



**Modulación de la dinámica estructural y funcional de la proteína
mitocondrial humana ISCU2 mediante Nanoanticuerpos**

Febrero 2025

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Autor: Naira Rodriguez

Director: Javier Santos

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

Naira Rodriguez

Naira Rodriguez

Javier Santos

Javier Santos

Agradecimientos

Esta tesis marca el final de una etapa llena de desafíos, emociones y aprendizajes. Este camino no podría haberlo recorrido sin todas las personas que estuvieron a mi lado.

Quiero comenzar agradeciendo a FCEN y a la UBA, y a todos mis increíbles docentes a lo largo de los años, por haberme brindado las herramientas para llegar hasta acá. Su pasión y entrega fueron una guía constante en este camino.

Al IB3 y a todos mis compañeros de laboratorio, gracias por recibirme con los brazos abiertos y tratarme siempre como un igual. Su generosidad infinita, su disposición para ayudarme sin dudarlo y su paciencia para responder mis dudas una y mil veces hicieron que este proceso fuera mucho más fácil. Nada de este trabajo habría sido posible sin ustedes. Gracias a la Dra. Itatí Ibañez y su grupo, por su valioso aporte en la obtención de los nanoanticuerpos que forman parte de este trabajo.

Gracias Javi y Flor, por introducirme en el mundo de las proteínas, por formarme con tanta dedicación durante estos años y por hacerme tomar conciencia sobre las EPOF. Espero algún día poder devolverles todo lo que me dieron.

Gracias eternas a mis amigos de la facu, que me acompañaron toda la carrera y sin los cuales no hubiera sobrevivido ni un cuatrimestre. Me enseñaron, me apoyaron, pero sobre todo, me hicieron reír aun cuando la rutina se hacía cuesta arriba. Gracias May, Ro y Mel, amigas desde que tengo uso de razón, por hacerme siempre el aguante y por estar ahí sin importar cuánto tiempo pasara. Ahora seguro tendré más tiempo libre para juntarnos.

Gracias a mi familia, por estar siempre conmigo y alentarme en cualquier cosa que me proponga. Gracias a mis tíos Ale, Ceci, Hugo, Lili, Moni, Mir y Fabi, por no dejarme bajar los brazos nunca y alegrarse con cada buena noticia. Gracias Virgi y Juan por celebrar conmigo cada logro y por su cariño incondicional.

Y, finalmente, a quienes más amor, paciencia y apoyo me dieron: Joaquín, Damián y mamá. Gracias Damián por ser mi sostén, por escucharme practicar todas las veces necesarias las clases o los seminarios, por calmar mis nervios antes de cada parcial y por siempre decirme que todo va a estar bien. Sos el mejor compañero que podría tener. Gracias má, por ser la mejor, por permitirme hacer esta carrera tan desafiante y por ayudarme a crecer estando ahí siempre al pie del cañón. No hubiera logrado nada sin ustedes.

Índice

Resumen.....	4
Title	5
Summary	5
Introducción	6
1. Estructura y función de ISCU2.....	6
1.1. Localización subcelular y estructura primaria.....	6
1.2. Estructura secundaria y terciaria.....	8
1.3. ISCU2 en su contexto macromolecular: El supercomplejo proteico involucrado en la formación de centros ferrosulfurados.....	9
1.4. Conservación de la secuencia y la estructura.....	13
2. Miopatía por Deficiencia de ISCU2: Caracterización genética y manifestaciones fisiopatológicas.....	15
3. Producción y aplicaciones de los Nanoanticuerpos: Conceptos generales y obtención específica.....	16
3.1. Definición y proceso de obtención de nanoanticuerpos.....	16
3.2. Producción de nanoanticuerpos dirigidos contra ISCU2.....	18
Hipótesis y objetivos	19
Materiales y métodos.....	20
1. SDS-PAGE.....	20
2. Purificación de proteínas ISCU2, NB 2A9 y NIA.....	21
2.1. Expresión y purificación de la proteína ISCU2	21
2.2. Expresión y purificación del complejo de proteínas NIA	22
2.3. Expresión y purificación del nanoanticuerpo 2A9	23
3. Dicroísmo circular.....	24
4. Ensayo de actividad desulfurasa	25
5. Cromatografía de exclusión molecular	26
6. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.....	26
7. Biotinilación de ISCU2.....	26
8. Interferometría de Biocapas	27
9. Análisis estadístico	28
Resultados	28
1. Predicciones de las estructuras de los complejos ISCU2:NB y elección del nanoanticuerpo a estudiar	28
1.1. Predicciones de la interacción entre cada uno de los nanoanticuerpos e ISCU2 utilizando AlphaFold 2.....	28

1.2.	Propiedades y características estructurales del NB_2A9.....	30
2.	Biofísica de la interacción del complejo ISCU2:NB_2A9.....	31
2.1.	Producción de ISCU2, NB_2A9 y NIA	31
2.2.	Validación de la interacción del complejo ISCU2:NB_2A9.....	35
2.2.1.	Cromatografía de exclusión molecular.....	35
2.2.2.	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.....	37
2.2.3.	Dicroísmo circular.....	38
2.2.4.	Interferometría de Biocapas.....	40
3.	Ánalisis de la estabilidad del complejo ISCU2:NB_2A9 mediante despliegado por temperatura seguido por dicroísmo circular.....	42
4.	Aspectos funcionales de la interacción ISCU2:NB_2A9 en el contexto del supercomplejo humano.....	44
5.	Reevaluación del complejo ISCU2:NB_2A9 utilizando AlphaFold 3.....	46
Discusión y conclusiones finales	50	
Bibliografía	54	

Resumen

La proteína mitocondrial humana ISCU2 forma parte del supercomplejo ISC, el cual es esencial para la biogénesis de centros hierro-azufre (Fe-S). Varias enfermedades poco frecuentes se han asociado con variantes patogénicas de las proteínas y enzimas involucradas en esta vía biosintética. En particular, algunas mutaciones en el gen que codifica ISCU2 se asocian con la Miopatía por deficiencia de ISCU2, una enfermedad caracterizada por alteraciones en la energética celular. El objetivo principal del trabajo es investigar la interacción entre ISCU2 y posibles tutores moleculares. Para ello, se seleccionaron nanoanticuerpos dirigidos contra esta proteína (anti-ISCU2) como andamiaje para dichos tutores moleculares, con el fin de modular su actividad y estabilizar su forma biológicamente activa. Este enfoque busca abrir nuevas vías terapéuticas basadas en la estabilización y el correcto plegamiento de proteínas, con el propósito de mejorar la formación de centros Fe-S y, por ende, mejorar la energética de las células afectadas por la deficiencia de ISCU2. En este trabajo, tres nanoanticuerpos seleccionados por nuestro laboratorio mediante la técnica de *display* en fagos, fueron evaluados computacionalmente. Como punto de partida, se estudiaron los complejos ISCU2:nanoanticuerpo hallados mediante la aplicación de AlphaFold 2 y se evaluó su conformación en el contexto del supercomplejo de biosíntesis de

centros Fe-S. Se decidió estudiar al nanoanticuerpo que, al unirse a ISCU2, mostró menor interferencia en las interacciones de ISCU2 con las demás subunidades del supercomplejo ISC. Este nanoanticuerpo (NB 2A9), al igual que las demás proteínas utilizadas (NFS1/ACP-ISD11, FXN e ISCU2), fue expresado en bacterias para su análisis experimental. El NB 2A9 presentó una elevada resistencia al despliegado por temperatura ($T_m = 71.9$ °C) que, asimismo, se vio incrementada tras la adición de ISCU2 ($T_m = 76.1$ °C). La interacción entre ISCU2 y NB 2A9 fue estudiada por ELISA, interferometría de biocapas, dicroísmo circular y cromatografía de exclusión molecular. Además, se analizó el efecto del NB 2A9 sobre la actividad desulfurasa del supercomplejo. La adición del NB 2A9 tuvo un efecto moderadamente inhibitorio, lo que sugiere que la interacción podría derivar en una perturbación de la conformación y/o de la interacción de ISCU2 con el resto de las subunidades del supercomplejo ISC. En este contexto, se realizó una nueva predicción de la estructura de los complejos ISCU2:nanoanticuerpo pero utilizando AlphaFold 3, la nueva versión del predictor. El análisis de los resultados informáticos obtenidos sugirió, en este caso, una conformación del complejo ISCU2:NB_2A9 que resulta incompatible con la formación del supercomplejo ISC. En base a los resultados obtenidos, se propone que el NB 2A9 podría afectar la correcta interacción entre las subunidades del supercomplejo. Esto interferiría con la formación del supercomplejo funcional y, por ende, disminuiría la actividad desulfurasa del mismo.

Title

Modulation of the structural and functional dynamics of the human mitochondrial protein ISCU2 using Nanoantibodies

Summary

The human mitochondrial protein ISCU2 is part of the ISC supercomplex, which is essential for the biogenesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters. Several rare diseases have been associated with pathogenic variants of the proteins and enzymes involved in this biosynthetic pathway. In particular, some mutations in the gene encoding ISCU2 are associated with ISCU2 Deficiency Myopathy, a disease characterized by alterations in cellular energetics. The main objective of this work is to investigate the interaction between ISCU2 and potential molecular chaperones. To this end, nanobodies directed against this protein (anti-ISCU2) were selected as scaffolds for these molecular chaperones, aiming to modulate its activity and stabilize its biologically

active form. This approach seeks to open new therapeutic avenues based on the stabilization and proper folding of proteins, with the goal of improving Fe-S cluster formation and, consequently, enhancing the energetics of cells affected by ISCU2 deficiency. In this study, three nanobodies selected by our laboratory using the phage display technique were computationally evaluated. As a starting point, the ISCU2:nanobody complexes identified were studied through the application of AlphaFold 2, and their conformation was assessed in the context of the Fe-S cluster biosynthesis supercomplex. The nanobody that exhibited the least interference with ISCU2's interactions with other ISC supercomplex subunits upon binding was chosen for further study. This nanobody (NB 2A9), along with the other proteins used (NFS1/ACP-ISD11, FXN, and ISCU2), was expressed in bacteria for experimental analysis. NB 2A9 demonstrated high resistance to temperature-induced unfolding ($T_m = 71.9^\circ\text{C}$), which further increased upon the addition of ISCU2 ($T_m = 76.1^\circ\text{C}$). The interaction between ISCU2 and NB 2A9 was studied using ELISA, biolayer interferometry, circular dichroism, and size-exclusion chromatography. Additionally, the effect of NB 2A9 on the desulfurase activity of the supercomplex was analyzed. The addition of NB 2A9 had a moderately inhibitory effect, suggesting that the interaction could lead to a perturbation of ISCU2's conformation and/or its interaction with the other subunits of the ISC supercomplex. In this context, a new prediction of the ISCU2:nanobody complex structure was performed using AlphaFold 3, the latest version of the predictor. The computational analysis of the obtained results suggested a conformation of the ISCU2:NB_2A9 complex that is incompatible with the formation of the ISC supercomplex. Based on the results obtained, it is proposed that NB 2A9 could affect the proper interaction between the subunits of the ISC supercomplex. This would interfere with the formation of the functional supercomplex and, consequently, reduce its desulfurase activity.

Introducción

1. Estructura y función de ISCU2.

1.1. Localización subcelular y estructura primaria.

La enzima de ensamblaje de centros de hierro y azufre (ISCU) es una proteína de tamaño pequeño que está codificada en el ADN nuclear. Se identifican dos isoformas de ISCU en humanos, ISCU1 e ISCU2, que se diferencian principalmente en su extremo N-terminal. Ambas isoformas comparten la misma porción funcional, y se sugiere que la variación en la secuencia se debe a mecanismos de *splicing* alternativo y utilización diferencial de sitios de

inicio de traducción [1,2]. ISCU2 se asocia con la forma mitocondrial de la cisteína desulfurasa (NFS1), mientras que ISCU1 se asocia con la forma citosólica de NFS1, lo que refuerza la idea de que los procesos de ensamblaje de centros Fe-S ocurren en múltiples compartimentos subcelulares [3].

La secuencia del precursor de ISCU2 contiene en su extremo N-terminal múltiples residuos hidrofóbicos (A, L) y otros cargados positivamente (R). Esto es característico de las señales de localización mitocondrial y coincidente con el análisis bioinformático realizado utilizando la herramienta TargetP 2.0, diseñada para predecir secuencias señal en proteínas [4]. El análisis realizado indica la presencia de una secuencia de transporte mitocondrial (*Mitochondrial Targeting Sequence*, MTS) en la región N-terminal (**Figura 1**).

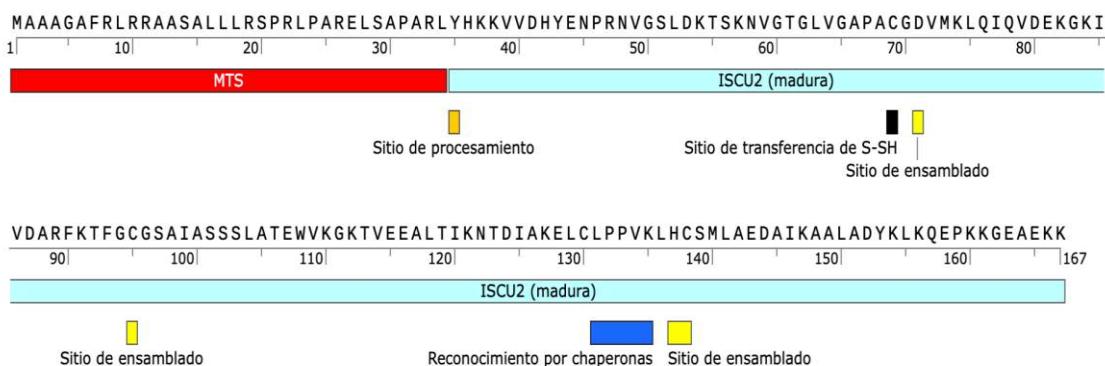


Figura 1. Secuencia del precursor de ISCU2 humana. Se muestran en amarillo, los aminoácidos que conforman el sitio de ensamblado (Cys95, Cys138, His137 y Asp71), y en negro, el sitio de transferencia de persulfuro (Cys69) desde la desulfurasa NFS1. En rojo, se resalta el sitio de proteólisis del MTS inferido experimentalmente [3]. En azul, se resalta la secuencia LPPVK reconocida por las chaperonas HSPA9/HSCB para la transferencia de Fe–S desde ISCU2 hacia otros aceptores. La secuencia de la proteína ISCU2 de *Homo sapiens* fue obtenida de la base de datos UniProt (ID: Q9H1K1).

El precursor de ISCU2 consta de 167 aminoácidos, una masa molecular de 17999.00 Da y un punto isoeléctrico de 9.54. En la variante humana, el sitio de ensamblado de ISCU2 está compuesto por dos residuos de cisteína (Cys95 y Cys138) [5, 6], un residuo de histidina (His137) y un residuo de ácido aspártico (Asp71) [7, 8], mientras que una cisteína específica (Cys69) es la encargada de recibir el persulfuro desde NFS1 [5, 6]. Además, presenta una secuencia LPPVK (residuos 131–135), que es reconocida por las chaperonas HSPA9/HSCB y resulta esencial para la transferencia de los centros Fe–S desde ISCU2 hacia proteínas acceptoras [9].

Por su parte, la proteína recombinante utilizada para los ensayos realizados en esta tesis (**Figura 2**) posee una longitud de 148 aminoácidos, una masa molecular de 16296.75 Da y un punto isoeléctrico teórico de 8.28 [10,11]. Esta proteína recombinante no posee el segmento MTS codificado en la secuencia del precursor y, además, posee en su extremo C-terminal un His-tag, utilizado para su purificación mediante resinas de tipo NTA-Ni²⁺. Si bien esta variante es activa, por lo que no es un requerimiento la eliminación de este segmento de histidinas, se observó previamente en nuestro laboratorio que la ubicación del His-tag en el extremo N-terminal tiene consecuencias negativas sobre la interacción con el resto de las subunidades del supercomplejo (resultados no publicados).

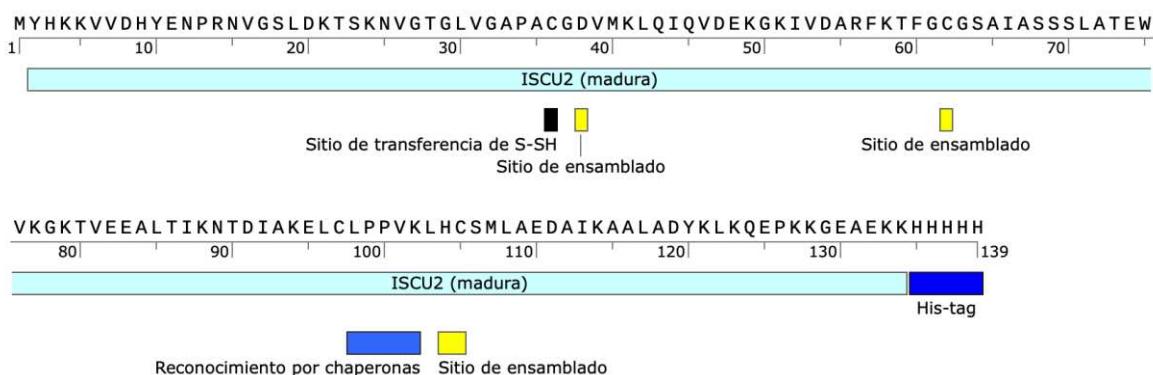


Figura 2. Secuencia de ISCU2 recombinante. En amarillo, se muestran los aminoácidos que conforman el sitio de ensamblado (Cys95, Cys138, His137 y Asp71) y, en negro, el sitio de transferencia de persulfuro (Cys69) desde la desulfurasa NFS1, los cuales se mantienen en la secuencia recombinante. También se conserva la región de reconocimiento por chaperonas, marcada en azul. Además, se muestran los residuos de histidinas correspondientes al His-tag agregado a la secuencia.

1.2. Estructura secundaria y terciaria.

La estructura de ISCU2 se conoce desde hace cerca de veinte años (variante de ratón, PDB ID: 1WFZ, **Figura 3**). La proteína presenta una arquitectura estructural caracterizada por tres elementos de estructura secundaria tipo hélice α, los cuales se disponen sobre una lámina β conformada por tres hebras antiparalelas. De estas hélices, dos son más extensas y establecen una interacción directa con la superficie β. En los extremos N- y C-terminales, la proteína exhibe prolongaciones desordenadas, una característica observable en los modelos estructurales obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se presentan en la **Figura 3**, dos vistas representativas de uno de los confórmeros modelados, permitiendo una visualización de la organización espacial y la interacción entre los distintos elementos estructurales.

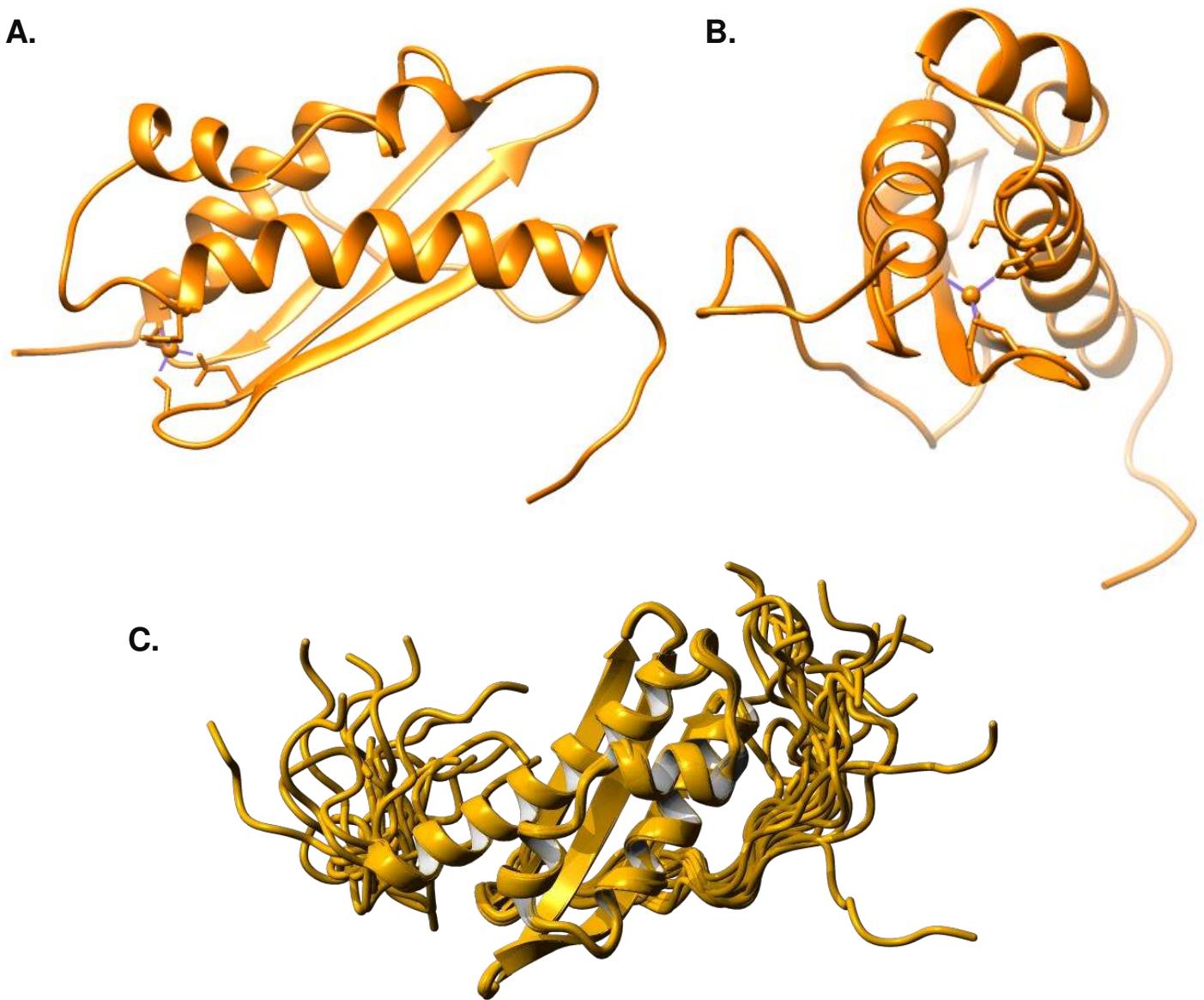


Figura 3. Estructura terciaria de ISCU2 de ratón. (A, B) Se presentan dos vistas de la estructura tridimensional de ISCU2. Se visualiza un ión de Zn ubicado en el sitio activo sobre ISCU2. (C) Se muestra la superposición de 20 modelos compatibles con los datos experimentales de RMN (PDB ID: 1WFZ).

