realización de la tesis se realizó un análisis por espectrometría de masa para corroborar el peso molecular de la Dd FXN producida en BL21, el mismo fue realizado en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO, UBA-CONICET). Las muestras fueron analizadas en forma rutinaria por RP-HPLC, con una columna C4, acoplada a un espectrómetro de masa de ionización con electrospray (LCQ-Duo, Thermo Fisher).

La determinación de la presencia de unión S-S en la Dd FXN expresada en el sistema *Shuffle* fue realizada en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos (CEQUIBIEM, FCEN, UBA). Brevemente, las muestras se incubaron en presencia de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM pH 8.00 durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación con iodoacetamida 55 mM pH 8.00. Se realizó la digestión triptica de cada fragmento con tripsina 25 ng/ $\mu$ l durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos obtenidos se extrajeron con ácido fórmico al 5% (v/v) en ácido acético al 50% (v/v). El concentrado, desalado y la purificación de cada muestra se realizó con una mini-columna C18 en un Zip-Tip (Millipore). Los péptidos resultantes de la digestión fueron resuspendidos en el solvente de corrida y analizados mediante un nanoHPLC (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific, Germany) acoplado a un espectrómetro de masa Orbitrap technology (Q-Exactive, Thermo Scientific, Germany). La ionización de los péptidos fue realizada por electrospray.

### **5.11. Dinámicas moleculares**

Las estructuras de partida, tanto de la proteína wt como las dos mutantes, fueron obtenidas con Alphafold2 a través del *ColabFold* (Mirdita et al.) [60]. Antes de realizar las dinámicas se verificó que las estructuras wt mostrasen el puente disulfuro entre C110 y C35 formado, ya que este debe estar explicitado en las estructuras de partida de las dinámicas.

Las dinámicas moleculares se realizaron utilizando el software *Yasara Dynamics* [61] en condición de celda periódica, utilizando celdas cúbicas. El sistema consistió en una copia de la proteína por celda, solvatada explícitamente en agua TIP3P a pH fisiológico de 7.4 y con una concentración 0.9% de NaCl (condición fisiológica), la temperatura fue seteada a 298 K.

El campo de fuerza utilizado fue Amber14 [62]. Previo a la simulación se realiza una minimización de energía, donde la temperatura se controla con un termostato de reescalado. Las simulaciones se corrieron con un paso temporal de 2.5 fs durante 200-300

ns, utilizando un cutoff para las interacciones de Lennard-Jones de 8 Å e implementando el método de Ewald (PME, particle-mesh Ewald) para el cómputo de las interacciones electrostáticas.

### **5.12. Tratamiento estadístico de resultados de cuantificación de tioles y actividad desulfurasa**

Los análisis estadísticos de los resultados de la cuantificación de tioles en DdFXN purificada en cepas BL21 y SHuffle, así como el de los resultados de actividad desulfurasa fueron realizados en R.

Para los ensayos de DTNB se ajustó un modelo de comparación de medias mediante la función *lm()*, se validaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante un test de Shapiro-Wilk y un test de Levene respectivamente y se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% mediante la función *emmeans()* del paquete “emmeans” [63].

Para los ensayos de actividad desulfurasa se ajustó un modelo de comparación de medias utilizando la función *gls()* del paquete “nlme” [64] y se realizó un modelado de la varianza varPower usando los valores predichos como covariable. Los intervalos de confianza y las comparaciones de Tukey se realizaron nuevamente con la función *emmeans()*.

