



**Universitat**  
de les Illes Balears

# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRATAXINAS Y DE SU EFECTO PROTECTOR SOBRE LA $\alpha$ -SINUCLEÍNA

ANA BELÉN UCEDA MAYO

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química  
(Especialidad en Química Biológica)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2017-2018

1 de Septiembre de 2018

Tutor del Trabajo: Dr. Bartolomé Vilanova Canet

Cotutor: Dr. Miquel Adrover Estelrich



## RESUMEN

Las frataxinas son una familia de proteínas que se encuentran altamente conservadas entre los eucariotas y algunos procariotas. De todas ellas, la frataxina de levadura (Yfh1) y la humana (Hfra) han sido ampliamente estudiadas.

La frataxina es una proteína mitocondrial cuya función no se conoce con exactitud. Sin embargo, es sabido que su deficiencia da lugar a la acumulación de hierro y al incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando un mal funcionamiento de las mitocondrias y del metabolismo celular en general. De hecho, la baja expresión de Hfra está relacionada con la ataxia de Friedreich (FRDA), una enfermedad autosómica recesiva, progresiva y neurodegenerativa en la que el estrés oxidativo juega un papel fundamental.

La sobreexpresión de Hfra en la célula incrementa su tolerancia al estrés oxidativo, al aumento de las concentraciones de hierro y a la presencia de  $H_2O_2$ . Por este motivo, la Hfra ha surgido como candidata a ser utilizada farmacológicamente como terapia de enfermedades inducidas por las ROS. Sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo mediante el cual la Hfra es capaz de regular la concentración de ROS en la célula.

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro y por la consecuente disminución en la producción de dopamina. Además, estudios *post mortem* de cerebros de pacientes que han padecido la EP revelan la presencia de inclusiones neuronales conocidas como "cuerpos de Lewy" formadas principalmente por agregados insolubles de la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn). Aunque la causa de la EP es desconocida, se apunta a que la degeneración neuronal y la formación de cuerpos de Lewy podrían estar relacionadas con el estrés oxidativo en la sustancia negra del cerebro.

La Hfra unida a un péptido de tipo CPP (del inglés *Cell-penetrating peptide*) es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y de proteger las neuronas dopaminérgicas de las ROS, lo que sugiere que la Hfra podría tener un papel fundamental en la protección del estrés oxidativo y prevenir la oxidación de otras proteínas como la  $\alpha$ -Syn, disminuyendo el riesgo de desarrollar la EP.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad antioxidante de la Hfra y se ha comparado con la de su homólogo procedente de levadura (Yfh1). Así, se ha podido comprobar que tanto la Hfra como la Yfh1 son capaces de secuestrar radicales  $O_2^{\cdot-}$ , de retardar la formación de  $H_2O_2$  y de inhibir la formación de radicales  $HO^{\cdot}$  procedentes de la degradación oxidativa del ácido ascórbico. Sin embargo, a diferencia de lo observado con la Yfh1, la Hfra no es capaz de secuestrar radicales  $HO^{\cdot}$ , lo que sugiere que la evolución podría haber hecho que la Hfra sea menos susceptible que la Yfh1 a ser dañada por este tipo de radicales. Adicionalmente, y en base a la utilización reciente de la frataxina como terapia contra la EP, también se ha estudiado si se produce algún tipo de interacción entre la frataxina y la  $\alpha$ -Syn y se ha analizado si existe algún efecto protector o beneficioso más allá de dicha interacción. Los resultados obtenidos han demostrado que, a pesar de no producirse ninguna interacción entre las dos proteínas, la Hfra inhibe el secuestro de radicales  $HO^{\cdot}$  por parte de la  $\alpha$ -Syn, protegiéndola de los daños que puede causar la neutralización de los mismos en su estructura; mientras que la Yfh1, debido a su gran capacidad para inhibir la degradación del ácido ascórbico y la formación de ROS, también protege a la  $\alpha$ -Syn de la oxidación.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
1.1. Frataxina: características generales.....	7
1.1.1. Secuencia y localización en la célula.....	7
1.1.2. Propiedades estructurales.....	8
1.1.3. Capacidad de unión a cationes metálicos.....	9
1.1.4. Tendencia a oligomerizar.....	11
1.2. Función de la frataxina.....	11
1.2.1. Frataxina como proteína de almacenamiento de hierro.....	11
1.2.2. Frataxina como proteína chaperona de hierro.....	12
1.2.3. Papel de la frataxina en la fosforilación oxidativa.....	13
1.3. Efecto de la frataxina sobre el estrés oxidativo.....	13
1.3.1. Estrés oxidativo: origen y descripción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	13
1.3.2. Frataxina como agente antioxidante.....	14
1.4. Enfermedad de Parkinson y su relación con la $\alpha$ -sinucleína y la frataxina.....	15
1.4.1. Aspectos generales de la enfermedad de Parkinson.....	15
1.4.2. La $\alpha$ -sinucleína y su tendencia a formar agregados.....	16
1.4.2.1. Propiedades y función.....	16
1.4.2.2. Capacidad de unión a cationes metálicos.....	17
1.4.2.3. Agregación de la $\alpha$ -sinucleína y su implicación patológica.....	17
1.4.3. Papel de la frataxina como agente antioxidante en la enfermedad de Parkinson.....	18
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. Materiales.....	21
3.1.1. Reactivos.....	21
3.1.2. Disoluciones tampón.....	21
3.2. Métodos experimentales.....	21
3.2.1. Producción, purificación y caracterización de la $\alpha$ -sinucleína.....	21
3.2.2. Estudio de la degradación del ácido ascórbico.....	22
3.2.2.1. En ausencia de cationes metálicos.....	22
3.2.2.2. En presencia de $\text{Cu}^{2+}$ y $\text{Fe}^{3+}$ .....	23
3.2.3. Estudio de la formación de especies radicalarias.....	23
3.2.4. Estudio de la cinética de formación de las ROS procedentes de la degradación oxidativa del ácido ascórbico.....	24