1.3. ISCU2 en su contexto macromolecular: El supercomplejo proteico involucrado en la formación de centros ferrosulfurados.

Los centros Fe-S son estructuras esenciales en diversas funciones biológicas, puesto que numerosas funciones enzimáticas dependen de estos co-factores. Algunos ejemplos incluyen los complejos de la cadena respiratoria [12,13], succinato deshidrogenasa y aconitasa [14], reparación del ADN [15], modificaciones químicas de los tRNAs [16], entre otras. La biogénesis de estos centros es un proceso complejo que involucra múltiples proteínas y pasos, principalmente llevados a cabo por el supercomplejo de ensamblaje de centros de hierro-azufre (*Iron-Sulfur Cluster assembly*, ISC).

El complejo ISC, compuesto por NFS1, ACP, ISD11, FXN e ISCU2, facilita la síntesis y transferencia de centros Fe-S [7, 17]. Este complejo se origina de un sistema evolutivamente conservado que se remonta a las bacterias, lo que subraya su importancia biológica. En mamíferos, el supercomplejo mitocondrial para la síntesis de estos centros se presenta como un complejo entre dos hetero-multímeros iguales, cada uno de los cuales tiene un sitio activo sobre el que se forma un centro Fe-S [7, 17-19]. Como se mencionó anteriormente, ISCU2 desempeña un papel esencial en la biosíntesis de los centros Fe-S y forma parte integral del complejo ISC. En su superficie, ISCU2 actúa como una proteína de andamiaje donde se ensamblan los centros Fe-S, uniendo hierro (II) e interactuando con el sitio activo de NFS1.

La cisteína desulfurasa NFS1 eucariota es una enzima clave que se traduce inicialmente como un precursor de 50 kDa, que es importado y procesado en la matriz mitocondrial. También se ha descripto una variante de splicing alternativo que deriva en una enzima de ubicación citosólica y nuclear. En su forma madura, la enzima se encuentra estructurada como un dímero. La actividad catalítica de NFS1 depende del piridoxal-fosfato (PLP) y de su interacción con la proteína ISD11; esta interacción disminuye la tendencia de NFS1 a agregación y estabiliza la forma dimérica. A su vez, ISD11 forma un heterodímero estable con la proteína ACP (*Acyl carrier protein*) [20]. Otra de las proteínas esenciales es la frataxina (FXN), que interactúa con ISCU2 y ambas moléculas de NFS1, localizándose cerca del sitio activo (**Figura 4**). Su función principal es actuar como un activador cinético, modulando positivamente tanto la actividad desulfurasa de NFS1 como la transferencia del grupo persulfuro a ISCU2, lo que facilita la formación de los centros Fe-S [21-23]. La presencia de mutaciones o defectos de expresión de estas proteínas conducen a deficiencias en la formación de centros Fe-S y a una amplia variedad de enfermedades poco frecuentes.

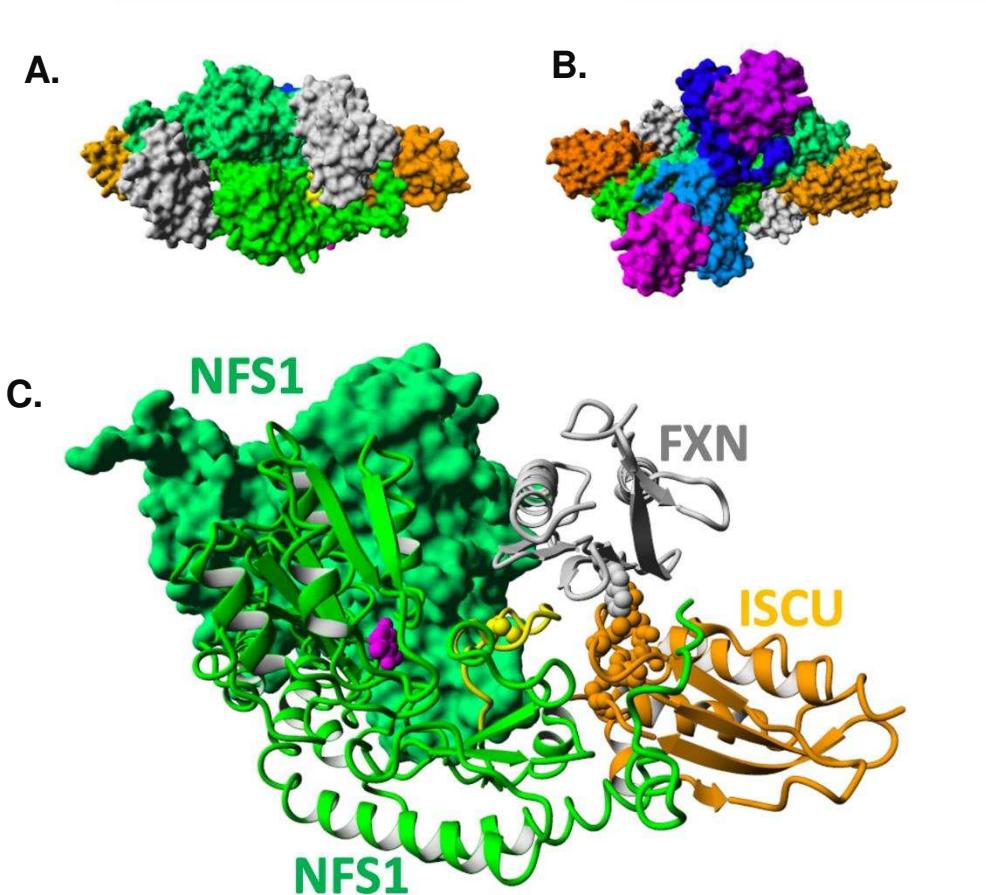


Figura 4. Conformación del complejo mitocondrial ISC. (A, B) Dos vistas del supercomplejo humano formado por las proteínas NFS1 (verde), ISD11 (celeste y azul), ACP (magenta), ISCU2 (naranja) y FXN (gris). (C) Acercamiento a uno de los dos sitios catalíticos equivalentes del supercomplejo. Se representan en naranja ISCU2, en verde NFS1 y en gris FXN. En magenta se muestra la molécula de PLP, mientras que en amarillo se representa a la Cys 381 de NFS1 que transporta al persulfuro desde el sitio PLP hacia la superficie de ISCU2. En representación de esferas naranjas se muestran residuos del sitio de ensamblado sobre ISCU2 (PDB: 6NZU).

El proceso de formación de centros Fe-S se puede dividir en tres etapas (**Figura 5**):

1. **Síntesis de centros ferrosulfurados de novo:** NIA (NFS1-ISD11-ACP) consume L-cisteína libre y forma un persulfuro (-S-SH) sobre la cisteína 381 de NFS1, liberando L-alanina como subproducto [22]. En un segundo paso, este persulfuro se transfiere a la cisteína 69 de ISCU2, quedando en cercanía al sitio de unión de hierro sobre la misma proteína (conformado por Cys138, Cys95, Asp71 y His137). Luego, la ferredoxina FDX2 genera, a partir del persulfuro sobre ISCU2, el sulfuro necesario para el ensamblado del centro [2Fe-2S] [5]. FXN modula los dos primeros pasos [7, 23].

2. **Tráfico de centros Fe-S:** 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 ISCU2 está mediada por un sistema de chaperonas (HSPA9, HSC20 y GRPE1), que realiza el paso del centro de ISCU2 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].
3. **Inserción en Apoproteínas:** Finalmente, los centros Fe-S se insertan en las apoproteínas mediante factores de localización específicos, completando así el proceso de biogénesis [28].

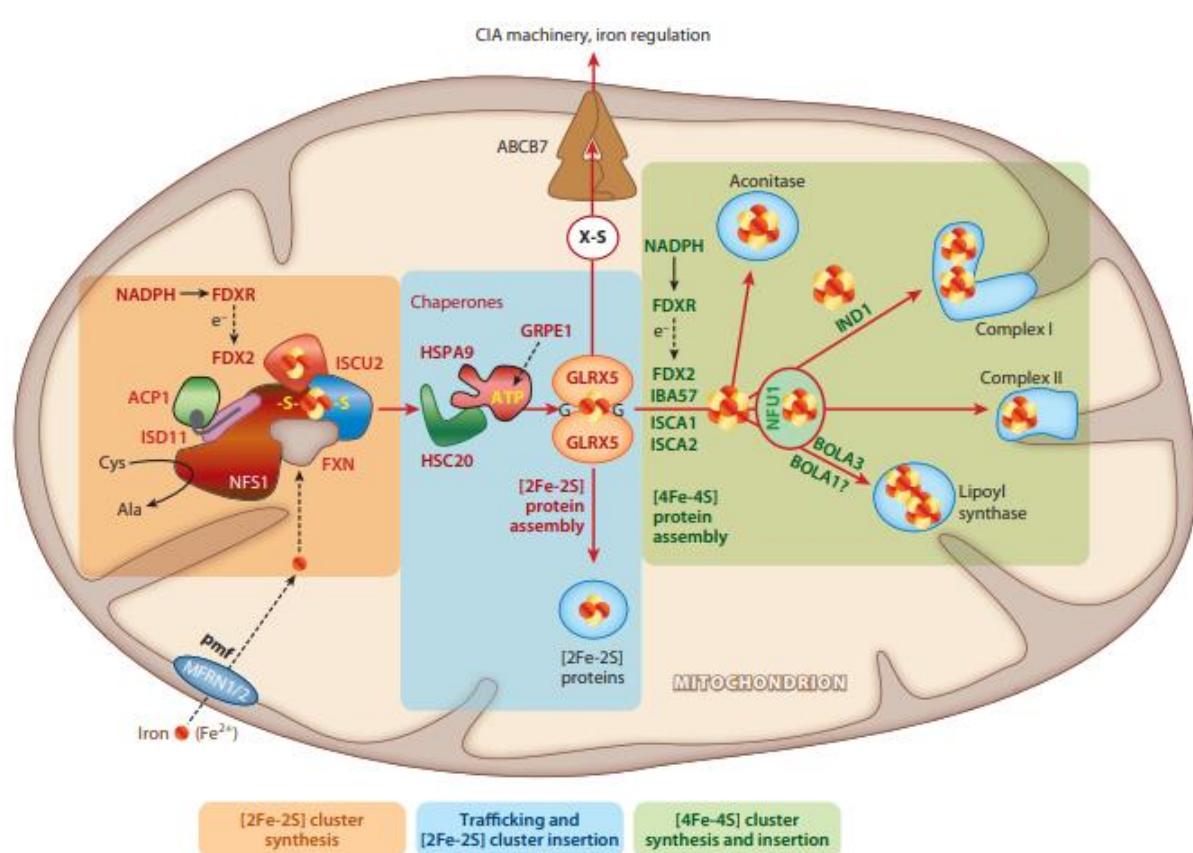


Figura 5. Modelo de la ruta de ensamblaje de centros ferrosulfurados mitocondriales. La biogénesis de proteínas con centros Fe-S en mitocondrias sigue tres etapas: (1) Síntesis de un centro [2Fe-2S] en ISCU2 mediante el supercomplejo ISC. (2) Transferencia del centro [2Fe-2S] por chaperonas (HSPA9, HSC20, GRPE1) a GLRX5, que lo entrega a proteínas mitocondriales y genera un factor azufrado para ensamblajes citosólicos. (3) Conversión del centro [2Fe-2S] en [4Fe-4S] por ISCA1, ISCA2 e IBA57, y su incorporación a apoproteínas mediante NFU1 e IND1. Adaptado de Lill, R., & Freibert, 2020 [29].

La estructura molecular de ISCU2 en el contexto del supercomplejo de biosíntesis de centros Fe-S se conoce desde 2019 [20]. Sin embargo, no se ha determinado con certeza cómo es la dinámica conformacional de esta proteína, dado que se ha propuesto que ISCU2 podría formar dímeros durante el ciclo catalítico para el ensamblaje de centros 2Fe-2S [14]. Se ha establecido que la interacción con metales, como hierro y/o zinc, induce cambios conformacionales significativos, así como alteraciones en su estabilidad estructural [30]. Además, se postula que ISCU2 podría explorar un amplio espacio conformacional y que podría estructurarse con la interacción con el resto de las proteínas del supercomplejo.

1.4. Conservación de la secuencia y la estructura.

ISCU2 deriva de la maquinaria ISC presente en bacterias, la cual fue transferida a mitocondrias eucariotas a través de un evento endosimbiótico con bacterias del linaje de las alfa-proteobacterias [29]. Esta transferencia refleja una herencia evolutiva que ha conservado tanto la estructura como las funciones esenciales de ISCU2. En todos los dominios de la vida, la estructura tridimensional de ISCU2 está optimizada para coordinar hierro y azufre mediante residuos de cisteína altamente conservados [31, 32]. Estos residuos facilitan la formación de persulfuros y su posterior integración en los centros [2Fe-2S] y [4Fe-4S]. La ubicación estratégica de estos residuos dentro de la estructura de la proteína permite la transferencia eficiente de los centros hacia otras apoproteínas o componentes de tráfico.

En el contexto de su función biológica, ISCU2 exhibe una alta conservación en las secuencias que forman los motivos funcionales esenciales (**Figura 6**), como el loop LPPVK y las cisteínas que forman enlaces persulfuro [8, 33]. Estos elementos permiten la interacción con otras proteínas clave, como las desulfurasa NFS1 en eucariotas e IscS en bacterias. En bacterias y arqueas, estas interacciones son complementadas por proteínas accesorias, como CyaY e IscX, que también están conservadas evolutivamente, aunque su rol específico varía según el contexto fisiológico.

La funcionalidad de ISCU2 en eucariotas también depende de su interacción con FXN. Estudios recientes han sugerido que este mecanismo de activación mediante FXN podría estar ausente o ser menos prominente en bacterias, reflejando adaptaciones evolutivas que incrementan la complejidad de las interacciones en eucariotas [34].

Aunque la maquinaria ISC es el sistema predominante en bacterias y mitocondrias, su presencia en Archaea a menudo está acompañada de elementos del sistema SUF (*Sulfur Mobilization*). Estas variantes permiten a las arqueas adaptarse a ambientes extremos, reflejando una evolución divergente dentro de un marco estructural y funcional común [35].

En bacterias como *Escherichia coli*, ISCU2 se encuentra dentro de un operón isc que incluye otros factores esenciales, como IscA, HscA, y HscB, los cuales asisten en el ensamblaje y la transferencia de centros Fe-S [36]. En eucariotas, ISCU2 forma parte de una red más compleja que incluye hasta 18 componentes proteicos en el sistema ISC mitocondrial, como las chaperonas HSPA9 y HSC20, que facilitan la disociación y transferencia del centro desde el andamiaje [37, 38].



Figura 6. Alineamiento múltiple de las secuencias de ISCU2 de diferentes organismos. Se muestra el alineamiento realizado con MUSCLE y visualizado mediante SeaView para organismos pertenecientes a los grupos Eukarya (resaltados en rojo), Archaea (resaltados en amarillo) y Bacteria (resaltados en verde). Las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos de NCBI. Se marcan en recuadros negros los sitios relevantes de la secuencia de ISCU2 humana: (A) sitio de proteólisis inferido experimentalmente, (B) la cisteína 69, (C) el ácido aspartico 71, (D) la cisteína 95, (E) el sitio LPPVK, (F) la histidina 137 y la cisteína 138.

2. Miopatía por Deficiencia de ISCU2: Caracterización genética y manifestaciones fisiopatológicas.

Alteraciones en la expresión o funcionalidad de ISCU2, como producto de errores de *splicing*, producen Miopatía por Deficiencia de ISCU2. Esta enfermedad poco frecuente afecta principalmente a los músculos, causando atrofia muscular e hipertrofia cardíaca, junto con acidosis láctica, deficiencia de succinato deshidrogenasa y aconitasa. Se caracteriza por fatiga temprana de inicio en la infancia, disnea y palpitaciones ante esfuerzos mínimos, así como episodios potencialmente mortales de acidosis metabólica [39-42].

Esta enfermedad se hereda predominantemente de manera autosómica recesiva y ha sido reportada en aproximadamente 20 individuos en el mundo, siendo la mayoría de los pacientes de ascendencia sueca, aunque también se han identificado pacientes de otros orígenes étnicos [43]. La deficiencia de ISCU2 se ha vinculado a variantes patogénicas como las mutaciones intrónicas c.418+382G>C, g.7044G>C [44] e IVS5+382 G>C [45], así como a una mutación puntual de cambio de sentido c.149G>A en el exón 3 [46]. Esta alteración genética da lugar a un *splicing* anómalo del ARN mensajero de ISCU, lo que genera predominantemente dos transcritos aberrantes en los pacientes. Estos ARN mensajeros anómalos codifican una forma truncada de la proteína ISCU2, caracterizada por una vida media extremadamente corta. Como consecuencia, la proteína truncada pierde su capacidad funcional en el ensamblaje de los centros Fe-S, lo que interfiere significativamente con su rol biológico [39].

Puntualmente, la mutación G50E (**Figura 7**, sustitución de glicina por ácido glutámico) afecta la funcionalidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, provocando una disminución en la eficiencia de la respiración celular. Además, las mitocondrias de células G50E presentan un incremento significativo de especies reactivas de oxígeno, lo que provoca estrés oxidativo y deterioro de las funciones mitocondriales [47].

En 2016, se identificó en un paciente italiano una mutación autosómica dominante *de novo* en el gen ISCU (c.287G>T; p.G96V), asociada con miopatía por deficiencia de ISCU2. Esta mutación generó un fenotipo similar al de la forma recesiva de la enfermedad, y estudios en levadura confirmaron tanto su carácter patogénico como su herencia dominante. En consecuencia, se clasificó como una mutación dominante heterocigota en ISCU2, que da lugar a un fenotipo semejante al de la variante recesiva de la enfermedad [48].

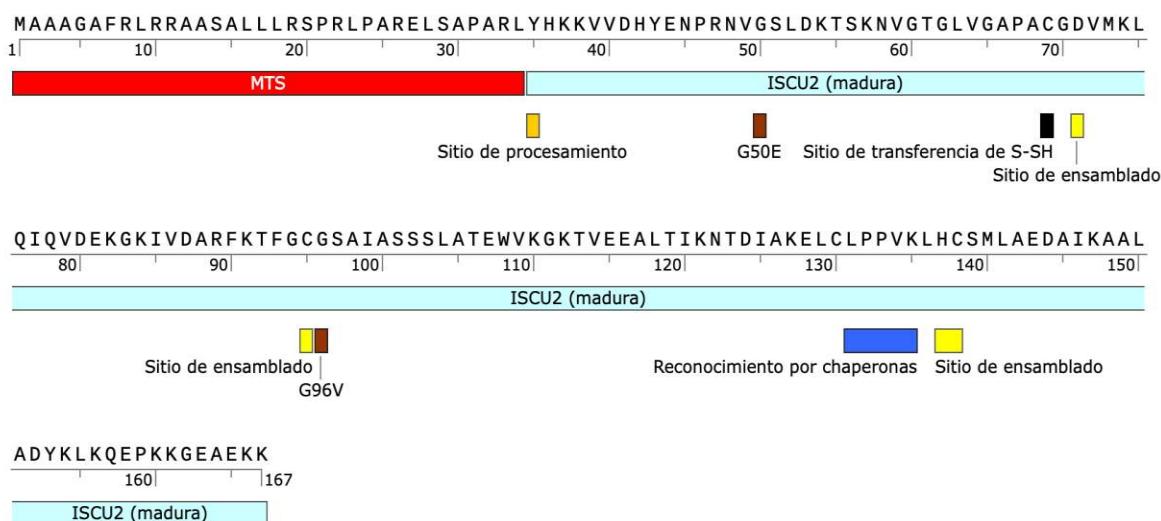


Figura 7. Secuencia del precursor de ISC2 humana y variantes patogénicas que derivan en Miopatía por Deficiencia de ISC2. En amarillo, se muestran los aminoácidos que conforman el sitio de ensamblado (Cys95, Cys138, His137 y Asp71) y, en negro, el sitio de transferencia de persulfuro (Cys69) desde la desulfurasa NFS1. En marrón se resaltan los residuos que, al mutar, derivan en variantes patogénicas (Gly50 y Gly96).

3. Producción y aplicaciones de los Nanoanticuerpos: Conceptos generales y obtención específica.

3.1. Definición y proceso de obtención de nanoanticuerpos.

Los nanoanticuerpos (NBs) son pequeños dominios proteicos derivados de anticuerpos que se producen en especies de la familia de los camélidos, como camellos, dromedarios, llamas y alpacas (**Figura 8**). En comparación con los anticuerpos convencionales, cuya masa molecular es de aproximadamente 150 kilodaltons (kDa), los nanoanticuerpos son diez veces más pequeños, con una masa molecular de aproximadamente 15 kDa [49]. La región del nanoanticuerpo responsable del reconocimiento del antígeno se denomina paratope y presenta una estructura similar a la de un anticuerpo convencional. Esta región está conformada por tres *loops*, denominados regiones determinantes de la complementariedad (*Complementarity-Determining Regions*, CDR). Cada uno de estos *loops* se identifica como CDR1, CDR2 y CDR3. Cabe destacar que, en los nanoanticuerpos, el tercer *loop* (CDR3) es considerablemente más largo, lo que les permite acceder a regiones cóncavas más profundas del antígeno, las cuales quedan fuera del alcance del CDR3 de un anticuerpo convencional [50].

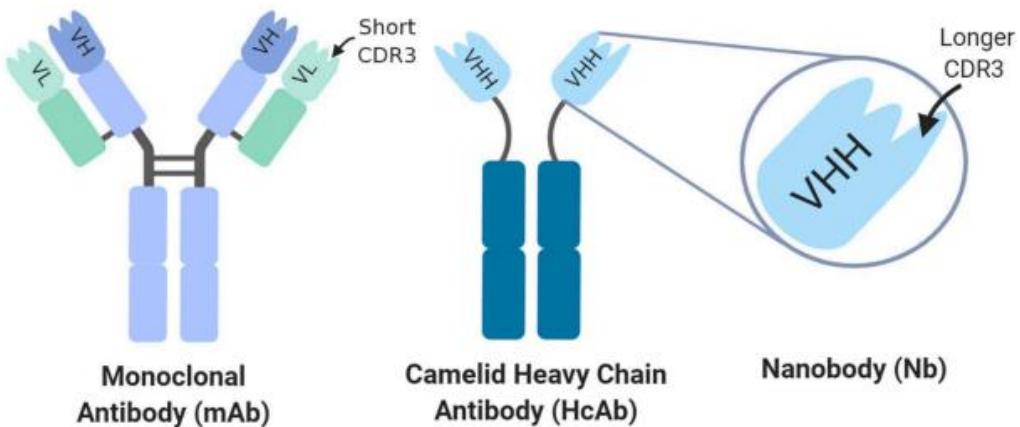


Figura 8. Estructura general de los nanoanticuerpos. Comparación entre un anticuerpo monoclonal (mAb) y un anticuerpo de cadena pesada (HcAb) para destacar las diferencias estructurales en sus respectivas regiones de unión al antígeno. El VHH (Variable Heavy Homodomain) posee tres CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3), siendo el CDR3 significativamente más largo en comparación con los dominios VH-VL de los mAbs, lo que le confiere afinidad por el antígeno y acceso a epítopos ocultos. Adaptado de Yang, E. Y., & Shah, K., 2020 [50].