## Bibliografía

1. Lim SC, Friemel M, Marum JE, Tucker EJ, Bruno DL, Riley LG, et al. Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet.* 2013;22: 4460–4473.
2. Böttlinger L, Mårtensson CU, Song J, Zufall N, Wiedemann N, Becker T. Respiratory chain supercomplexes associate with the cysteine desulfurase complex of the iron-sulfur cluster assembly machinery. *Mol Biol Cell.* 2018;29: 776–785.
3. Adam AC, Bornhövd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* 2006;25: 174–183.
4. Barton JK, Silva RMB, O'Brien E. Redox Chemistry in the Genome: Emergence of the [4Fe4S] Cofactor in Repair and Replication. *Annu Rev Biochem.* 2019;88: 163–190.
5. Pandey A, Pain J, Dziuba N, Pandey AK, Dancis A, Lindahl PA, et al. Mitochondria Export Sulfur Species Required for Cytosolic tRNA Thiolation. *Cell Chem Biol.* 2018;25: 738–748.e3.
6. Outten FW. Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853: 1464–1469.
7. Tsaousis AD. On the Origin of Iron/Sulfur Cluster Biosynthesis in Eukaryotes. *Front Microbiol.* 2019;10: 2478.
8. Lill R. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature.* 2009. pp. 831–838. doi:10.1038/nature08301
9. Boniecki MT, Freibert SA, Mühlenhoff U, Lill R, Cygler M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat Commun.* 2017;8: 1287.
10. Cai K, Frederick RO, Tonelli M, Markley JL. Mitochondrial Cysteine Desulfurase and ISD11 Coexpressed in *Escherichia coli* Yield Complex Containing Acyl Carrier Protein. *ACS Chemical Biology.* 2017. pp. 918–921. doi:10.1021/acscchembio.6b01005
11. Cory SA, Van Vranken JG, Brignole EJ, Patra S, Winge DR, Drennan CL, et al. Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114: E5325–E5334.
12. Fox NG, Yu X, Feng X, Bailey HJ, Martelli A, Nabhan JF, et al. Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat Commun.* 2019;10: 2210.
13. Herrera MG, Noguera ME, Sewell KE, Agudelo Suárez WA, Capece L, Klinke S, et al. Structure of the Human ACP-ISD11 Heterodimer. *Biochemistry.* 2019;58: 4596–4609.
14. Tsai C-L, Barondeau DP. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry.* 2010;49: 9132–9139.
15. Patra S, Barondeau DP. Mechanism of activation of the human cysteine desulfurase complex by frataxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116: 19421–19430.

16. Bridwell-Rabb J, Fox NG, Tsai C-L, Winn AM, Barondeau DP. Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry*. 2014;53: 4904–4913.
17. Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90: 2754–2758.
18. UniProt. [cited 27 Oct 2022]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y697/entry>
19. Weibert H, Freibert S-A, Gallo A, Heidenreich T, Linne U, Amlacher S, et al. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun*. 2014;5: 5013.
20. Gervason S, Larkem D, Mansour AB, Botzanowski T, Müller CS, Pecqueur L, et al. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat Commun*. 2019;10: 3566.
21. Cai K, Tonelli M, Frederick RO, Markley JL. Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Biochemistry*. 2017;56: 487–499.
22. Fox NG, Das D, Chakrabarti M, Lindahl PA, Barondeau DP. Frataxin Accelerates [2Fe-2S] Cluster Formation on the Human Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry*. 2015;54: 3880–3889.
23. Parent A, Elduque X, Cornu D, Belot L, Le Caer J-P, Grandas A, et al. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat Commun*. 2015;6: 5686.
24. Melber A, Winge DR. Steps Toward Understanding Mitochondrial Fe/S Cluster Biogenesis. *Methods Enzymol*. 2018;599: 265–292.
25. Sen S, Hendricks AL, Cowan JA. Cluster exchange reactivity of [2Fe-2S]-bridged heterodimeric BOLA1-GLRX5. *FEBS J*. 2021;288: 920–929.
26. Nasta V, Suraci D, Gourdoups S, Ciofi-Baffoni S, Banci L. A pathway for assembling [4Fe-4S] clusters in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *FEBS J*. 2020;287: 2312–2327.
27. Cai K, Liu G, Frederick RO, Xiao R, Montelione GT, Markley JL. Structural/Functional Properties of Human NFU1, an Intermediate [4Fe-4S] Carrier in Human Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *Structure*. 2016;24: 2080–2091.
28. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 1996;271: 1423–1427.
29. Galea CA, Huq A, Lockhart PJ, Tai G, Corben LA, Yiu EM, et al. Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2016;79: 485–495.
30. Shan Y, Napoli E, Cortopassi G. Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet*. 2007;16: 929–941.