Los nanoanticuerpos generados *in vivo* mediante inmunización y selección de proteínas correctamente plegadas, reconocen segmentos de aminoácidos discontinuos dentro de la conformación de la proteína nativa, es decir, epítopos conformatacionales. Esta capacidad los convierte en herramientas ideales para la estabilización selectiva de estados conformatacionales específicos de proteínas [51]. Otra ventaja de los nanoanticuerpos con respecto a los anticuerpos, es que, debido a su pequeño tamaño, tienen una mayor capacidad de penetración para llegar a sus blancos, además de que presentan una región altamente hidrofílica, lo que les brinda una excelente solubilidad [52]. En cuanto a su estabilidad, los nanoanticuerpos pueden resistir un amplio rango de temperaturas (-20°C a 80°C), tolerar ambientes con niveles de pH ácidos a alcalinos (3.0 a 9.0) y presiones elevadas (500-750 MPa). Esto los hace muy estables con posibilidad de administrarse a través de diversas vías, como oral, nasal, intravenosa, ocular, entre otras [53].

La generación de nanoanticuerpos comienza con la selección de un antígeno adecuado, generalmente una proteína correctamente plegada y capaz de inducir una respuesta inmune robusta (**Figura 9**). Tras la inmunización de camélidos con dosis repetidas, se extrae una muestra de sangre que contiene linfocitos B productores de anticuerpos. A partir de estas células, se aísla el ARN total y se sintetiza ADN complementario (cDNA), que codifica los nanoanticuerpos. Mediante PCR y primers específicos, se amplifican las secuencias de interés, las cuales se clonian en vectores de expresión, como los de *display* de fagos. Esta técnica permite exponer los nanoanticuerpos en la superficie de fagos y seleccionar aquellos

con mayor afinidad por el antígeno. Posteriormente, los nanoanticuerpos seleccionados se purifican, generalmente mediante cromatografía de afinidad, y se someten a análisis funcional y estructural para evaluar su afinidad, especificidad y estabilidad [51,53].

Protocolo de obtención de nanoanticuerpos

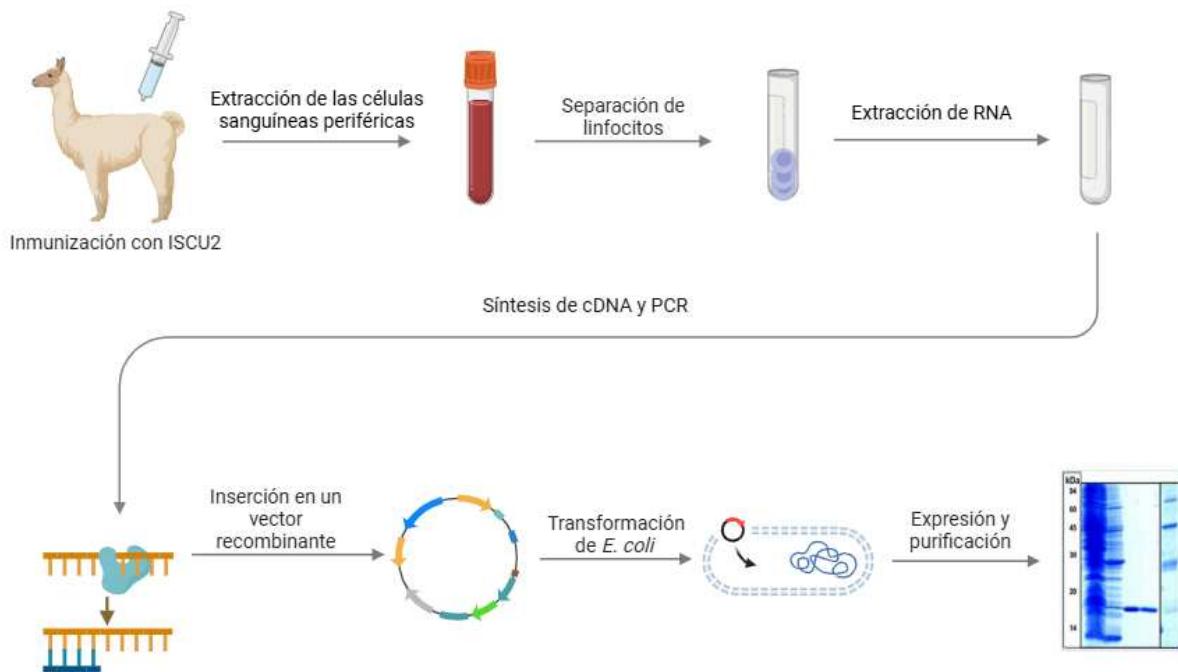


Figura 9. Procedimiento general para la producción de nanoanticuerpos anti ISCU2. Un camélido es sometido a inmunización con ISCU2. Tras la recolección de linfocitos, se procede al aislamiento de ARN mensajero (mRNA) y a la posterior síntesis de cDNA. El fragmento variable de los anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) se amplifica mediante PCR y luego se introduce en un vector apropiado. El fragmento variable del anticuerpo (VHH) es expresado en la superficie del fago M13. Posteriormente, se seleccionan las colonias con la mayor afinidad a través de un proceso de *panning* sobre fase sólida. Finalmente, el VHH soluble se expresa en *E. coli* WK6 y es purificado.

3.2. Producción de nanoanticuerpos dirigidos contra ISCU2.

En el laboratorio, y en colaboración con la Dra. Itatí Ibañez, se lograron identificar y seleccionar tres nanoanticuerpos específicos dirigidos contra ISCU2, denominados 2A9, 8B11 y 45H5. Estos nanoanticuerpos corresponden a dominios VHH de anticuerpos de camélidos, con una masa molecular de aproximadamente 15-16 kDa. A las secuencias obtenidas de los NBs, se les añadió un péptido señal para su exportación al periplasma (MIKYLLPTAAAGLLLAAQPAMA), una etiqueta C-terminal de hemaglutinina (YPYDVPDY) y un His-tag (HHHHHH).

Los tres nanoanticuerpos seleccionados poseen una longitud de secuencia aminoacídica similar y presentan un alto nivel de conservación global, aunque se observan diferencias puntuales en los aminoácidos que conforman las regiones determinantes de complementariedad (**Figura 10**). El nanoanticuerpo 2A9 presenta la mayor divergencia en términos de secuencia, particularmente en la región CDR3, como se muestra en la **Figura 10** (recuadro en rojo). En contraste, los nanoanticuerpos 8B11 y 45H5 parecen compartir una secuencia prácticamente idéntica en esta región.

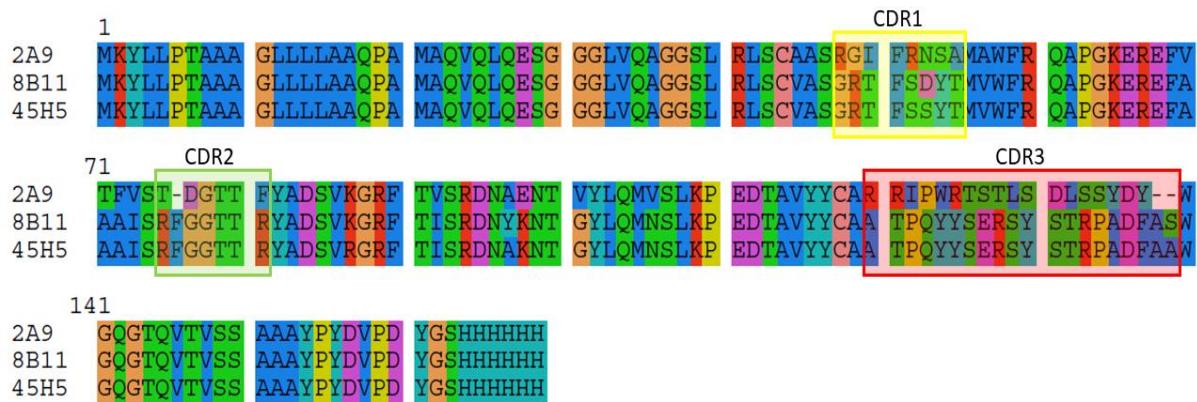


Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de tres nanoanticuerpos (2A9, 8B11 y 45H5) dirigidos contra ISCU2. Se muestra el alineamiento realizado con MUSCLE y visualizado mediante SeaView. Se visualizan los residuos conservados, mientras que las diferencias entre las secuencias son evidentes en las regiones determinantes de la complementariedad. Se remarcán los CDRs de los 3 nanoanticuerpos: CDR1 en amarillo, CDR2 en verde y CDR3 en rojo.

En base a todo lo expuesto, la dinámica estructural de ISCU2 parece desempeñar un papel fundamental en su función, lo que sugiere que la modulación de su conformación podría representar un objetivo estratégico para el desarrollo de intervenciones terapéuticas o para revelar aspectos mecanísticos de su rol en la síntesis de centros Fe-S. En este contexto, los nanoanticuerpos constituyen una herramienta valiosa para modular las propiedades estructurales de ISCU2 de manera específica, permitiendo la estabilización selectiva de conformaciones particulares de la proteína.

Hipótesis y objetivos

La interacción de ISCU2 con un nanoanticuerpo específico capaz de reconocer su conformación funcional, contribuirá a estabilizar el estado activo de la proteína. Esto desplazaría su equilibrio conformacional, modificaría su dinámica y, en última instancia, alteraría su función biológica.

El objetivo principal de este proyecto fue evaluar si la interacción de ISCU2 con un nanoanticuerpo tutor puede inducir su estabilización estructural y, de ser así, determinar cómo dicha estabilización afecta su espacio conformacional y su función biológica. Para ello, se propusieron cuatro objetivos específicos:

1. Producir y caracterizar la conformación de la proteína ISCU2 y del NB 2A9.
2. Validar la interacción *in vitro* de ISCU2 y el NB 2A9.
3. Analizar la estabilidad del complejo ISCU2:NB_2A9 *in vitro*.
4. Evaluar el impacto funcional de la interacción entre ISCU2 y NB 2A9 en el contexto del supercomplejo de biogénesis de centros Fe-S *in vitro*, abordando aspectos relacionados con la función biológica de ISCU2.

Materiales y métodos

1. SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para corroborar el peso molecular, cuantificar la masa y determinar el grado de pureza. Los geles preparados fueron de 0.75 mm de espesor y 6.7 cm de longitud, el porcentaje de acrilamida total para el gel *stacking* fue 4%, mientras que para el gel *running* fue de 16%. Para la confección de los geles se usó un *stock* de acrilamida de 48.5 % y N,N'-bis-metilacrilamida 1.5% (T 50%, C 3%), persulfato de amonio (APS) 0.1% y N, N, N', N'-tetrametiletilamina (TEMED) 0.146%. El gel *stacking* fue preparado en buffer Tris-HCl 130 mM, SDS 0.1%, pH 6.8. El gel *running* fue preparado en buffer Tris-HCl 400 mM, SDS 0.1%, pH 8.8, glicerol 10%. El *buffer* de corrida estaba compuesto por Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3. Se utilizó *buffer* de siembra 2×, compuesto por Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% y glicerol 20%. En algunos casos, el *buffer* siembra se suplementó con β-mercptoetanol 8% para trabajar en condiciones reductoras (4% concentración final).

Se sembró en cada calle del gel volúmenes de entre 5.0 a 25 µl con jeringa Hamilton. Las electroforesis se realizaron en una cuba Mini-PROTEAN Tetra cell (BIORAD) conectada a una fuente PowerPac Basic (BIORAD). Se corrieron a voltaje constante de 90 V cuando el frente de corrida (azul de bromofenol) se encontraba en el gel *stacking*, y 160 V a partir de

que el frente de corrida ingresaba al gel *running*. Las electroforesis fueron frenadas una vez que el frente de corrida llegaba al extremo inferior del gel.

La tinción de los geles se realizó mediante una solución colorante compuesta por *Commassie Brilliant Blue R-250* 0.25%, etanol 0.25%, etanol 30%, ácido acético glacial 10%. Los geles fueron desteñidos con solución decolorante: etanol 30%, ácido acético glacial 10%. El proceso de tinción y desteñido fue acelerado por calentamiento durante 30 segundos a 1 minuto en horno microondas de uso exclusivo para el laboratorio.

Se usaron como marcadores de peso molecular (*ladder*), dos marcadores diferentes, ambos producidos en el laboratorio. El primer marcador contenía BSA de 66 kDa (SIGMA-ALDRICH, A7906-100G, Lote: SLCH6345), la proteína fosfatasa 1 (38 kDa) [54], el dominio de unión al receptor de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (26 kDa) [55], una variante de frataxina humana (21 kDa) [56], frataxina humana *wild type* (14 kDa) [57] y una variante de afitina (8 kDa) [58]. El segundo marcador incluyó BSA de 66 kDa (SIGMA-ALDRICH, A7906-100G, Lote: SLCH6345), la subunidad NFS1 (48 kDa) [59], el dominio de unión al receptor de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (26 kDa) [55] y frataxina humana *wild type* (14 kDa) [57]. Para ambos marcadores, se utilizó una concentración aproximada de 0.5 mg/ml para cada proteína.

2. Purificación de proteínas ISCU2, NB 2A9 y NIA

La purificación de las proteínas se realizó utilizando una matriz Ni²⁺-NTA-agarosa. La etiqueta de histidinas (His-tag) interactúa específicamente con el Ni²⁺ de la resina, permitiendo que la proteína de interés se una a la matriz mientras se eliminan impurezas en pasos de lavado. La elución se realiza con imidazol, el cual compite con el His-tag por los sitios de unión al Ni²⁺, desplazando la proteína de la matriz y permitiendo su liberación de la matriz. Durante este último paso de elución, se recolectaron fracciones de 3-4 mL.

En el caso del NB 2A9, la purificación se realizó a partir del aislamiento del fluido osmótico que contiene la fracción de proteínas de localización periplasmática. Por el contrario, en los casos de ISCU2 y NIA, las purificaciones se llevaron adelante a partir de las fracciones solubles, luego de romper y centrifugar las bacterias. Asimismo, se evaluó la ausencia de ácidos nucléicos y, en el caso de que hubiera contaminación, las muestras fueron tratadas con DNAasa y vueltas a purificar.

2.1. Expresión y purificación de la proteína ISCU2

La secuencia de ADN de ISCU2 correspondiente a la forma madura fue clonada en un plásmido pET22b que codifica ISCU2 con un tag C-terminal de seis histidinas para su purificación, y cuya expresión se regula por IPTG 1mM. Se purificó ISCU2 a partir de 2L de bacterias *E. coli* BL21 inducidas durante 4h a 30°C y 250 rpm, y se utilizó una matriz Ni²⁺-NTA-agarosa equilibrada con buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.5. Luego de la siembra en la matriz, se realizó un lavado con buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 7.5. La elución se realizó con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, pH 7.5. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó una diálisis (4°C, en fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.5, DTT 1 mM). La pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE. La proteína se almacenó hasta su uso a -70 °C. La concentración se determinó espectroscópicamente usando un coeficiente de absorción $\epsilon_{280\text{nm}} = 11710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11].

Secuencia de aminoácidos de ISCU2:

MYHKKVVDHYENPRNVGSLDKTSKNGTGLVGAPACGDVMKLQIQVDEKGKIVDARFKTF
GCGSAIASSSLATEWVKGKTVEEALTIKDIAKECLPPVKLHCSMLAEDAIIKAALADYKLK
QEPKKGEAEKKENLYFQGLEHHHHHH

2.2. Expresión y purificación del complejo de proteínas NIA

El complejo NIA se refiere a la desulfurasa NFS1 (N), la proteína ISD11 (I) y la proteína ACP (A) humanas. En todos los casos, se utilizaron las variantes maduras de estas proteínas, es decir, sin el péptido señal. La producción de este complejo proteico se realizó mediante la co-expresión de las tres proteínas en *E. coli* BL21. La subunidad ACP humana fue subclonada en un vector pACYC con resistencia a cloranfenicol, mientras que NFS1 e ISD11 fueron subclonadas en un pETDuet con resistencia a ampicilina. Durante la expresión, se adicionó PLP, el cofactor de la desulfurasa NFS1, al cultivo. La purificación se realizó vía NTA-Ni²⁺ aprovechando que NFS1 posee 6 residuos de histidina adicionados para tal fin, y su expresión se reguló por IPTG 1mM. Se purificó NIA a partir de 2L de bacterias *E. coli* BL21 inducidas *overnight* a 28 °C y 250 rpm. Para la purificación se utilizó una matriz Ni²⁺-NTA-agarosa equilibrada con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8. Se realizó un primer lavado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, y un segundo lavado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM. La elución se realizó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó una diálisis (4°C, en Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 8, DTT 1 mM). La pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE. La proteína se almacenó hasta su uso a -70 °C. La

concentración se determinó espectroscópicamente usando un coeficiente de absorción $\epsilon_{280\text{nm}} = 53750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11].

Secuencia de aminoácidos de NFS1:

MRGSHHHHHHLVPRGSRPLYMDVQATTPLDPRVLDAMLPYLINYYGNPHSRTHAYGWES
EAAMERARQQVASLIGADPREIIFTSGATESNNIAIKGVAFYRSRKHLITTQTEHKCVLDS
CRSLEAEGFQVTYLPVKSGIIDLKELEAAIQPDTSLVSVMVNNEIGVKQPIAEIGRICSSRK
VYFHTDAAQAVGKIPLDVNNDMKIDLMSISGHKIYGPKGVGAIYIRRRPRVRVEALQSGGGQE
RGMRSGTVPTPLVVGLGAACEVAQQEMEYDHKRISKLSERLIQNIMKSLPDVVMNGDPKH
HYPGCINLSFAYVEGESLLMALKDVALSSGACTSASLEPSYVLRAIGTDEDLAHSSIRFGIG
RFTTEEEVDYTVEKCIQHVKRLREMSPLWEMVQDGIDLKSIKWTQH

Secuencia de aminoácidos de ISD11:

MHHHHHHENLYFQGAASSRAQVLSYRAMLRESKRFSAINYRTYAVRRIRDAFRENKNVK
DPVEIQLVNVAKRDLGVIRRQVHIGQLYSTDKLIIENRDMPRT

Secuencia de aminoácidos de ACP:

MSDMPPPLTLEGIQDRVLYVLKLYDKIDPEKLSVNSHFMKDLGLSDLQVEIIMAMEDEFGFEI
PDIDAEKLMCPQEIVDYIADKKDVYE

2.3. Expresión y purificación del nanoanticuerpo 2A9

La secuencia de ADN correspondiente al nanoanticuerpo NB 2A9 precedida por un péptido señal para la exportación al periplasma (MKYLLPTAAAGLLLAAQPAMA, secuencia PeLB [69]), y las etiquetas C-terminales de hemaglutinina (YPYDVPDY) y el His-Tag (HHHHHH), fueron clonadas en un vector de expresión. Se transformaron células *E. coli* WK6 con estas construcciones. La inducción se llevó a cabo mediante IPTG 1 mM (4 horas, 37 °C y 190 rpm). El fluido del periplasma se recuperó mediante un shock osmótico. Para ello, el pellet correspondiente a 2L de WK6 se resuspendió en 30 mL de buffer TES (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y sacarosa al 20%) preenfriado en baño de agua con hielo. Las células resuspendidas se incubaron durante 60 minutos. Posteriormente, se agregaron 90 ml de agua desionizada preenfriada y las células se incubaron durante la noche con agitación suave. Ambas incubaciones se llevaron a cabo en un baño de agua con hielo en una plataforma rotatoria. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se inyectó en una columna de Ni²⁺-NTA-agarosa equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8. Luego de la siembra en la matriz, se realizó un primer lavado con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y un segundo lavado con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM. La elución se realizó

con Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, pH 8. Se recogieron fracciones de 3-4 mL y se analizaron mediante SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó un paso de diáisisis (4°C, en Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8). La pureza de la proteína se evaluó en SDS-PAGE. El NB 2A9 purificado se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración se determinó espectroscópicamente usando un coeficiente de absorción $\epsilon_{280\text{nm}} = 30035 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11].

Las CDRs se identificaron según los criterios de Truong et al. (2022) [68], combinando análisis de secuencia y estructuras 3D para su delimitación precisa.

Secuencia de aminoácidos de NB 2A9:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRGIFRNSAMAWFR
QAPGKEREVFVSTDGTFYADSVKGRFTVSRDNAENTVYLQMVLKPEDTAVYYCARRI
PWRTSTLSDLSSYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHH

3. Dicroísmo circular

Las mediciones de dicroísmo circular (CD) se realizaron con un espectropolarímetro Jasco J-810. Se recogieron espectros de CD en el UV lejano utilizando una celda con longitud de camino de 0.1 cm. Los datos se adquirieron a una velocidad de escaneo de 20 nm por minuto y se promediaron al menos cinco barridos. La concentración proteica analizada fue de 3 μM y se utilizó como buffer para los desplegados térmicos fosfato de sodio 50 mM, DTT 0.2 mM, pH 7.5.

El desplegado inducido por temperatura fue monitoreado por la señal de dicroísmo circular a 222 nm utilizando un ancho de banda de 2 nm. La temperatura varió de 20°C a 95°C, a una tasa constante de 1°C por minuto, muestreando a intervalos de 1°C y se utilizó una longitud de camino de celda de 1 cm. Luego de realizar la curva de desplegado, el sistema se enfrió a 20°C y se midió la señal a 222 nm alcanzada con el fin de evaluar la reversibilidad del proceso de desplegado, comparando la señal obtenida con la señal inicial.

El análisis de las curvas de desplegado inducido por temperatura se acotó únicamente a la evaluación de las temperaturas de desnaturización medias (T_m), ya que para estos sistemas experimentales, en las condiciones estudiadas, la reversibilidad no fue en ningún caso del 100%. Por lo tanto, se infirió que el sistema no se halló en equilibrio y quedó descartado el cálculo por ajuste no lineal de las fracciones de moléculas en estado nativo y desplegado, las constantes de equilibrio K_{NU} , las diferencias de entalpía y entropía, y la diferencia de energía libre que permitiría evaluar el cambio en estabilidad conformacional y la espontaneidad de los procesos. De cualquier forma, para la determinación de las T_m

aparentes se realizó un ajuste a dos estados (N y U) para la curva de desplegado. Asimismo, a fin de estimar la Tm aparente de forma aproximada, se definieron dos regiones lineales (pre- y post-transición) mediante ajustes manuales en el tramo inicial y final de la curva. Posteriormente, se identificó el punto medio de la transición entre ambas líneas. De este modo, la Tm aparente se asumió en la intersección o en el punto donde la elipticidad alcanza la mitad de la variación total entre el estado nativo y el estado desnaturalizado. En el presente trabajo, se empleará la terminología Tm; sin embargo, es importante destacar que dicho valor no necesariamente corresponde a la temperatura en la cual el 50% de las moléculas se encuentran en su estado nativo y el otro 50% en estado desplegado. Esta discrepancia se debe a que el sistema analizado no se encuentra en equilibrio, lo que impide una determinación precisa de dichas fracciones. Además, los valores de Tm pueden estar influenciados por otras variables, como la concentración de la proteína, dado que esta última puede afectar la propensión a la agregación, lo que a su vez podría modificar el valor de Tm observado.

4. Ensayo de actividad desulfurasa

Para estudiar efectos en la modulación de la función de ISCU2, se analizó la actividad de la cisteína desulfurasa del supercomplejo (NFS1), en presencia o ausencia de nanoanticuerpo. Para la desulfuración enzimática de L-Cys a L-Ala y sulfuro por el supercomplejo (NFS1/ACP-ISD11/ISCU2/FXN)₂, las concentraciones de proteínas, sustrato y el agente reductor DTT se establecieron de acuerdo con publicaciones previas de nuestro grupo [59]. Las reacciones contuvieron NFS1/ACP-ISD11 1 μM, ISCU2 1 μM, FXN 3 μM y NB 2A9 1 μM, y las muestras se complementaron con PLP 10 μM, DTT 2 mM y FeSO₄ 1 μM. El buffer de reacción fue Tris-HCl 50 mM y NaCl 200 mM, pH 8. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del sustrato L-Cisteína y Fe (II) a concentraciones finales de 1 mM y 1 μM respectivamente. Las muestras se incubaron a 25°C por 30 min. La producción de persulfuro se detuvo mediante el agregado de 50 uL de N, N-dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en 7.2 N HCl y 50 uL de FeCl₃ 30 mM en 1.2 N HCl. Se siguió el producto de reacción H₂S por la técnica de azul de metíleno [60]. Se dejó formar el azul de metíleno durante 20 minutos en oscuridad, y las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 13000 rpm para medir la absorbancia del sobrenadante a 670 nm en un espectrofotómetro UV. Como control negativo, se incluyó una condición donde no se añadieron las proteínas del supercomplejo (NFS1/ACP-ISD11/ISCU2/FXN)₂, pero se mantuvieron todos los demás reactivos y condiciones necesarias para la reacción. La absorbancia obtenida para esta condición se restó a todas las demás condiciones experimentales. Se realizaron tres ensayos independientes y cada ensayo se realizó por triplicado.

5. Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC) utilizando una columna Superose-6 (GE Healthcare). La concentración de proteína sembrada fue de 6 μ M. Se inyectó un volumen de 100 μ L y se usó un buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM a pH 7.4. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente (\sim 25 °C) a un flujo de 0.4 mL/min. Se utilizó un instrumento JASCO HPLC. El equipo cuenta con un inyector automático, una bomba cuaternaria y un UV-VIS UV-2075 (se monitorea la elución a 280 nm).

6. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

Para realizar el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), el nanoanticuerpo NB 2A9 (1 μ M) fue fijado en una placa multiwell MaxiSorp de NUNC, mediante una hora de incubación a temperatura ambiente con agitación. Los pocillos fueron bloqueados usando leche 3% y posteriormente incubados con distintas concentraciones de ISCU2 (0, 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M), por una hora a temperatura ambiente con agitación. Los lavados fueron realizados con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0.05% Tween 20, pH 7.5. Luego, se realizó una hora de incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-ISCU2 de ratón (OriGene XA3470833, <https://cdn.origene.com/datasheet/ta803397.pdf>). Finalmente, la detección de ISCU2 se llevó a cabo por una hora de incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado a la enzima peroxidasa (Invitrogen ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Goat-anti-Mouse-IgG-H-L-Secondary-Antibody-Polyclonal/31430>). La proteína unida fue revelada por medio de mediciones de actividad peroxidasa utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato cromogénico, el cual es oxidado por la peroxidasa para generar un producto coloreado. La reacción fue detenida por la adición de ácido sulfúrico 0.4 N. El producto de la reacción, de color amarillo, fue cuantificado por el incremento en absorbancia a 450 nm usando un lector de placas Sunrise de TECAN. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de proteína ISCU2 unida al NB 2A9. El ensayo se realizó por duplicado. Utilizamos como control negativo un pocillo sin NB 2A9 fijado, pero incubado con ISCU2 1 μ M.

7. Biotinilación de ISCU2

La proteína ISCU2 fue previamente concentrada utilizando un filtro centrífugo (Amicon® Ultra-4 10K Centrifugal Filter Device) hasta un valor de 19 μ M, en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Para esto, se cargaron 3 mL de muestra en el dispositivo de filtro, se centrifugó 20 minutos a 4000 \times g y se recuperó la muestra concentrada con una pipeta.

Se marcó a ISCU2 con una sonda biotina-maleimida, utilizando el reactivo Biotin-PEG4-NHS Ester (Gold Biotechnology, Producto No.: B-720). Se disolvió el reactivo en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/mL. Se incubaron 3 µL del reactivo Biotin-PEG4-NHS Éster con la muestra de ISCU2 concentrada. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Finalizada la incubación, se procedió a eliminar la sonda no reaccionada mediante lavados con columnas G-25. Para este propósito, se depositaron 150 µL de la muestra en la columna G-25 previamente equilibrada con buffer fosfato de sodio 100 mM, y la elución se llevó a cabo mediante centrifugación a 800 g durante 2 minutos. La proteína biotinilada se almacenó hasta su uso a –70 °C.

8. Interferometría de Biocapas

Las afinidades y cinéticas de unión del NB 2A9 a ISCU2 se evaluaron mediante interferometría de biocapas (BLI) utilizando un sistema BLItz (Sartorius AG, Göttingen, Alemania). Se utilizaron los sensores Octet® Streptavidin (SA) recubiertos con estreptavidina. Los mismos se hidrataron en buffer TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) y se suplementaron con 0.5 mg/mL de BSA (TBS-BSA) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó la unión de ISCU2-biotina a la superficie del sensor de estreptavidina realizando el siguiente protocolo:

1. Línea de base: 200 segundos, 250 µL TBS-BSA.
2. Unión de ISCU2-biotina 0.31 mg/mL en buffer TBS-BSA: 400 segundos, 4 µL.
3. Lavado: 1200 segundos, 250 µL TBS-BSA.

Las soluciones de NB 2A9 para el análisis cinético se prepararon diluyendo una muestra en TBS-BSA, hasta obtener volúmenes finales de 0, 25, 50, 100 y 200 nM. Luego, se asociaron 4 µL de NB 2A9 con el sensor equilibrado con ISCU2 inmovilizada, seguido de una disociación en TBS-BSA. El protocolo de asociación-disociación se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Línea de base: 200 segundos, 250 µL TBS-BSA.
2. Asociación: 400 segundos, 4 µL NB 2A9.
3. Disociación: 400 segundos, 250 µL TBS-BSA.

El grado de unión del NB 2A9 se representó como un desplazamiento en la longitud de onda (nm) entre las señales de unión y referencia en el biosensor. Las constantes cinéticas fueron calculadas usando BLItz Pro, ajustando los datos de asociación y disociación a un modelo

1:1. La constante de disociación de equilibrio (K_D) fue calculada como el cociente entre los coeficientes cinéticos de disociación y asociación (k_d/k_a). En nuestro caso, no se pudo regenerar el sensor luego de cada ensayo, por lo cual, se utilizó un sensor nuevo para cada medida.

Durante la fase de asociación, el analito se une al ligando inmovilizado en el sensor. La adición de masa debido a la unión del analito al ligando, afecta la trayectoria óptica de la luz reflejada desde la superficie externa. Esto provoca un desplazamiento en el patrón de interferencia, que se traduce en una señal medible en unidades de desplazamiento, típicamente en nanómetros (nm). Luego, ocurre la fase de disociación, donde el complejo formado entre el analito y el ligando comienza a separarse, liberando al analito de la superficie del sensor. Esto reduce la masa en la biocapa y, por lo tanto, disminuye el índice de refracción, lo que se refleja en una disminución del desplazamiento óptico. Cuanto menor el valor de la K_D obtenida, mayor la afinidad entre el ligando y el analito.

9. Análisis estadístico

Para analizar los resultados del ensayo de actividad desulfurasa, se utilizó un modelo lineal general mixto, con el día del experimento como variable de efectos aleatorios. El supuesto de normalidad de los errores se estudió mediante una prueba de Shapiro Wilks y gráficamente mediante un QQplot, y la homocedasticidad se estudió mediante una prueba de Levene y gráficamente mediante un gráfico de dispersión de residuos vs. predichos. Las comparaciones entre tratamientos se efectuaron utilizando el método de Tukey. Los intervalos de confianza y las comparaciones de Tukey se realizaron con la función `emmeans()` del paquete “`emmeans`” [61]. El análisis se efectuó con R (*R core team*).

Resultados

1. **Predicciones de las estructuras de los complejos ISCU2:NB y elección del nanoanticuerpo a estudiar.**
 - 1.1. **Predicciones de la interacción entre cada uno de los nanoanticuerpos e ISCU2 utilizando AlphaFold 2.**

Los NBs habían sido seleccionados previamente en el laboratorio, pero sus propiedades aún no habían sido estudiadas. Inicialmente, se realizaron predicciones mediante AlphaFold 2 [62]

del sitio de interacción entre ISCU2 y cada uno de los tres nanoanticuerpos seleccionados (**Figura 11**). El análisis sugirió que la interacción de los nanoanticuerpos 8B11 y 45H5 con ISCU2 podría generar un impedimento estérico que dificultase la unión de ISCU2 al resto de las subunidades del supercomplejo ISC (**Figura 11 B,C**). En contraste, la interacción de ISCU2 con el nanoanticuerpo 2A9 no pareció interferir significativamente con la formación del supercomplejo (**Figura 11 A**).

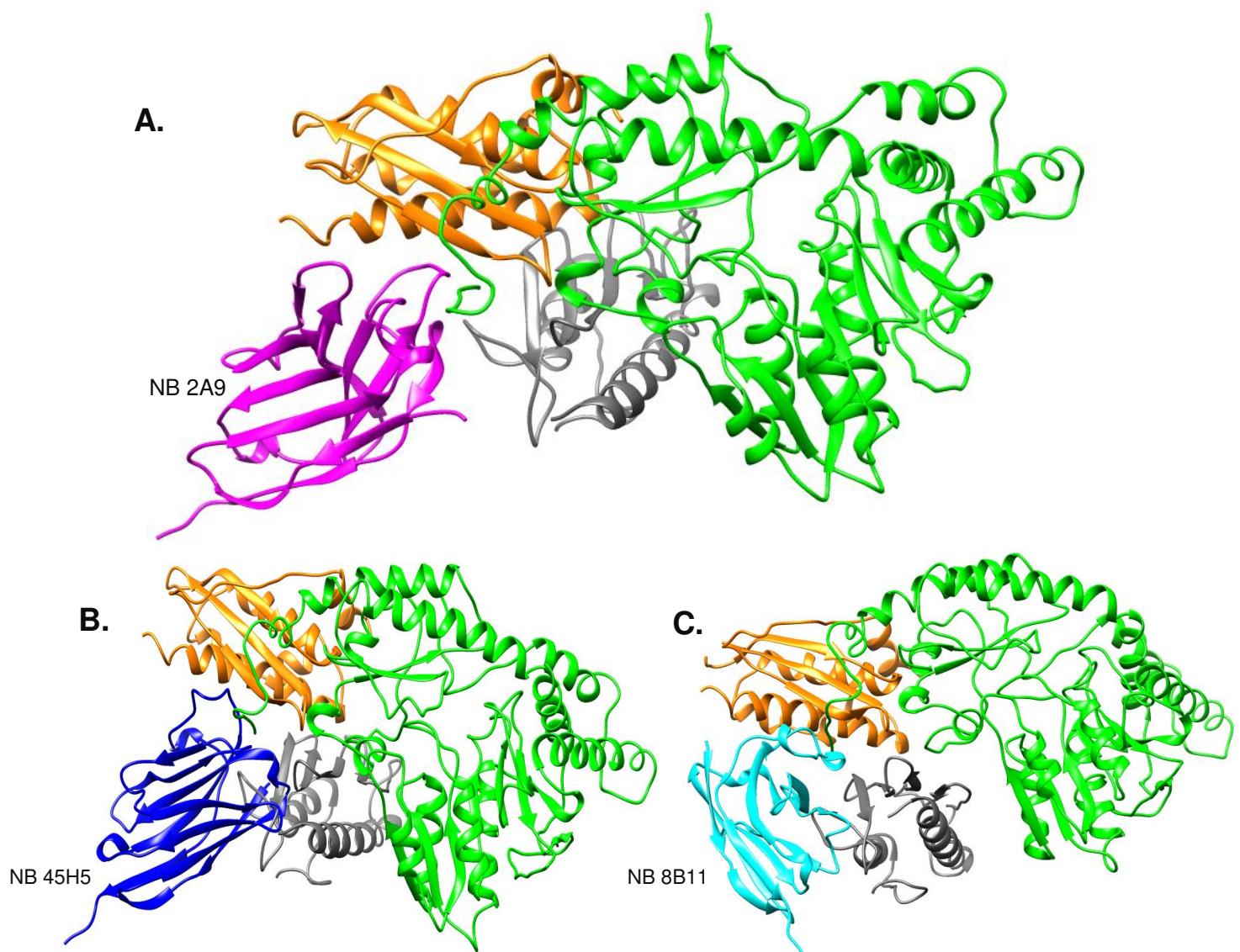


Figura 11. Predicciones estructurales de AlphaFold 2 para la interacción de cada uno de los tres nanoanticuerpos seleccionados con ISCU2, en el contexto del supercomplejo mitocondrial ISC. Se muestra en magenta al NB 2A9 (A), en azul al NB 45H5 (B) y en celeste al NB 8B11 (C). ISCU2 se presenta en naranja. Se observan las interacciones potenciales de NB:ISCU2 con NFS1 (en verde) y FXN (en gris). El nanoanticuerpo 2A9 parece ser el que menos interfiere en la interacción entre ISCU2, NFS1 y FXN, sugiriendo un menor impacto en la formación del supercomplejo funcional.

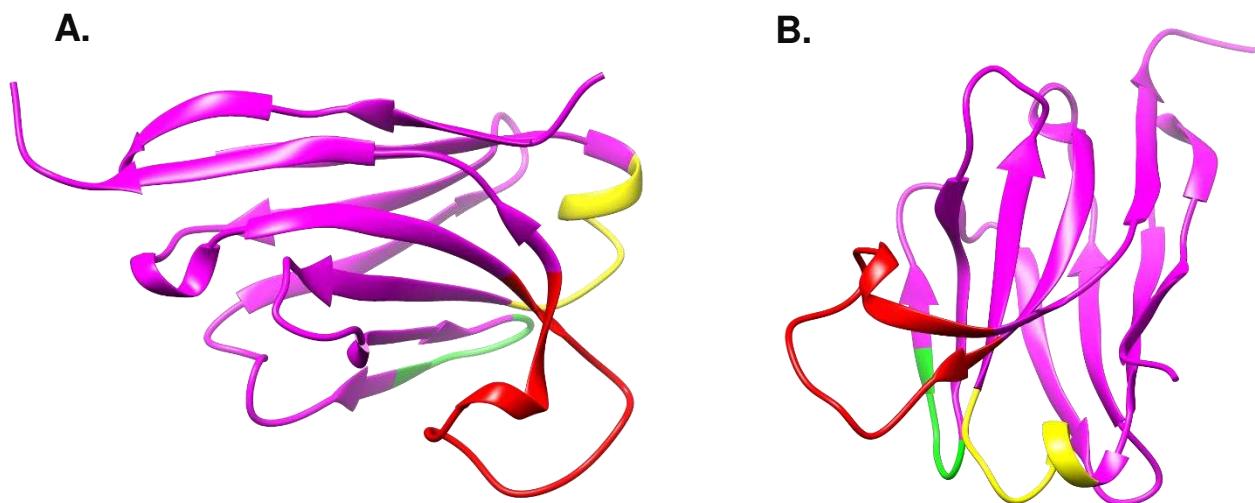
En consecuencia, se decidió continuar con el estudio de la modulación de ISCU2 utilizando el nanoanticuerpo 2A9, que, según las predicciones realizadas mediante AlphaFold 2, se consideró inicialmente como el candidato con menor efecto negativo sobre la formación del supercomplejo.

1.2. Propiedades y características estructurales del NB 2A9.

Una vez elegido el NB, se procedió a determinar a partir de su secuencia de aminoácidos, las propiedades necesarias para los análisis experimentales. El nanoanticuerpo seleccionado, NB 2A9, tiene una masa molecular de 16020.67 Da y un punto isoeléctrico teórico de 7.18 [10, 11]. Su coeficiente de absorbividad molar es de $30035\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [11], lo que permite determinar su concentración en solución mediante espectrofotometría.

Se realizó una predicción de su estructura utilizando AlphaFold 2 (**Figura 12 A,B**). Esta predicción presenta una estructura del nanoanticuerpo formada principalmente por hojas beta antiparalelas. Estas hojas beta están conectadas por *loops* flexibles, destacando el CDR3, generalmente más largo y responsable principal del reconocimiento del antígeno.

Asimismo, se analizó el complejo ISCU2:NB_2A9 mediante AlphaFold 2 (**Figura 12 C**). Se observa la interacción entre la proteína ISCU2 (en naranja) y el nanoanticuerpo 2A9 (en magenta). Según la predicción, los CDRs del NB 2A9 son clave para el reconocimiento de ISCU2; la proximidad entre los CDRs y la superficie de ISCU2 sugiere que el nanoanticuerpo 2A9 se une específicamente a esta proteína a través de estas regiones.



C.

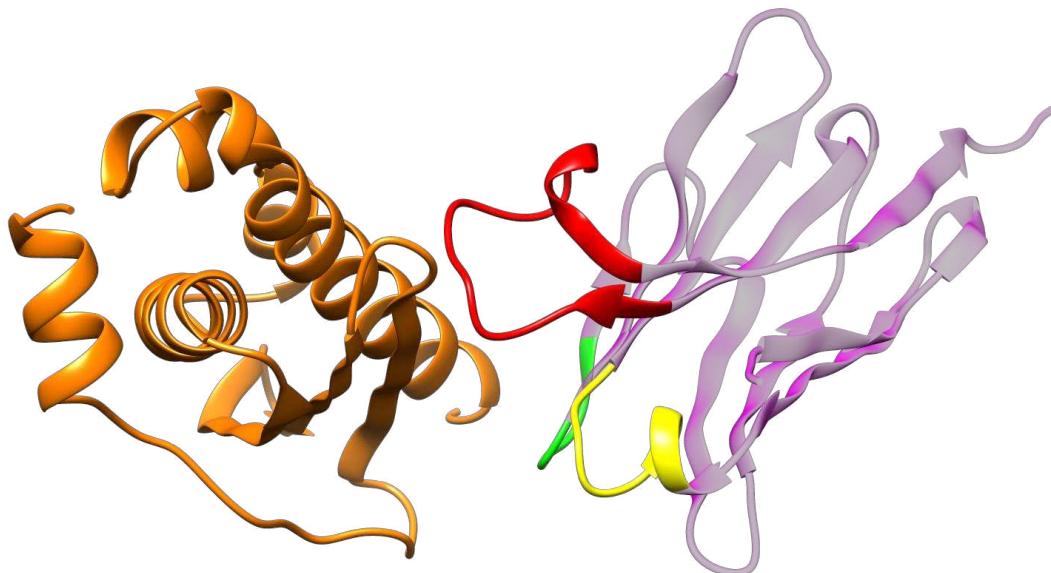


Figura 12. Estructura terciaria del NB 2A9 y su interacción con ISCU2. (A, B) Se presentan dos vistas de la estructura terciaria del NB 2A9 predicha mediante AlphaFold 2. Se destaca la CDR1 en amarillo, la CDR2 en verde y la CDR3 en rojo. (C) Modelo del complejo ISCU2:NB_2A9 predicho por AlphaFold 2, donde ISCU2 se muestra en naranja y el NB 2A9 en rosa. Las CDRs del NB 2A9 (CDR1 en amarillo, CDR2 en verde, y CDR3 en rojo) están marcadas, indicando su proximidad a las regiones de interacción con ISCU2.

2. Biofísica de la interacción del complejo ISCU2:NB_2A9.

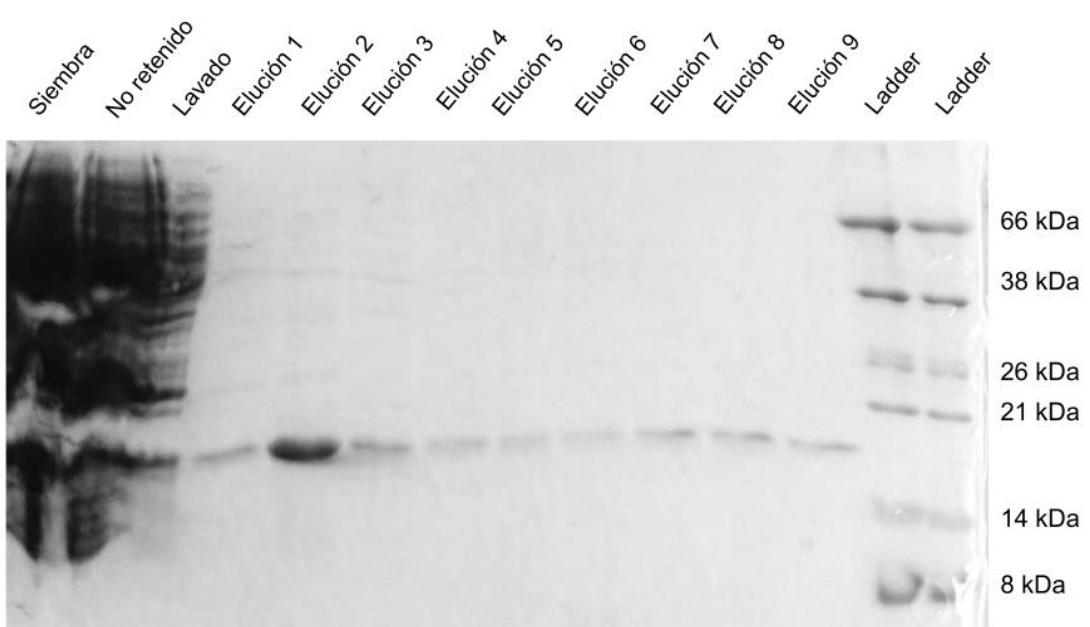
2.1. Producción de ISCU2, NB 2A9 y NIA.