31. Correia AR, Pastore C, Adinolfi S, Pastore A, Gomes CM. Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS J.* 2008;275: 3680–3690.
32. Koutnikova H, Campuzano V, Koenig M. Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum Mol Genet.* 1998;7: 1485–1489.
33. Schmucker S, Argentini M, Carelle-Calmels N, Martelli A, Puccio H. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet.* 2008;17: 3521–3531.
34. Zinc-Ligand Swapping Mediated Complex Formation and Sulfur Transfer between SufS and SufU for IronSulfur Cluster Biogenesis in *Bacillus subtilis*. doi:10.1021/jacs.7b11307.s001
35. Blahut M, Wise CE, Bruno MR, Dong G, Makris TM, Frantom PA, et al. Direct observation of intermediates in the SufS cysteine desulfurase reaction reveals functional roles of conserved active-site residues. *J Biol Chem.* 2019;294: 12444–12458.
36. Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285: 26737–26743.
37. Kessin RH. *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity.* Cambridge University Press; 2001.
38. Müller-Taubenberger A, Kortholt A, Eichinger L. Simple system--substantial share: the use of *Dictyostelium* in cell biology and molecular medicine. *Eur J Cell Biol.* 2013;92: 45–53.
39. Katz ER. *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. Developmental and Cell Biology Series, Volume 38.* By Richard H Kessin. Cambridge and New York: Cambridge University Press. \$90.00. xiv 294 p 6 pl; ill.; index. ISBN: 0-521-58364-0. 2001. *The Quarterly Review of Biology.* 2002. pp. 453–454. doi:10.1086/374457
40. Pearce XG, Annesley SJ, Fisher PR. The *Dictyostelium* model for mitochondrial biology and disease. *Int J Dev Biol.* 2019;63: 497–508.
41. Olmos J, Pignataro MF, Benítez Dos Santos AB, Bringas M, Klinke S, Kamenetzky L, et al. A Highly Conserved Iron-Sulfur Cluster Assembly Machinery between Humans and *Amoeba* : The Characterization of Frataxin. *Int J Mol Sci.* 2020;21. doi:10.3390/ijms21186821
42. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: W382–8.
43. Gijsbers A, Nishigaki T, Sánchez-Puig N. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *J Vis Exp.* 2016. doi:10.3791/54640
44. Jameson DM. *Introduction to Fluorescence.* CRC Press; 2019.
45. Sabnis RW. *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes.* 2015. doi:10.1002/9781119007104
46. Huang X. Fluorescence polarization competition assay: the range of resolvable inhibitor potency is limited by the affinity of the fluorescent ligand. *J Biomol Screen.* 2003;8: 34–38.

47. Das D, Patra S, Bridwell-Rabb J, Barondeau DP. Mechanism of frataxin “bypass” in human iron–sulfur cluster biosynthesis with implications for Friedreich’s ataxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2019. pp. 9276–9284. doi:10.1074/jbc.ra119.007716
48. Cai K, Frederick RO, Tonelli M, Markley JL. Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe-S cluster assembly. *J Inorg Biochem*. 2018;183: 107–116.
49. Siegel LM. A DIRECT MICRODETERMINATION FOR SULFIDE. *Anal Biochem*. 1965;11: 126–132.
50. Herrera MG, Pignataro MF, Noguera ME, Cruz KM, Santos J. Rescuing the Rescuer: On the Protein Complex between the Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein and ISD11. *ACS Chem Biol*. 2018;13: 1455–1462.
51. QMEAN. [cited 20 Nov 2022]. Available: <https://swissmodel.expasy.org/qmean/help>
52. Help. [cited 20 Nov 2022]. Available: <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>
53. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596: 583–589.
54. Mariani V, Biasini M, Barbato A, Schwede T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*. 2013;29: 2722–2728.
55. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996. pp. 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
56. InterPro. [cited 20 Nov 2022]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
57. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact*. 2012;11: 56.
58. Freibert S-A, Goldberg AV, Hacker C, Molik S, Dean P, Williams TA, et al. Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron–sulfur cluster biosynthesis. *Nature Communications*. 2017. doi:10.1038/ncomms13932
59. Baty F, Ritz C, Charles S, Brutsche M, Flandrois J-P, Delignette-Muller M-L. A Toolbox for Nonlinear Regression in *R*: The Package **nlstools**. *Journal of Statistical Software*. 2015. doi:10.18637/jss.v066.i05
60. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods*. 2022;19: 679–682.
61. Krieger E, Vriend G. New ways to boost molecular dynamics simulations. *J Comput Chem*. 2015;36: 996–1007.
62. Case DA, Metin Aktulga H, Belfon K, Ben-Shalom I, Brozell SR, Cerutti DS, et al. Amber 2021. University of California, San Francisco; 2021.
63. Searle SR, Speed FM, Milliken GA. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. *The American Statistician*. 1980. p. 216. doi:10.2307/2684063
64. Lindstrom MJ. Linear and Nonlinear Mixed-effects Models for Repeated Measures Data.

1987.