Tal como se menciona en Materiales y Métodos, las purificaciones de ISCU2, del NB 2A9 y del complejo NIA, se realizaron mediante IMAC haciendo uso de *tags* de histidinas. A juzgar por el análisis de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), todas las proteínas se obtuvieron con grados de pureza aceptables para poder llevar adelante las caracterizaciones posteriores.

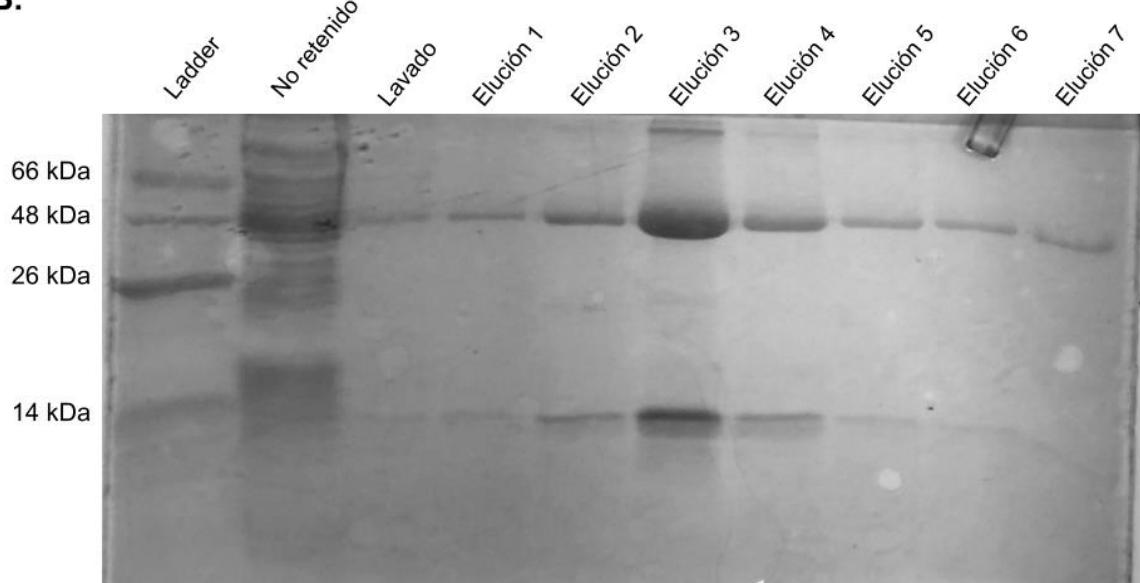
Se presentan en la **Figura 13** los geles de SDS-PAGE para las purificaciones de las tres proteínas. Se observa en la **Figura 13 (panel A)**, la banda característica de ISCU2, de aproximadamente 16 kDa, entre las bandas correspondientes a 21 kDa y 14 kDa de los marcadores de masa molecular (*ladder*). En el **panel B**, se observan las bandas características de NIA: una banda correspondiente a NFS1 con una masa molecular de 48 kDa (mayormente notable en la elución 3), y otra banda correspondiente a ISD11 (12.4 kDa) y ACP (8.6 kDa). La banda de ACP no es fácilmente distinguible en el gel dado su pequeño tamaño y a la baja eficiencia de su tinción. Por último, en el **panel C**, se observa la banda

característica del NB 2A9, con un peso de aproximadamente 16 kDa, entre las bandas de 21 kDa y 14 kDa del *ladder*.

A.



B.



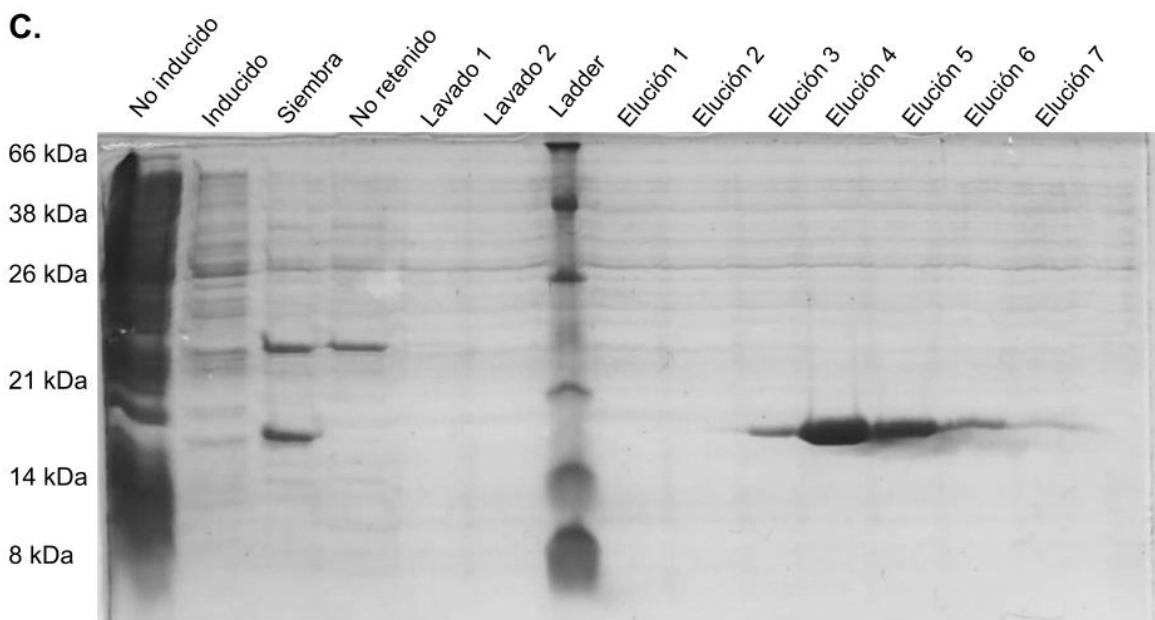


Figura 13. Purificación de proteínas recombinantes. (A) Purificación de ISCU2. (B) Purificación de NIA. (C) Purificación de NB 2A9. No inducido corresponde a una alícuota del cultivo antes de inducir: se observa que no aparece la banda característica del NB 2A9 en esta calle. Inducido corresponde a una alícuota del cultivo tratada con IPTG, en la cual se observa la aparición de la banda correspondiente al NB. Para los tres geles, *ladder* corresponde al marcador de peso molecular de referencia. Siembra corresponde a una muestra de las fracciones solubles (A) o del periplasma (C) antes de sembrar en la matriz Ni²⁺-NTA-agarosa. No retenido corresponde a la fracción no retenida en la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa luego de la siembra. Los lavados corresponden a fracciones no retenidas por la columna luego de lavar con concentraciones mayores de imidazol. Se muestran, además, las calles correspondientes una muestra de cada fracción recolectada de 3-4 mL (Elución).

Una vez purificadas las proteínas, se evaluó la absorción después de una diálisis exhaustiva para remover el imidazol remanente de la etapa de elución. Los espectros en la región de 240-340 nm (UV cercano, **Figura 14**) permiten evaluar la concentración mediante el uso del coeficiente de absorbividad molar, que depende del contenido de residuos aromáticos y de puentes disulfuro.

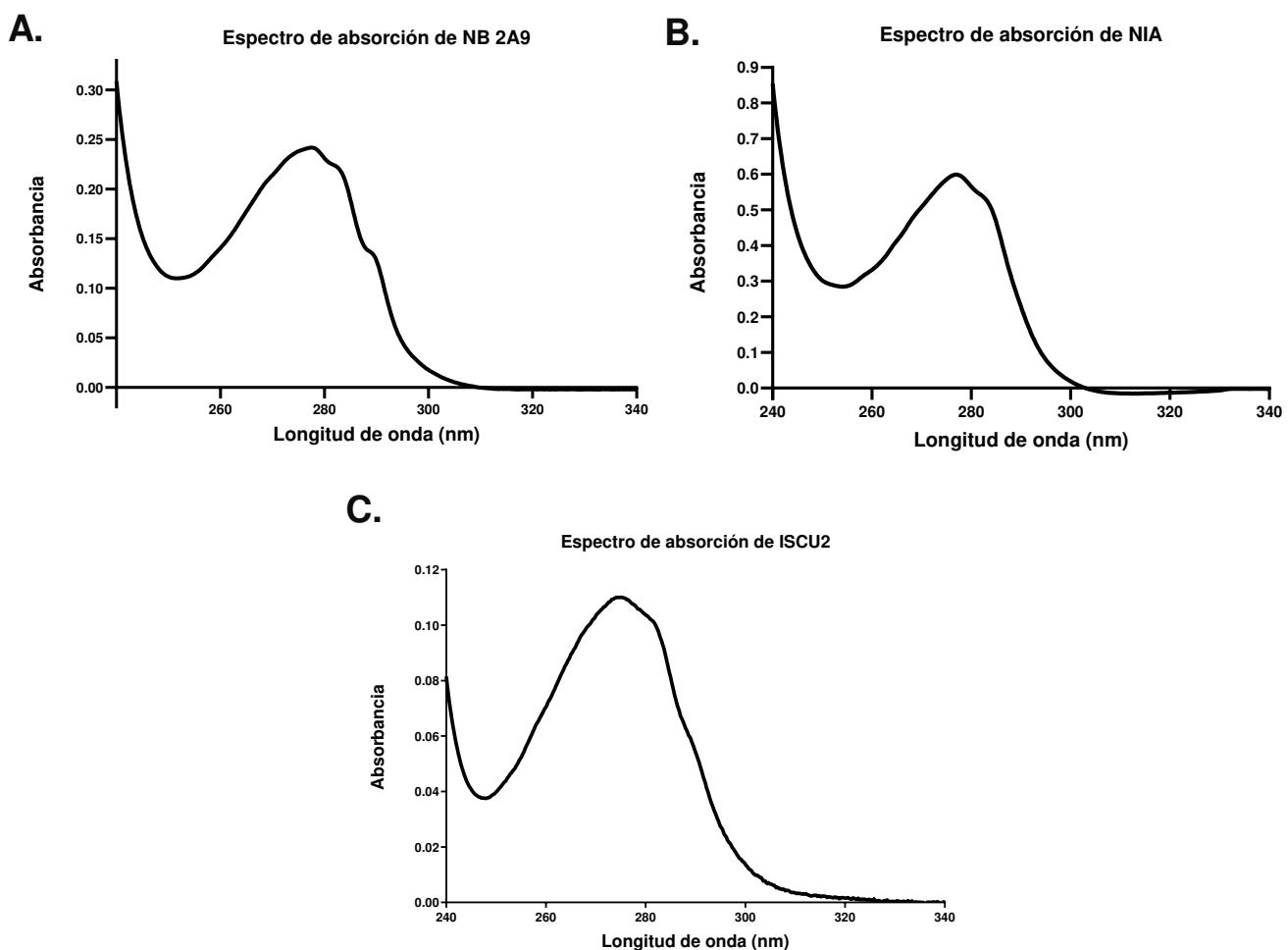


Figura 14. Espectros de absorción de las proteínas purificadas obtenidas en espectrofotómetro UV.

(A) Espectro de NB 2A9. (B) Espectro de NIA. (C) Espectro de ISCU2. A cada espectro de absorción se lo corrigió mediante la resta del espectro de su blanco específico, correspondiente al buffer de diálisis propio de cada proteína. En caso de ser necesario, los espectros se corrigieron por dispersión luminosa.

Los espectros de absorción UV permitieron verificar la ausencia de ADN en las preparaciones de proteínas, ya que la presencia de ADN se observaría como un incremento de las absorbancias a 260 nm. Por su lado, la ausencia de pendientes significativas en la región 340-320 nm permitió descartar la presencia de agregados proteicos de gran masa molecular que producirían dispersión luminosa y, por lo tanto, una disminución de la luz que incide en el detector del espectrofotómetro. Finalmente, se calcularon las concentraciones obtenidas de las proteínas utilizando la ecuación de Lambert-Beer. Las concentraciones fueron:

ISCU2: 10.25 μM

NB 2A9: 7.99 μM

NIA: 11.16 μ M

Considerando una longitud de 1 cm para la cubeta utilizada, se dividió la absorbancia obtenida a 280 nm por el coeficiente de absorbividad molar específico de cada proteína. La medida de absorbancia se realizó a 280 nm ya que es la longitud de onda en la que la proteína tiene máxima absorción, debido a los aminoácidos aromáticos.

2.2. Validación de la interacción del complejo ISCU2:NB_2A9.

2.2.1. Cromatografía de exclusión molecular.

Se evaluó la interacción entre el NB 2A9 e ISCU2 mediante una chromatografía de exclusión molecular (SEC-FPLC) utilizando una columna Superose-6 (GE Healthcare). La concentración de proteína sembrada fue de 6 μ M y la elución se monitoreó a 280 nm.

Se obtuvieron los perfiles de elución específicos para cada proteína (**Figura 15A**, línea naranja correspondiente a la elución de ISCU2 y línea azul correspondiente a la elución de NB 2A9). Se observó que ISCU2 eluye aproximadamente a los 37 minutos, mientras que el NB 2A9 presenta un tiempo de elución ligeramente mayor, alrededor de los 40 minutos. En el caso de proteínas globulares correctamente plegadas y considerando que ISCU2 y el NB 2A9 poseen masas moleculares similares (16.3 kDa y 16 kDa, respectivamente), la diferencia observada en los tiempos de elución resulta mayor a lo esperado. Esta discrepancia podría explicarse por la posible elución de ISCU2 en forma dimérica, lo que ocasionaría un tiempo de elución menor. Sin embargo, al comparar con la curva de estándares de peso molecular (**Figura 15B**), se observa que ISCU2 presenta un tiempo de elución ligeramente mayor que el de la mioglobina (17 kDa), lo que sugiere que eluye en forma monomérica. Otra posible explicación sería una interacción del NB 2A9 con la matriz de la columna chromatográfica, lo cual podría generar un retraso en su elución. No obstante, esta hipótesis parece poco probable, dado que el NB 2A9 posee un punto isoeléctrico de 7.18, y al pH de la corrida chromatográfica (7.4), se encontraría cargado negativamente.

Adicionalmente, se generó la curva de elución del complejo ISCU2:NB_2A9 (**Figura 15A**, línea roja), sembrando una mezcla de 6 μ M de cada proteína. En esta curva, se observó un cambio en el tiempo de elución, ya que la curva de elución se desplaza hacia un tiempo de elución menor. Este desplazamiento sugiere que las proteínas han formado un complejo de mayor tamaño. Además, se presenta el patrón obtenido al sumar las curvas individuales del NB 2A9 e ISCU2 (**Figura 15A**, línea verde). La diferencia entre esta y la curva roja sugiere

que las proteínas interactúan, ya que el complejo tiene un comportamiento distinto al esperado si no existiera interacción.

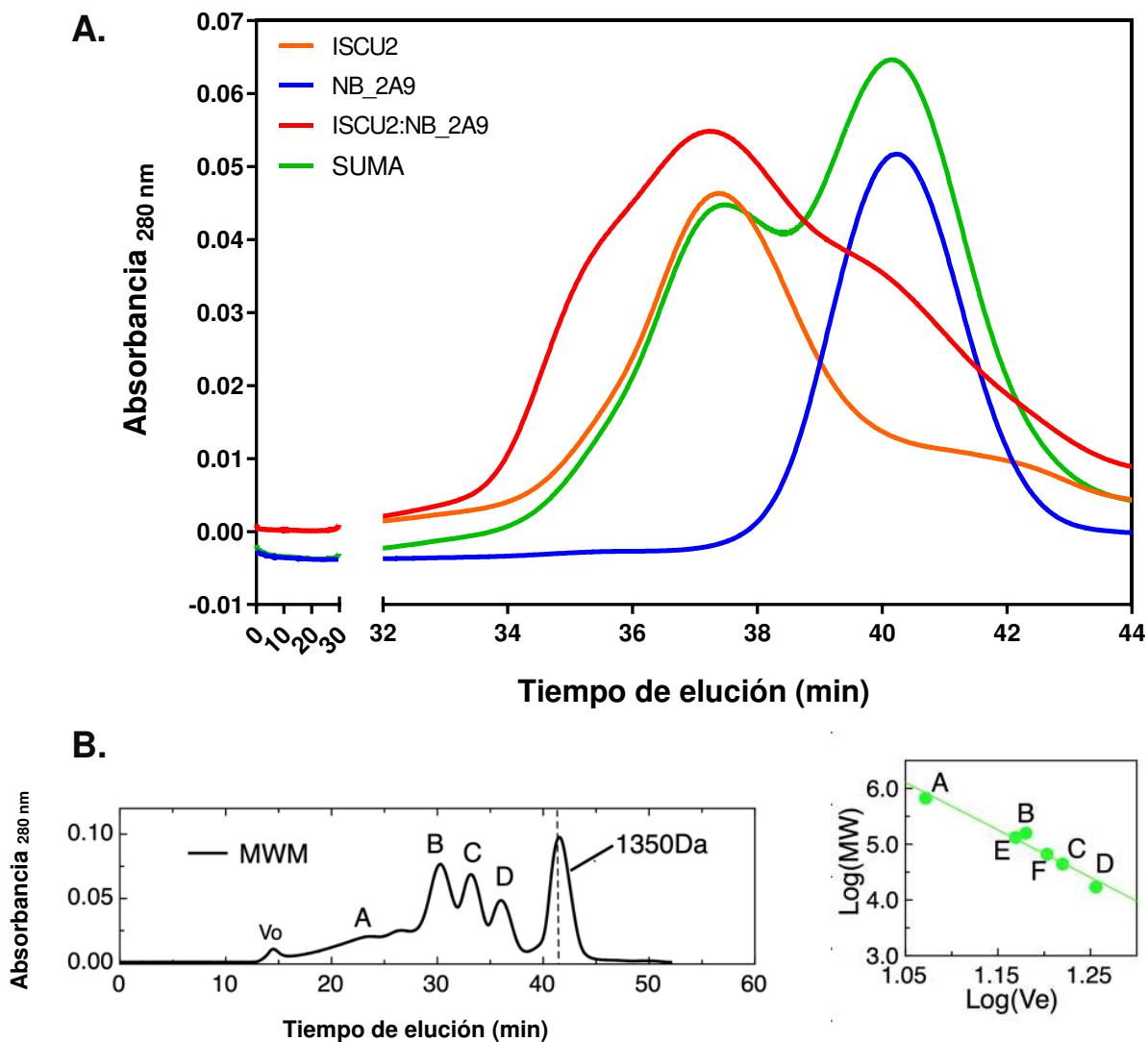


Figura 15. Validación de la interacción del complejo ISCU2:NB_2A9 mediante SEC-FPLC. (A) Se grafica la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en función del tiempo de elución en minutos. Se muestra la curva naranja correspondiente al perfil de elución de ISCU2, la curva azul correspondiente al NB 2A9, la curva roja correspondiente al complejo ISCU2:NB_2A9, y la curva verde correspondiente a la suma algebraica de las curvas de ISCU2 y de NB 2A9. Se observa que la curva roja no se superpone con la curva verde. (B) La calibración de la columna se realizó con proteínas de diferentes pesos moleculares: Tiroglobulina (A, 670 kDa), Gamma-globulina (B, 158 kDa), Ovalbumina (C, 44 kDa), Mioglobina (D, 17 kDa). Se añadieron BSA dimérica (E, 132 kDa) y BSA monomérica (F, 66 kDa) a la curva de calibración.

2.2.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.

Con el objetivo de profundizar la unión *in vitro* de ISCU2 al NB 2A9, se estudió la interacción del complejo NB_2A9:ISCU2 mediante un ensayo de ELISA. Para ello, se inmovilizó al NB 2A9 en una placa. Posteriormente, tras realizar el bloqueo para evitar uniones inespecíficas, se incubó la placa con diferentes concentraciones de ISCU2 (0, 50 nM, 250 nM, 500 nM y 1 μ M) y se realizó la detección de ISCU2 con anticuerpos específicos. Con este protocolo, la absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de proteína ISCU2 unida al NB 2A9.

Como control negativo, se incluyó un pocillo en el que no se fijó NB 2A9, pero que fue incubado con 1 μ M de ISCU2 y con los anticuerpos mencionados, para evaluar posibles señales inespecíficas.

Como hipótesis del ensayo se propuso que, si ISCU2 se une efectivamente al NB 2A9 inmovilizado en la placa *multiwell*, un incremento en la concentración de ISCU2 disponible debería resultar en un aumento proporcional en la unión de los anticuerpos. Esto, a su vez, generaría una mayor actividad de la peroxidasa y, consecuentemente, un incremento en la cantidad de producto de reacción, reflejado en un aumento de la absorbancia a 450 nm.

En el pocillo utilizado como control negativo, se esperó obtener valores de absorbancia similares a los observados en los pocillos correspondientes a la concentración de ISCU2 de 0 nM. Esto se debe a que, en ausencia de NB 2A9 inmovilizado, ISCU2 no debería quedar retenido en la placa tras los lavados. Como resultado, los anticuerpos tampoco se unirían, y no se llevaría a cabo la reacción enzimática catalizada por la peroxidasa.

En la **Figura 16**, se presenta la curva que relaciona la absorbancia medida a 450 nm con las distintas concentraciones de ISCU2 evaluadas. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis planteada en el ensayo, ya que se observa una tendencia creciente en la curva: a mayores concentraciones de ISCU2, se registraron valores más altos de absorbancia. Esto sugiere una mayor interacción y formación del complejo NB_2A9:ISCU2, reflejando un aumento en la cantidad de ISCU2 unida al NB 2A9 inmovilizado en la placa.

Además, el punto rojo en la **Figura 16** corresponde al control negativo, donde no se inmovilizó NB 2A9 en la placa. En esta condición, ISCU2 no quedó retenida tras los lavados, lo que resultó en valores de absorbancia bajos, como era esperado, al no generarse una señal asociada a la reacción enzimática. Es fundamental, sin embargo, resaltar que son necesarias más réplicas de este control, ya que no tiene duplicado, para asegurar la validez y la reproducibilidad de los resultados.

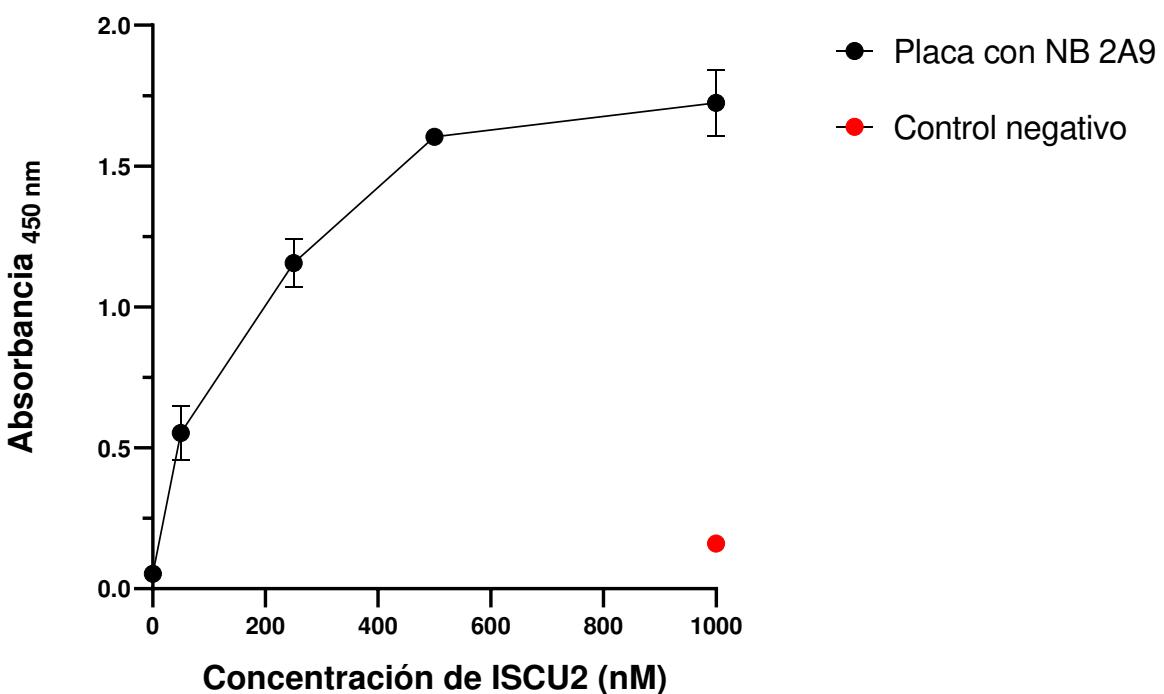


Figura 16. Interacción entre ISCU2 y el NB 2A9 evaluada por ELISA. El ensayo se realizó para diferentes concentraciones de ISCU2, entre 0 y 1000 nM. El punto rojo corresponde a un control negativo (sin NB 2A9 en placa). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM de replicados ($n=2$).

2.2.3. Dicroísmo circular.

Se evaluó el estado conformacional del NB 2A9 y de ISCU2, así como la interacción entre ambos, mediante la técnica de dicroísmo circular (DC). Para este análisis, se prepararon tres muestras: la primera contuvo únicamente ISCU2 a una concentración de 3 μ M, la segunda contuvo NB 2A9 también a una concentración de 3 μ M, y la tercera correspondió al complejo ISCU2:NB_2A9 con una concentración final de 3 μ M de cada proteína.

El objetivo de este ensayo fue analizar si la interacción entre ISCU2 y el nanoanticuerpo genera una reorganización de la estructura secundaria al formarse el complejo. Con la técnica de DC es posible estudiar esto, ya que permite medir la diferencia en la absorción de luz polarizada circularmente (izquierda vs. derecha) por enlaces peptídicos y otras estructuras ópticamente activas. Los resultados, en este caso, se expresan como elipticidad medida en miligrados, que es el valor de la elipticidad medida en un espectropolarímetro. La elipticidad refleja la diferencia en la absorción de luz polarizada circularmente entre las ondas de luz derecha e izquierda cuando atraviesan una muestra. Esta diferencia surge debido a las características estructurales de las proteínas [64].

Las señales en la región del espectro ultravioleta lejano (180–250 nm) están relacionadas principalmente con la estructura secundaria de las proteínas: α -hélices presentan un máximo a 185-195 nm y dos mínimos característicos alrededor de 208 nm y 222 nm. Las láminas β presentan un máximo a 190-200 nm y un mínimo a 216 nm, y estructuras desordenadas tienen señales características diferentes [65]. Cuando dos proteínas interactúan, sus estructuras secundarias pueden cambiar, lo que genera un espectro de DC que difiere de la suma algebraica de los espectros individuales.

Se observan en la **Figura 17** los espectros de DC en el UV-lejano, correspondientes a ISCU2, al nanoanticuerpo 2A9, al complejo ISCU2:NB_2A9 y a la suma algebraica de las curvas de ISCU2 y del NB 2A9. Por un lado, la curva de ISCU2 (**Figura 17**, curva amarilla) presenta un perfil típico de una proteína con un contenido estructural rico en hélices alfa, observado en el mínimo presente a 208 nm. Además, los valores negativos en la región 200-205 nm podrían ser indicativos de la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas. Todas estas características son coincidentes con la estructura secundaria de ISCU2. El espectro de NB 2A9 (**Figura 17**, curva azul) sugiere un contenido estructural distinto, con una mayor proporción de estructuras del tipo lámina β , dada la forma de la curva en comparación con ISCU2, y dado que presenta un mínimo alrededor de 216 nm y un máximo cerca de 200 nm, típicos de proteínas con presencia de hojas beta. Esto coincide tanto con las predicciones de AlphaFold para su estructura, como con la estructura canónica de los dominios VHH.

La interacción entre ISCU2 y el NB 2A9 modifica la señal de DC respecto a las curvas individuales de cada proteína (**Figura 17**, curva roja). Este cambio podría indicar cierta reorganización estructural al formarse el complejo, posiblemente asociada a una estabilización o alteración de la estructura secundaria de ISCU2, del NB 2A9 o de ambas. Además, la señal del complejo no coincide exactamente con la suma algebraica de las señales individuales de ISCU2 y del NB 2A9 (**Figura 17**, curva verde). Sin embargo, dado que la diferencia entre ambas curvas no es tan marcada, es posible que factores experimentales, como pequeñas variaciones en la concentración de proteína, contribuyan a esta discrepancia. Para confirmar si el cambio observado es significativo y no un efecto del error experimental, sería necesario repetir el experimento.

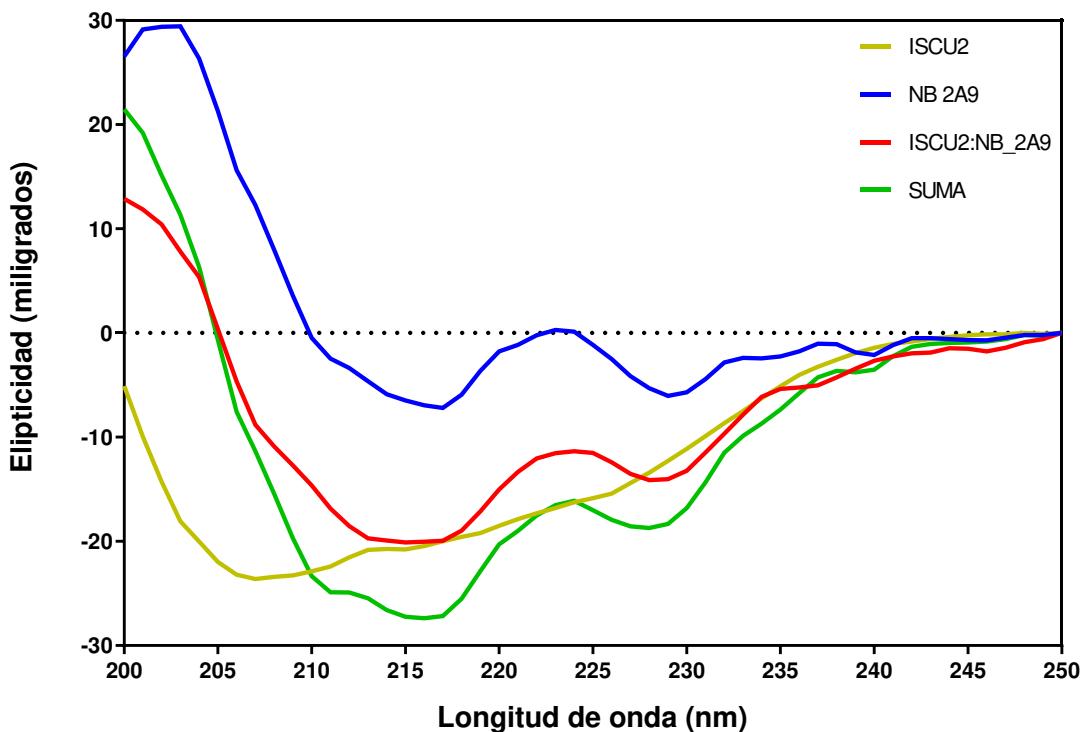


Figura 17. Espectros de dicroísmo circular. Se grafica la elipticidad, en unidades de miligrados, en función de la longitud de onda, en nanómetros. La curva amarilla corresponde a ISCU2, la curva azul corresponde al NB 2A9, la curva roja corresponde al complejo ISCU2:NB_2A9 y la curva verde (SUMA) corresponde a la suma algebraica de las curvas de NB 2A9 e ISCU2 solas. Los valores de elipticidad fueron divididos por la longitud de la cubeta utilizada (0.1 cm) para relativizar las mediciones.

2.2.4. Interferometría de Biocapas.

Para caracterizar mejor el proceso de unión entre el nanoanticuerpo 2A9 e ISCU2, se realizó un experimento de Interferometría de Biocapas (BLI). En este ensayo, la constante de disociación K_D se calcula a partir de la relación entre los coeficientes cinéticos de asociación y disociación del complejo biomolecular (k_a y k_d , respectivamente). El objetivo de este ensayo fue analizar la interacción entre el nanoanticuerpo e ISCU2 utilizando otra metodología, así como también establecer el valor de la constante de disociación del complejo ISCU2:NB_2A9.

Se presentan en la **Figura 18**, las curvas de asociación y de disociación para distintas concentraciones de NB 2A9. Durante la fase de asociación (200-600 segundos), se observa que el grado de unión aumenta a concentraciones más altas de nanoanticuerpo. Las curvas para concentraciones más altas alcanzan una mayor señal que las de concentraciones más

bajas, lo cual es esperado porque hay más moléculas de analito disponibles para unirse al ligando.

Durante la fase de disociación (600-1000 segundos), el sensor se transfiere a una solución sin NB 2A9, permitiendo que el complejo ISCU2:NB_2A9 se disocie. Las curvas muestran una disminución en la señal, lo que refleja la disociación del NB 2A9.

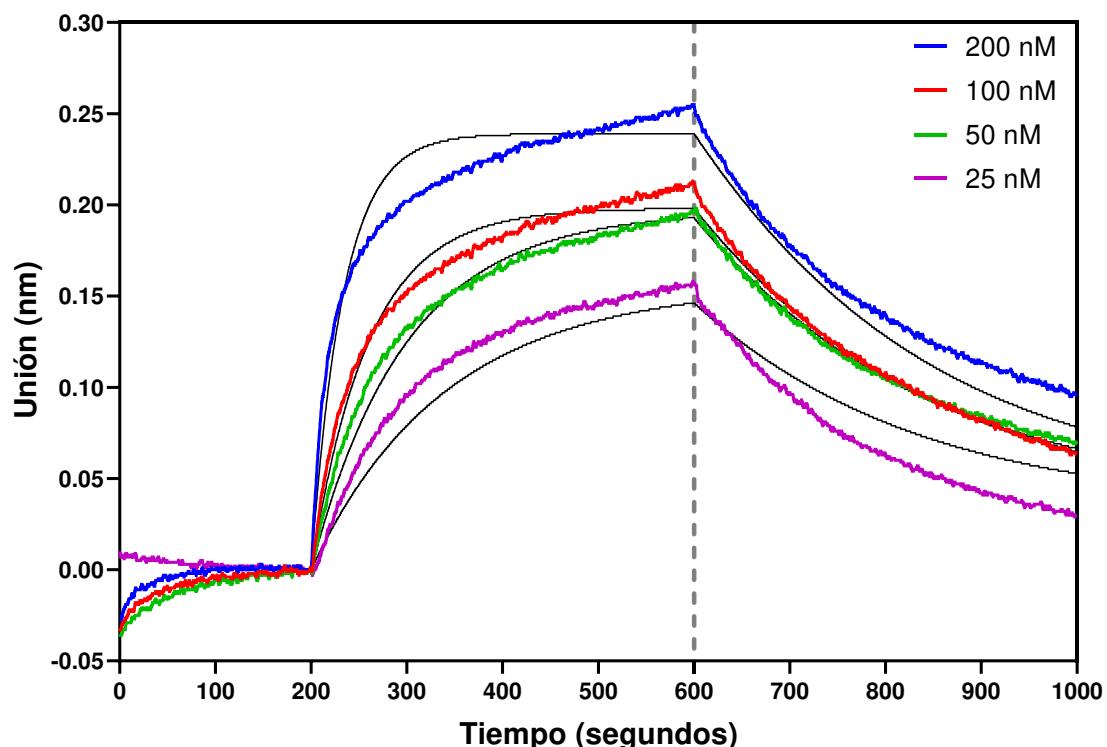


Figura 18. Evaluación de la interacción entre ISCU2 y NB 2A9 mediante BLI. Se inmovilizó la proteína ISCU2 en el sensor, y se añadieron concentraciones crecientes de NB 2A9 (25, 50, 100 y 200 nM) para medir su unión. Las curvas representan la unión específica (nanometros) en función del tiempo (segundos). Los primeros 200 segundos corresponden a la línea de base. La fase de asociación ocurre antes de la línea punteada (200-600 segundos), mientras que la fase de disociación tiene lugar después (600-1000 segundos). Las líneas negras corresponden a los ajustes realizados con un modelo cinético 1:1.

Se calcularon las constantes cinéticas k_a y k_d , y se obtuvo un valor de K_D de $2.443 \times 10^{-8} \text{ M}$ (**Tabla 1**). Estos resultados indican que la interacción entre el NB 2A9 e ISCU2 es estable y presenta una afinidad alta, ya que la K_D se encuentra en el rango nanomolar. La unión del NB a ISCU2 presentó una k_a de $1.336 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, mientras que la disociación presentó una k_d de $3.264 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$. Además, el alto valor de R^2 y el bajo valor de X^2 indican un ajuste aceptable del modelo cinético a los datos experimentales.

Parámetros	Valores
K_D (M)	$(2.443 \pm 0.0361) \times 10^{-8}$
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$(1.336 \pm 0.01629) \times 10^5$
k_d (s^{-1})	$(3.264 \pm 0.02734) \times 10^{-3}$
X^2	0.2195
R^2	0.9664

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la interacción entre ISCU2 y NB_2A9 determinados mediante BLI.

Se muestran el valor de la constantes K_D , k_a y k_d obtenidos a partir del ajuste cinético de los datos experimentales. También se incluye el X^2 , que evalúa la calidad del ajuste, y el coeficiente de determinación R^2 , que refleja la fiabilidad del modelo empleado. Los valores indican una interacción de afinidad alta entre ISCU2 y el NB_2A9, con una K_D en el rango nanomolar.

3. Análisis de la estabilidad del complejo ISCU2:NB_2A9 mediante desplegado por temperatura seguido por dicroísmo circular.

Se llevó a cabo un análisis de la estabilidad estructural de las proteínas y sus cambios conformacionales inducidos por temperatura, utilizando dicroísmo circular. Con esta técnica, se esperaba detectar alteraciones en la estructura secundaria de las proteínas, para obtener información sobre la pérdida de organización estructural en función del aumento de temperatura.

La resistencia al desplegado por temperatura de ISCU2, del NB_2A9 y del complejo NB_2A9:ISCU2 se evaluó monitoreando la señal de CD a 222 nm, que corresponde principalmente a la estructura secundaria en α -hélice. Se analizaron las curvas de las proteínas por separado (**Figura 19**, línea roja y azul) y la curva del complejo NB_2A9:ISCU2 (**Figura 19**, línea verde). Asimismo, se evaluó la reversibilidad del desplegado para cada curva, analizando si la elipticidad retornaba a sus valores iniciales tras llevar la muestra nuevamente a 20 °C (proceso denominado “Retorno a T_0 ”). En la **Figura 19**, esta reversión se representa mediante puntos.

Por un lado, se observó que la curva del NB_2A9 tiene una pendiente pronunciada a partir de aproximadamente 70 °C, con una temperatura de *melting* (T_m) cercana a 75 °C. El retorno a la temperatura inicial de 20 °C (rojo punteado) sugiere que, tras el enfriamiento, el NB_2A9 no

recupera totalmente su estructura secundaria, indicando un desplegado parcialmente irreversible.

Por otra parte, el desplegado de ISCU2 parece ocurrir a temperaturas menores, sugiriendo una T_m cercana a 55 °C. Al igual que en el caso del NB 2A9, el desplegado de ISCU2 aparenta ser irreversible bajo estas condiciones.

Por último, se analizó la resistencia al desplegado del complejo ISCU2:NB_2A9. La curva comienza a disminuir su elipticidad alrededor de 73 °C, lo que indica que el complejo es más resistente al despliegado térmico que ISCU2 y NB 2A9 por sí solos. El gráfico sugiere una T_m del complejo cercana a 80 °C, la cual es mayor que las T_m de ISCU2 y del NB 2A9. Sin embargo, el retorno a T_0 (verde punteado) indica también un despliegado parcialmente irreversible luego del enfriamiento del complejo.

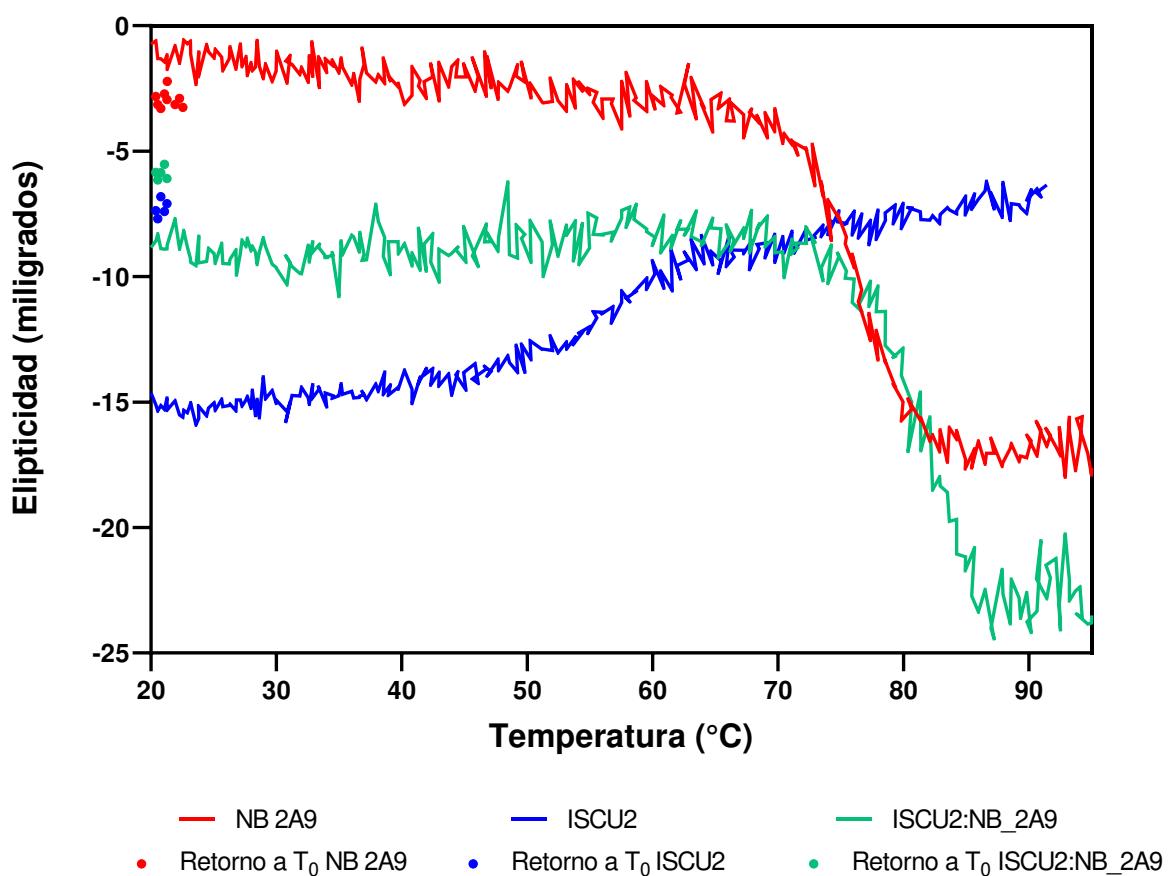


Figura 19. Evaluación de la resistencia al despliegado por temperatura y reversibilidad estructural de ISCU2, NB 2A9 y su complejo mediante dicroísmo circular. Se registraron los espectros de elipticidad de ISCU2 (curva azul), NB 2A9 (curva roja) y el complejo ISCU2:NB_2A9 (curva verde) en función de la temperatura (20-95 °C) a 222 nm, para analizar los cambios conformacionales asociados al despliegado

térmico. Los puntos representan la recuperación estructural (Retorno a T_0) tras el enfriamiento a la temperatura inicial de 20 °C.

Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, la determinación de las T_m aparentes (**Tabla 2**) se realizó mediante el ajuste de las curvas de desplegado inducido por temperatura a un modelo de dos estados. Es importante destacar que los valores de T_m obtenidos deben considerarse como T_m aparentes u observadas, ya que pueden estar influenciados por la concentración de proteína utilizada y la velocidad de la rampa de variación de temperatura.

	ISCU2	NB_2A9	ISCU2:NB_2A9
T_m (°C)	53.8	71.9	76.1

Tabla 2. Valores de T_m aparentes obtenidos. Temperaturas de *melting* (T_m) de ISCU2, NB_2A9 y el complejo ISCU2:NB_2A9, determinadas mediante un modelo de dos estados.

Este análisis sugiere que la formación del complejo ISCU2:NB_2A9 confiere una mayor resistencia al desplegado inducido por la temperatura en comparación con las proteínas individuales. La interacción entre ambas proteínas posterga el inicio del desplegado y mejora la resistencia estructural, lo que podría sugerir que el complejo estabiliza las conformaciones de los componentes. Sin embargo, la falta de reversibilidad en los procesos de desplegado y replegado impide realizar cálculos de fracciones de proteína en estado nativo y desplegado, ya que el sistema no se encuentra en equilibrio, impidiendo el cálculo de la diferencia de energía libre.

4. Aspectos funcionales de la interacción ISCU2:NB_2A9 en el contexto del supercomplejo humano.

El objetivo del ensayo fue evaluar si la interacción entre NB_2A9 e ISCU2 modifica la actividad desulfurasa *in vitro* del supercomplejo FXN/ISCU2/NIA. Específicamente, se buscó determinar si dicha interacción inhibe, activa o no ejerce efecto alguno sobre la actividad enzimática del supercomplejo. Para estudiar los efectos del nanoanticuerpo en la modulación de la función de ISCU2, se analizó la actividad de la cisteína desulfurasa del supercomplejo (NFS1), en presencia o ausencia del NB_2A9.

Con este fin, se evaluó y comparó la actividad desulfurasa de NIA para distintas condiciones, mediante el método del azul de metileno [60]. Este método permite cuantificar la cantidad de persulfuro producido a través de la medición de la absorbancia a 670 nm, correspondiente a la banda de absorción del azul de metileno. En consecuencia, un aumento en la absorbancia indica una mayor cantidad de persulfuro producido y, por lo tanto, una mayor actividad desulfurasa del supercomplejo.

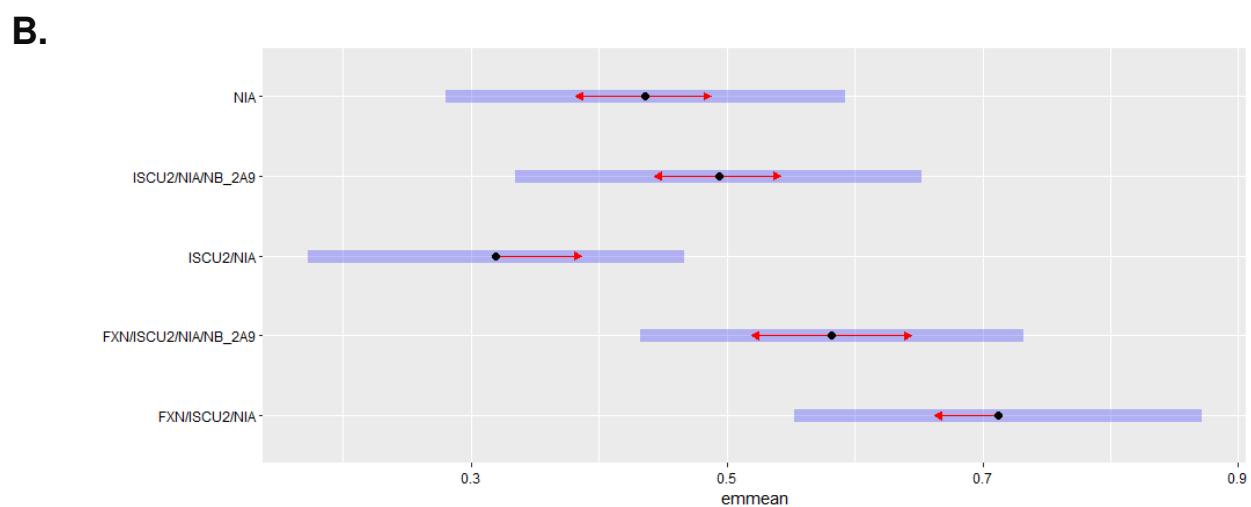
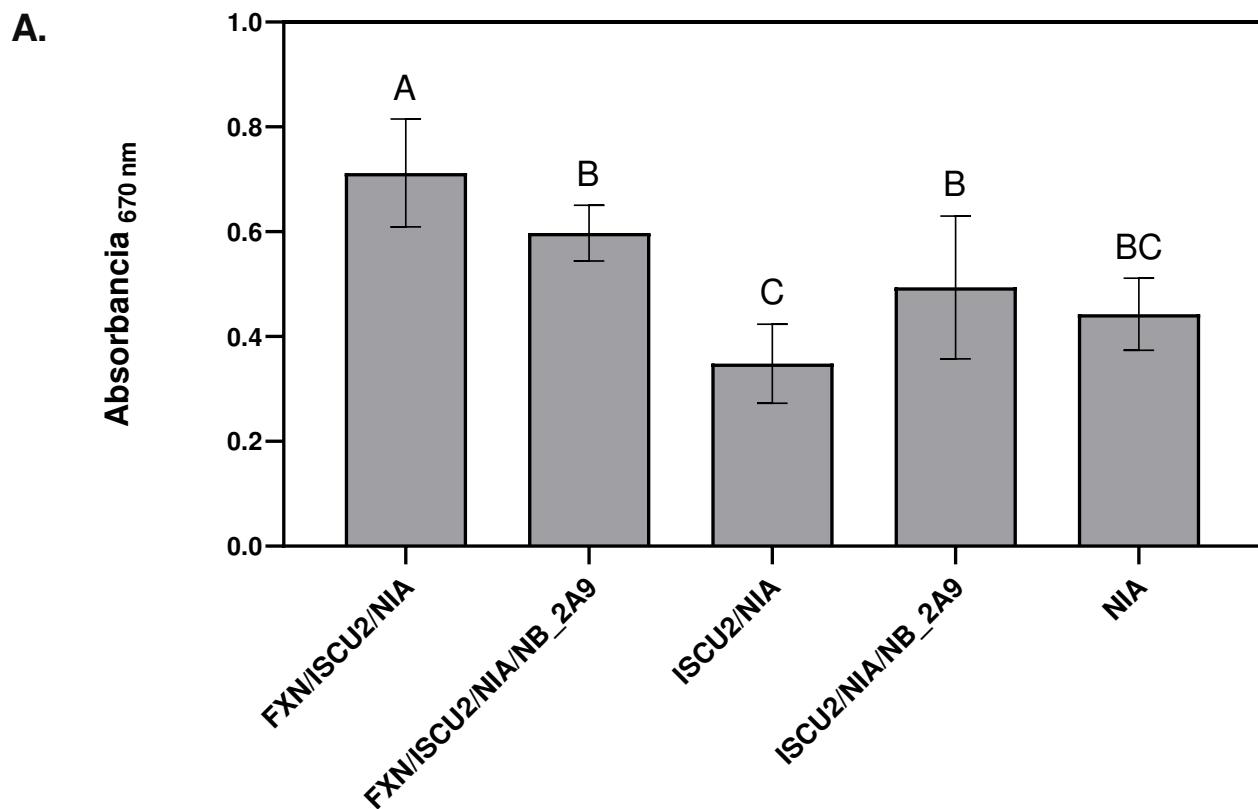


Figura 20. Actividad desulfurasa de NIA evaluada en distintas condiciones. FXN/ISCU2/NIA corresponde a una mezcla con NIA 1 μ M, ISCU2 1 μ M y FXN 3 μ M. FXN/ISCU2/NIA/NB_2A9 corresponde a una mezcla con NIA 1 μ M, ISCU2 1 μ M, FXN 3 μ M y NB 2A9 1 μ M. ISCU2/NIA corresponde a una mezcla con NIA 1 μ M e ISCU2 1 μ M. ISCU2/NIA/NB_2A9 corresponde a una mezcla con NIA 1 μ M, ISCU2 1 μ M y NB 2A9 1 μ M. NIA corresponde a una mezcla con NIA 1 μ M. (A) Efecto de la adición del NB 2A9 (en relación 1:1 con ISCU2) sobre la actividad del supercomplejo desulfurasa. Las barras muestran la absorbancia media a 670 nm (\pm desvío estándar) para cada condición. Las letras distintas indican que hay diferencias significativas entre esos grupos (p -valor < 0.05), mientras que letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -valor > 0.05). (B) Representación de las medias estimadas (puntos negros) para cada condición, junto con sus intervalos de confianza (barras celestes) y las comparaciones entre condiciones (flechas rojas), generada a partir de un modelo lineal con el paquete *emmeans* en R. Si las flechas rojas no se superponen, las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas (p < 0.05, método de Tukey). El eje X muestra el valor medio estimado y el eje Y enumera las distintas condiciones evaluadas.

Como se muestra en la **Figura 20**, el NB 2A9 parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad del supercomplejo completo, evidenciado por una disminución significativa de la absorbancia al añadir al NB (condición FXN/ISCU2/NIA/NB_2A9), en comparación con la condición sin este (condición FXN/ISCU2/NIA) (**Figura 20B**). La actividad desulfurasa fue menor para la condición ISCU2/NIA en comparación a NIA incubada con el complejo ISCU2:NB_2A9 (condición ISCU2/NIA/NB_2A9), pero ambas condiciones no presentaron diferencias significativas con la condición de NIA sola. Por su parte, se obtuvo una actividad desulfurasa máxima al incubar al supercomplejo completo FXN/ISCU2/NIA.

En ambas condiciones donde estuvo presente el NB 2A9 (FXN/ISCU2/NIA/NB_2A9 y ISCU2/NIA/NB_2A9), la actividad desulfurasa no difirió significativamente. Además, la actividad observada en estas condiciones tampoco difirió de la actividad desulfurasa de NIA (Condición NIA). Este resultado sugiere que el nanoanticuerpo podría interferir en la formación del supercomplejo y, por lo tanto, disminuir la actividad desulfurasa.

5. Reevaluación del complejo ISCU2:NB_2A9 utilizando AlphaFold 3.

Con el reciente desarrollo de AlphaFold 3 [63], se llevó a cabo una nueva predicción de la estructura del NB 2A9 (**Figura 21A**). Al comparar los resultados obtenidos para la estructura del NB 2A9, a partir de las predicciones de AlphaFold 2 y AlphaFold 3, se observa que ambas metodologías generan estructuras prácticamente idénticas, con diferencias localizadas principalmente en las conformaciones adoptadas por los segmentos CDR2 y CDR3 (**Figura 21B**).

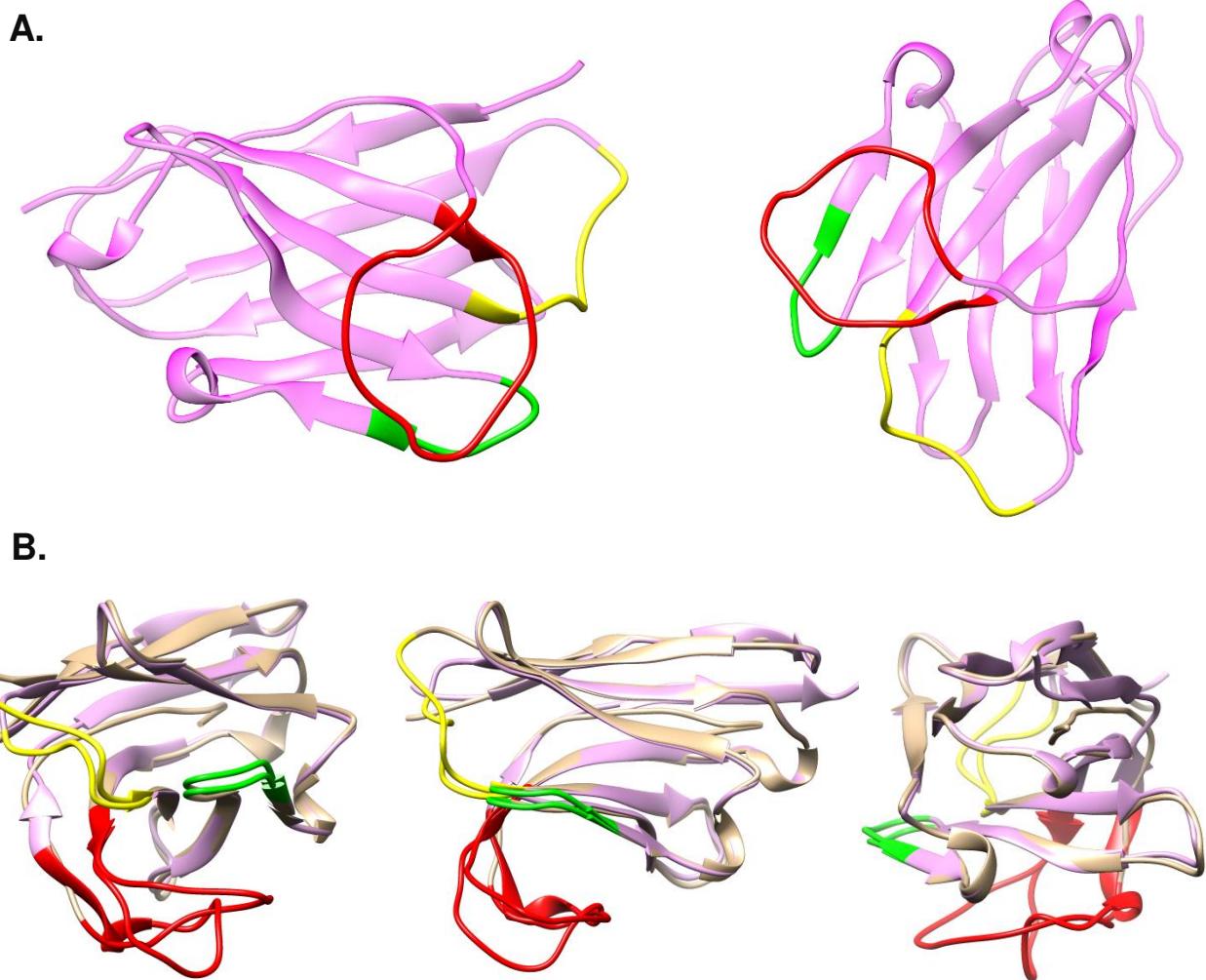


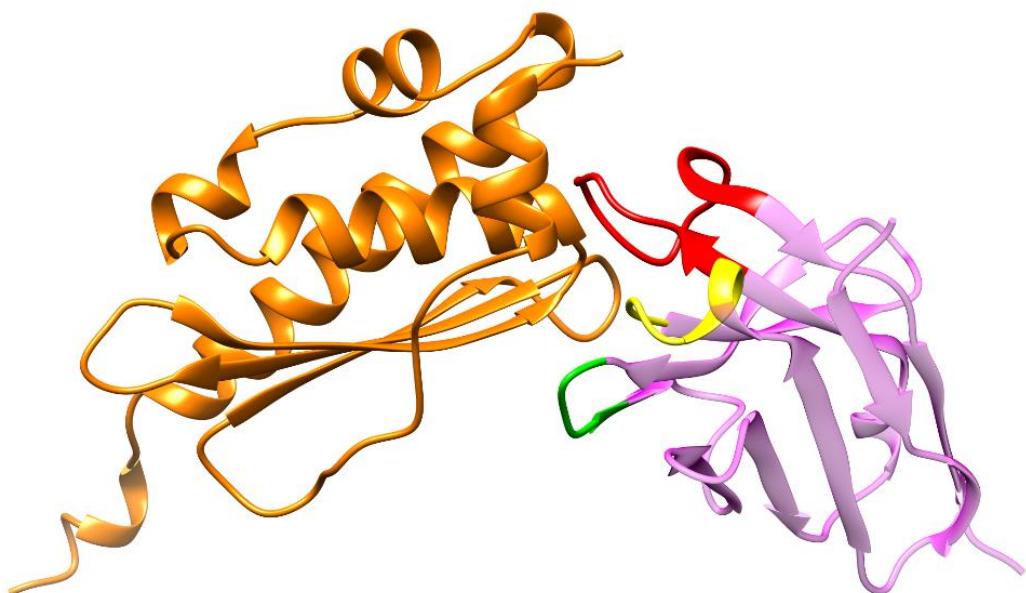
Figura 21. Modelo generado por AlphaFold 3 y superposición de las estructuras predichas del NB 2A9. Se destacan las regiones determinantes de la complementariedad: CDR1 en amarillo, CDR2 en verde y CDR3 en rojo. (A) Se presentan dos vistas de la estructura terciaria del NB 2A9 predicha mediante AlphaFold 3. (B) Se presentan tres vistas comparativas de la estructura predicha mediante AlphaFold 2 y AlphaFold 3. Se destacan las CDRs, las cuales presentan las mayores diferencias estructurales entre los modelos.

Asimismo, se reevaluó el complejo ISCU2:NB_2A9 mediante AlphaFold 3 (**Figura 22A**). En esta nueva predicción, el NB 2A9 parece adoptar una disposición más compacta y orientada hacia ISCU2, con las CDRs dirigidas directamente al sitio de interacción. En particular, la CDR3 (marcada en rojo) parece desempeñar un papel clave en la unión con ISCU2, en concordancia con lo observado en la predicción previa obtenida con AlphaFold 2. Por otro lado, la CDR2 (marcada en verde) muestra una mayor participación en la interacción con ISCU2, en contraste con la predicción de AlphaFold 2, donde se observaba una contribución al contacto menor.

Se analizaron las área de superficie de contacto molecular para ambas predicciones del complejo ISCU2:NB_2A9, y se obtuvo un área de 374.6 Å para la predicción de AlphaFold 2 y un área de 546.5 Å para la predicción de AlphaFold 3. Esto podría indicar que el complejo predicho mediante AlphaFold 3 es más estable y podría tener una afinidad más alta.

Por último, se analizó la interacción entre ISCU2 y el NB 2A9 en el contexto del supercomplejo ISC, utilizando AlphaFold 3 (**Figura 22B**), y se obtuvo una predicción notablemente diferente a la predicción de AlphaFold 2. Se puede observar que esta predicción sugiere que la interacción del NB 2A9 con ISCU2 genera un impedimento estérico que dificultaría la unión de ISCU2 a NFS1. Esta predicción coincide con lo obtenido en el ensayo de actividad, ya que explicaría la disminución en la actividad desulfurasa al agregar al NB 2A9 al supercomplejo ISC.

A.



B.

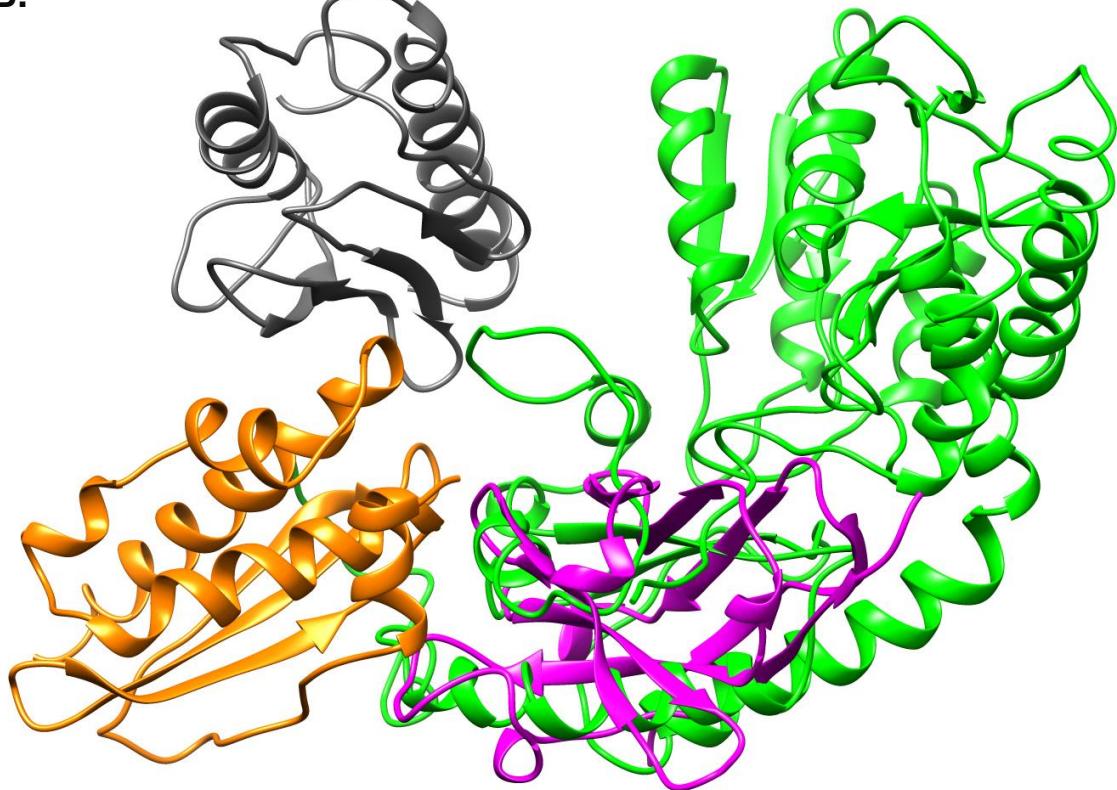


Figura 22. Efecto inhibitorio del NB 2A9 en la formación del supercomplejo ISC. (A) Modelo del complejo ISCU2:NB_2A9 predicho por AlphaFold 3, donde ISCU2 se muestra en naranja y el NB 2A9 en rosa con sus CDRs resaltadas. Las predicciones indican que la interacción entre ISCU2 y NB 2A9 ocurre específicamente a través de las CDRs del NB. (B) Predicción mediante AlphaFold 3 de la interacción entre ISCU2 y el NB 2A9, en el contexto del supercomplejo. Se visualiza a FXN en gris, NFS1 en verde, ISCU2 en naranja y NB 2A9 en magenta. Se observa un aparente solapamiento entre NB 2A9 y NFS1, lo que sugiere una posible interferencia en la interacción entre los componentes del supercomplejo ISC.

A partir de los hallazgos obtenidos, surge la interrogante sobre la naturaleza conformacional del nanoanticuerpo en solución y su posible dinámica estructural. En este contexto, se pueden considerar cuatro escenarios posibles:

1. **NB con una única conformación estable y de baja dinámica**, en la que adopta una estructura bien definida en solución, con una flexibilidad mínima y sin cambios estructurales significativos tras la unión con su antígeno.
2. **NB en equilibrio entre múltiples conformaciones dinámicas**, donde su estructura oscila entre diferentes estados interconvertibles, pero al interactuar con ISCU2, una de estas conformaciones, con mayor afinidad por su blanco, es estabilizada, desplazando el equilibrio hacia dicho estado estructural.

3. Inducción conformacional tras la interacción con el antígeno, donde la estructura del NB en solución difiere significativamente de la adoptada en el complejo, indicando que el ligando induce el reordenamiento estructural del nanoanticuerpo.

Para abordar esta cuestión y dilucidar el comportamiento conformacional del NB en solución, sería pertinente la realización de experimentos de dinámica mediante RMN, los cuales permitirían evaluar la presencia de estados conformacionales intercambiables y su posible modulación por la interacción con el antígeno.

Discusión y conclusiones finales

Para estudiar la modulación de la dinámica estructural y funcional de ISCU2 mediante nanoanticuerpos, se eligió y se produjo el nanoanticuerpo 2A9. La elección de este NB se fundamentó inicialmente en predicciones obtenidas mediante AlphaFold 2, cuyas visualizaciones indicaron que el NB 2A9 presentaba la menor capacidad de inhibir la formación del supercomplejo ISC. Asimismo, se lograron producir ISCU2 y NIA, con una pureza superior al 95%.

Por otro lado, se validó la interacción *in vitro* entre ISCU2 y el NB 2A9, demostrando la formación de un complejo ISCU2:NB_2A9 mediante SEC-FPLC, ELISA, DC y BLI. Tanto el ensayo de ELISA como el de BLI, demostraron que la unión del NB 2A9 a ISCU2 es dependiente de la concentración disponible de las proteínas, siendo mayor la interacción a mayor concentración de ISCU2 o NB 2A9. Los ensayos de SEC-FPLC y DC sugieren la formación del complejo, cuyo comportamiento no coincide con el esperado para las dos proteínas sin interaccionar (sumas algebraicas). No obstante, es fundamental confirmar estos resultados mediante la repetición de los ensayos para asegurar su reproducibilidad y robustez. El espectro de DC de ISCU2 es similar al reportado en trabajos previos para ISCU2 humana [67], con una banda negativa a 208 nm y valores negativos en la región 200-205 nm. En cuanto al espectro del NB 2A9, este también parece ser similar a espectros observados para otros nanoanticuerpos [70].

Se determinó un valor de K_D para el complejo ISCU2:NB_2A9 de 2.443×10^{-8} M, el cual se encuentra dentro del rango de afinidad convencional reportado para los nanoanticuerpos [71]. Este valor en el rango de nanomolar es típico de interacciones fuertes y específicas, como aquellas entre anticuerpos y sus antígenos, o entre proteínas y ligandos con alta complementariedad estructural. En comparación, la afinidad del NB 2A9 por ISCU2 es

superior a la descrita en estudios anteriores para ISCU2 y NFS1, siendo la K_D reportada del complejo ISCU2:NFS1 de 2×10^{-7} M en presencia de cisteína y de 1.7×10^{-6} M en ausencia [17]. Asimismo, la afinidad de ISCU2:NB_2A9 es mayor que la reportada para FXN con el complejo NIA:ISCU2, presentando un valor de K_D de 2.2×10^{-7} M [57]. Estos resultados sugieren que, de establecerse una competencia por la unión como la sugerida en la **Figura 23**, en el equilibrio hallaríamos predominantemente ISCU2 unida al NB 2A9. Si bien los parámetros obtenidos del ajuste del modelo cinético en el ensayo de BLI indican un buen ajuste, la representación gráfica de los datos no refleja un ajuste óptimo. Esto sugiere que el modelo cinético empleado podría no ser el más adecuado para describir la interacción estudiada y, por lo tanto, sería recomendable evaluar otros modelos cinéticos para mejorar la interpretación de los resultados.

Por otro lado, se buscó estudiar la estabilidad del complejo ISCU2:NB_2A9 mediante desplegado por temperatura seguido por DC. Si bien no fue posible estudiar la estabilidad por la falta de reversibilidad del proceso, se pudo determinar que el complejo ISCU2:NB_2A9 es más resistente al desplegado térmico que ISCU2 y el NB 2A9 por sí solos. El perfil de desplegado de ISCU2 coincide con estudios previos publicados [67], pero la Tm obtenida parece diferir de la reportada (41.8°C) [72]. Esto podría estar relacionado con la presencia de metales en la preparación de ISCU2, dado que se han reportado variaciones en las Tm de esta proteína en función de la presencia de zinc o hierro en la muestra [67, 72]. Asimismo, la diferencia en la Tm obtenida puede deberse a diferencias en las concentraciones utilizadas de proteína, así como también, diferencias en los buffers utilizados.

Por último, se evaluó el impacto funcional de la interacción entre ISCU2 y el NB 2A9 en el contexto del supercomplejo ISC mediante ensayos *in vitro*. Estudios previos han reportado una ligera disminución en la constante catalítica K_{cat} de la subunidad NFS1 tras su interacción con ISCU2, lo que se traduce en una reducción de la actividad desulfurasa en la condición ISCU2/NIA [66]. En el presente estudio, si bien se observó una disminución de la actividad en esta condición en comparación con NIA sola, la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Es posible que la inclusión de un mayor número de réplicas experimentales sea necesaria para incrementar la potencia del ensayo y validar estos resultados con mayor robustez. Por otro lado, la máxima actividad desulfurasa se obtuvo al incubar el supercomplejo completo FXN/ISCU2/NIA, en concordancia con estudios previos [59]. Finalmente, se determinó que el NB 2A9 ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad del supercomplejo completo. Además, la formación del complejo ISCU2:NB_2A9 parece interferir con la inhibición de la actividad de NFS1 mediada por ISCU2, lo que sugiere que el nanoanticuerpo podría interferir en la interacción entre ISCU2 y NIA. Por otra parte, la

actividad desulfurasa no aumenta tras la adición de la proteína activadora del supercomplejo (FXN) cuando el nanoanticuerpo está presente (condición FXN/ISCU2/NIA/NB_2A9), lo cual podría sugerir que, en estas condiciones, FXN no se está asociando con el resto de las proteínas. Este resultado respalda la hipótesis de que el NB 2A9 podría afectar la interacción entre ISCU2 y NIA, dado que la unión de FXN al supercomplejo depende de la unión previa de ISCU2 a NIA.

Considerando los resultados obtenidos, junto con las predicciones estructurales generadas por AlphaFold 3, se propone el siguiente modelo (**Figura 23**):

En condiciones normales, ISCU2 se une primero a NIA, formando un complejo que facilita la posterior interacción con FXN. La correcta formación de este supercomplejo es esencial para la funcionalidad del sistema de ensamblaje de centros Fe-S, asegurando así una actividad desulfurasa máxima. Sin embargo, en presencia del NB 2A9, la secuencia de interacciones se ve alterada. El NB 2A9 se une a ISCU2, impidiendo su interacción con NIA y, como consecuencia, bloqueando la posterior asociación con FXN. De este modo, el NB 2A9 podría afectar la correcta interacción entre las subunidades del supercomplejo ISC. Esto interferiría con la formación del supercomplejo funcional y, por ende, disminuiría la actividad desulfurasa del mismo.

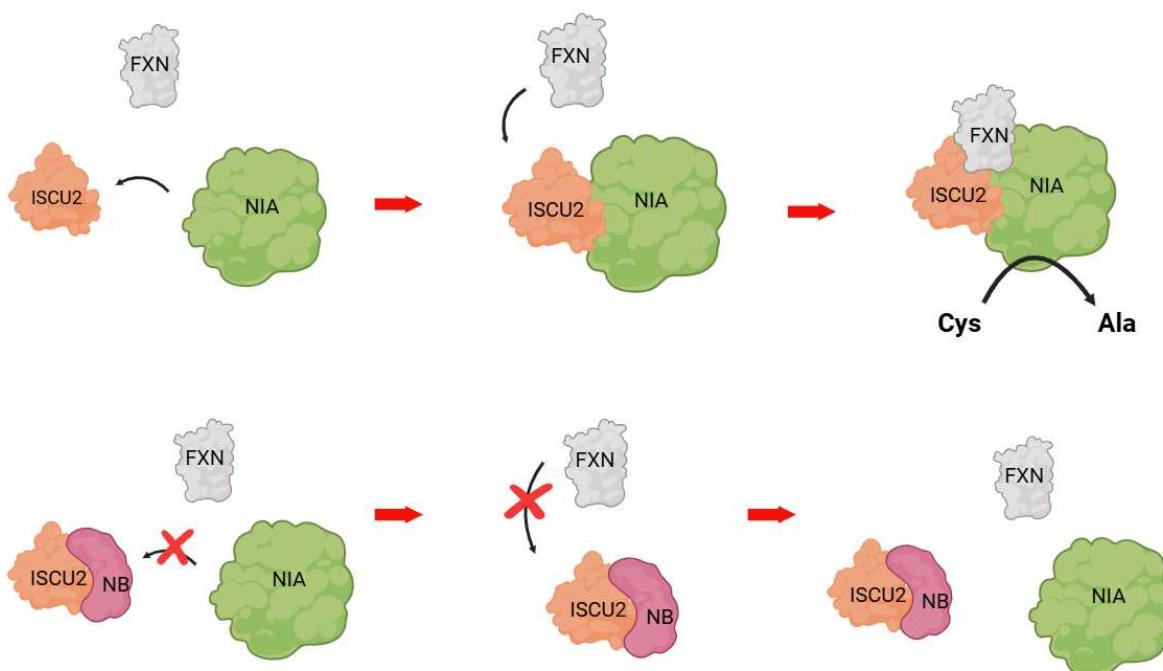


Figura 23. Modelo propuesto de interacción entre ISCU2, NIA y FXN, y el efecto inhibitorio del NB. En la parte superior, ISCU2 se une a NIA, permitiendo la posterior interacción con FXN, lo que favorece el

ensamblaje del supercomplejo. En la parte inferior, la presencia del NB 2A9 impide la interacción entre ISCU2 y NIA, bloqueando la asociación con FXN y alterando la formación del supercomplejo funcional.

Si bien hemos validado la interacción entre el NB 2A9 e ISCU2 *in vitro*, aún es necesario profundizar en los mecanismos subyacentes a esta asociación. En estudios futuros, será fundamental determinar con precisión el sitio de interacción dentro del complejo ISCU2:NB_2A9, y esclarecer experimentalmente el mecanismo por el cual el NB 2A9 inhibe la actividad desulfurasa del supercomplejo ISC. Además, resulta importante evaluar la interacción de ISCU2 con los dos nanoanticuerpos que no han sido analizados en el presente estudio (8B11 y 45H5), con el objetivo de determinar si estas asociaciones presentan diferencias en afinidad o especificidad en comparación con el NB 2A9. Asimismo, será necesario investigar si la funcionalidad de ISCU2 y del supercomplejo ISC se ve afectada en presencia de estos nanoanticuerpos.

Dado que los ensayos realizados en esta tesis fueron exclusivamente *in vitro*, sigue pendiente evaluar si la formación del complejo ISCU2:NB_2A9 ocurre también *in vivo*. Además, aunque hemos comprobado que el NB 2A9 inhibe al supercomplejo ISC *in vitro*, aún es necesario determinar si esta inhibición también se observa en condiciones *in vivo*. Finalmente, será relevante investigar si otros nanoanticuerpos poseen la capacidad de estabilizar variantes inestables de ISCU2, lo que podría tener implicaciones funcionales en la biogénesis de centros Fe-S y en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas.

Por último, consideramos que los nanoanticuerpos seleccionados, y en particular el NB 2A9, podrían ser de utilidad en diversas aplicaciones biotecnológicas. Entre ellas, destaca su potencial para la determinación de la concentración de ISCU2 en muestras biológicas. La posibilidad de emplear estos nanoanticuerpos como herramientas para la detección de ISCU2 en sistemas complejos, tales como mezclas de proteínas, lisados celulares y, eventualmente, muestras de pacientes, resulta especialmente prometedora. En este contexto, la combinación de estos nanoanticuerpos con la técnica de interferometría de biocapas podría ser aprovechada a corto plazo con este propósito. No obstante, será fundamental evaluar cuidadosamente la presencia de posibles interacciones inespecíficas entre los nanoanticuerpos y otras proteínas de la mezcla. Además, estos nanoanticuerpos podrían ser empleados en la detección de ISCU2 en células. En particular, el uso de los nanoanticuerpos seleccionados en experimentos de microscopía de fluorescencia como anticuerpos primarios de bajo costo representa un enfoque de gran interés para nuestro laboratorio. Cabe destacar que, debido a su menor tamaño en comparación con los anticuerpos convencionales, los nanoanticuerpos presentan ventajas significativas en sistemas celulares y en tejidos, ya que

su alta capacidad de difusión, combinada con su estabilidad estructural, los convierte en herramientas altamente eficaces para estudios en estos contextos.

Bibliografía

1. Land T, Rouault TA. Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):807-15. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80295-6. PMID: 9885568.
2. Garland SA, Hoff K, Vickery LE, Culotta VC. *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol*. 1999 Dec 10;294(4):897-907. doi: 10.1006/jmbi.1999.3294. PMID: 10588895.
3. Tong, W.-H. (2000). Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells. *The EMBO Journal*, 19(21), 5692–5700. doi:10.1093/emboj/19.21.5692.
4. Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life science alliance*, 2(5), e201900429. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>.
5. Webert, H.; Freibert, S.A.; Gallo, A.; Heidenreich, T.; Linne, U.; Amlacher, S.; Hurt, E.; Muhlenhoff, U.; Banci, L.; Lill, R. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5013.
6. Agar, J.N.; Zheng, L.; Cash, V.L.; Dean, D.R.; Johnson, M.K. Role of the IscU Protein in Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: IscS-mediated Assembly of a [Fe₂S₂] Cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2136–2137.
7. Fox, N.G.; Yu, X.; Feng, X.; Bailey, H.J.; Martelli, A.; Nabhan, J.F.; Strain-Damerell, C.; Bulawa, C.; Yue, W.W.; Han, S. Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2210.
8. Boniecki, M.T.; Freibert, S.A.; Muhlenhoff, U.; Lill, R.; Cygler, M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1287.
9. Hoff, K.G.; Silberg, J.J.; Vickery, L.E. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, *97*, 7790–7795.
10. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**:D523–D531 (2023).

11. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.
12. 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.
13. Böttinger 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Boniecki MT, Freibert SA, Mühlhoff U, Lill R, Cygler M. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nat Commun*. 2017;8: 1287.
18. 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/acschembio.6b01005.
19. 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.
20. 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.
21. Tsai C-L, Barondeau DP. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry*. 2010;49: 9132–9139.
22. 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.
23. 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.
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, Gourdoupis 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. Freibert, S.-A., et al. (2021). "N-terminal tyrosine of ISCU2 triggers [2Fe-2S] cluster synthesis by ISCU2 dimerization." *Nature Communications*, 12:6902. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27122-w>.
29. Lill, R., & Freibert, S.-A. (2020). Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1). doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111540.
30. N.G. Fox, A. Martelli, J.F. Nabhan, J. Janz, O. Borkowska, C. Bulawa, W.W. Yue, Zinc(II) binding on human wild-type ISCU and Met140 variants modulates NFS1 desulfurase activity, *Biochimie* (2018), doi: 10.1016/j.biochi.2018.07.012.
31. R. Puglisi, A. Pastore, The role of chaperones in iron-sulfur cluster biogenesis, *FEBS Lett.* 592 (2018) 4011–4019.
32. L.E. Vickery, J.R. Cupp-Vickery, Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42 (2007) 95–111.
33. P. Yuvaniyama, J.N. Agar, V.L. Cash, M.K. Johnson, D.R. Dean, NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 599–604.
34. C. Baussier, S. Fakroun, C. Aubert, S. Dubrac, P. Mandin, B. Py, F. Barras, Making iron-sulfur cluster: structure, regulation and evolution of the bacterial ISC system, *Adv. Microb. Physiol.* 76 (2020) 1–39.
35. V. Ali, Y. Shigeta, U. Tokumoto, Y. Takahashi, T. Nozaki, An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16863–16874.
36. D. Vinella, L. Loiseau, S. Ollagnier de Choudens, M. Fontecave, F. Barras, In vivo [Fe-S] cluster acquisition by IscR and NsrR, two stress regulators in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 87 (2013) 493–508.
37. C. Baussier, S. Fakroun, C. Aubert, S. Dubrac, P. Mandin, B. Py, F. Barras, Making iron-sulfur cluster: structure, regulation and evolution of the bacterial ISC system, *Adv. Microb. Physiol.* 76 (2020) 1–39.
38. U. Mühlhoff, J. Gerber, N. Richhardt, R. Lill, Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein lsu1p, *EMBO J.* 22 (2003) 4815–4825.
39. Crooks, D.R., et al., Tissue specificity of a human mitochondrial disease: differentiation-enhanced mis-splicing of the Fe-S scaffold gene ISCU renders patient cells more sensitive to oxidative stress in ISCU myopathy. *J Biol Chem*, 2012. 287(48): p. 40119-30.
40. Holmes-Hampton, G.P., et al., Use of antisense oligonucleotides to correct the splicing error in ISCU myopathy patient cell lines. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(23): p. 5178-5187.
41. Nordin, A., E. Larsson, and M. Holmberg, The defective splicing caused by the ISCU intron mutation in patients with myopathy with lactic acidosis is repressed by PTBP1 but can be derepressed by IGF2BP1. *Hum Mutat*, 2012. 33(3): p. 467-70.

42. Nordin, A., et al., Tissue-specific splicing of ISCU results in a skeletal muscle phenotype in myopathy with lactic acidosis, while complete loss of ISCU results in early embryonic death in mice. *Hum Genet*, 2011. 129(4): p. 371-8.
43. Orphanet. (2024). ISCU myopathy. Orphanet. Recuperado el 14 de diciembre de 2024 de <https://www.orpha.net/en/disease/detail/43115?name=iscu&mode=name>
44. Sanaker, P.S., et al., Differences in RNA processing underlie the tissue specific phenotype of ISCU myopathy. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1802(6): p. 539-44.
45. Kollberg G, Melberg A, Holme E, Oldfors A (February 2011). "Transient restoration of succinate dehydrogenase activity after rhabdomyolysis in iron-sulphur cluster deficiency myopathy". *Neuromuscular Disorders*. 21 (2): 115–20. doi:10.1016/j.nmd.2010.11.010. PMID 21196119. S2CID 38626230.
46. Kollberg G, Tulinius M, Melberg A, Darin N, Andersen O, Holmgren D, Oldfors A, Holme E (August 2009). "Clinical manifestation and a new ISCU mutation in iron-sulphur cluster deficiency myopathy". *Brain*. 132 (Pt 8): 2170–9. doi:10.1093/brain/awp152. PMID 19567699.
47. Saha, P.P., et al., The presence of multiple cellular defects associated with a novel G50E iron-sulfur cluster scaffold protein (ISCU) mutation leads to development of mitochondrial myopathy. *J Biol Chem*, 2014. 289(15): p. 10359-10377.
48. Legati, A., et al., A novel de novo dominant mutation in ISCU associated with mitochondrial myopathy. *J Med Genet*, 2017. 54(12): p. 815-824.
49. Jovčevska I. y Muyldermans S. 2020. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 34: 11–26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
50. Yang, E. Y., & Shah, K. (2020). Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10. doi:10.3389/fonc.2020.01182
51. Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlköning, A., Ruf, A., ... Steyaert, J. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols*, 9(3), 674–693. doi:10.1038/nprot.2014.039.
52. Jin B., Odongo S., Radwanska M. y Magez S. 2023. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 5994. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065994>.
53. Ma H., Ó'Fágáin C. y O'Kennedy R. 2020. Antibody stability: a key to performance - analysis, influences and improvement. *Biochimie*, 177, 213-225. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.019>.
54. Ezequiel Jorge Alba Posse, Carolina González, Pedro Carriquiriborde, Alejandro Nadra, Javier Gasulla. Optimization and validation of a protein phosphatase inhibition assay for accessible microcystin detection. *Talanta*, Volume 255, 2023, 124174, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124174>.
55. Noseda, D. G., D'Alessio, C., Santos, J., Idrovo-Hidalgo, T., Pignataro, F., Wetzler, D. E., Gentili, H., Nadra, A. D., Roman, E., Paván, C., & Ruberto, L. A. M. (2023). Development of a Cost-Effective Process for the Heterologous Production of SARS-CoV-2 Spike Receptor Binding Domain Using *Pichia pastoris* in Stirred-Tank Bioreactor. *Fermentation*, 9(6), 497. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060497>

56. Hernan G. Gentili, María Florencia Pignataro, Justo Olmos, María Florencia Pavan, Lorena Itatí Ibañez, Javier Santos, Francisco Velazquez Duarte; CRISPR/Cas9-based edition of frataxin gene in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 11 October 2023; 480 (19): 1533–1551. doi: <https://doi.org/10.1042/BCJ20230244>
57. Castro IH, Pignataro MF, Sewell KE, Espeche LD, Herrera MG, Noguera ME, Dain L, Nadra AD, Aran M, Smal C, Gallo M, Santos J. Frataxin Structure and Function. *Subcell Biochem*. 2019;93:393-438. doi: 10.1007/978-3-030-28151-9_13. PMID: 31939159.
58. Pignataro, M. F., Herrera, M. G., Fernández, N. B., Aran, M., Gentili, H. G., Battaglini, F., & Santos, J. (2023). Selection of Synthetic Proteins to Modulate the Human Frataxin Function. *Biotechnology and Bioengineering*, 120, 409–425. <https://doi.org/10.1002/bit.28263>
59. Herrera, M. G., Pignataro, M. F., Noguera, M. E., Cruz, K. M., & Santos, J. (2018). Rescuing the Rescuer: On the Protein Complex between the Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein and ISD11. *ACS Chemical Biology*, 13(6), 1455–1462. doi:10.1021/acscchembio.8b00184.
60. Siegel LM. A DIRECT MICRODETERMINATION FOR SULFIDE. *Anal Biochem*. 1965;11: 126–132.
61. 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
62. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O. & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.
63. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630, 493–500 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
64. Santos J. Las proteínas: Estructuras fascinantes. Buenos Aires: Ministerio de Educación de la Nación, Instituto Nacional de Educación Tecnológica; 2009. 192 p
65. Corrêa, D. H. A., & Ramos, C. H. I. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), 164-173.
66. Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A., and Barondeau, D. P. (2012) Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis, *Biochemistry* 51, 2506-2514.
67. Fox, N. G., Martelli, A., Nabhan, J. F., Janz, J., Borkowska, O., Bulawa, C., & Yue, W. W. (2018). Zinc(II) binding on human wild-type ISCU and Met140 variants modulates NFS1 desulfurase activity. *Biochimie*, 152, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.012>
68. Truong, T. T. T., Huynh, V. Q., Vo, N. T., & Nguyen, H. D. (2022). Studying the characteristics of nanobody CDR regions based on sequence analysis in combination with 3D structures. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 20(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00439-9>
69. Sockolosky, J. T., & Szoka, F. C. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein expression and purification*, 87(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.11.002>

70. Ando, Yu & Nakazawa, Hikaru & Miura, Daisuke & Otake, Maho & Umetsu, Mitsuo. (2021). Enzymatic ligation of an antibody and arginine 9 peptide for efficient and cell-specific siRNA delivery. *Scientific Reports*. 11. 21882. 10.1038/s41598-021-01331-1.
71. Muylldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
72. Iannuzzi, C., Adrover, M., Puglisi, R., Yan, R., Temussi, P. A., & Pastore, A. (2014). The role of zinc in the stability of the marginally stable IscU scaffold protein. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 23(9), 1208–1219. <https://doi.org/10.1002/pro.2501>