3.2.4.1. Formación del radical $O_2^{\bullet-}$ .....	24
3.2.4.2. Formación de $H_2O_2$ .....	24
3.2.4.3. Formación del radical $HO^{\bullet}$ .....	25
3.2.5. Estudio de la capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para secuestrar radicales $O_2^{\bullet-}$ y $HO^{\bullet}$ .....	25
3.2.5.1. Secuestro del radical $O_2^{\bullet-}$ [Método (PMS)-NADH].....	25
3.2.5.2. Secuestro del radical $HO^{\bullet}$ (Método CUPRAC).....	26
3.2.6. Efecto del secuestro de ROS sobre algunas propiedades de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína.....	27
3.2.6.1. Efecto sobre el peso molecular proteico.....	27
3.2.6.2. Efecto sobre el entrecruzamiento de residuos tirosina.....	27
3.2.7. Estudio de la interacción de la frataxina humana y la frataxina de levadura con la $\alpha$ -sinucleína.....	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
4.1. Producción, purificación y caracterización de la $\alpha$ -sinucleína.....	29
4.2. Elección de las condiciones experimentales en función de la velocidad de degradación del ácido ascórbico.....	30
4.3. Efecto de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína sobre la velocidad de degradación del ácido ascórbico catalizada por cationes metálicos.....	30
4.4. Capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para inhibir la formación de las ROS.....	32
4.4.1. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de especies radicalarias.....	32
4.4.2. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de $O_2^{\bullet-}$ .....	33
4.4.3. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de $H_2O_2$ .....	34
4.4.4. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de $HO^{\bullet}$ .....	35
4.5. Capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para secuestrar las ROS procedentes de la degradación oxidativa del ácido ascórbico.....	36
4.5.1. Estudio de la capacidad de secuestro de $O_2^{\bullet-}$ .....	36
4.5.2. Estudio de la capacidad de secuestro de $HO^{\bullet}$ .....	36
4.5.3. Efecto del secuestro de radicales libres sobre el peso molecular proteico y sobre el entrecruzamiento de residuos tirosina.....	37
4.6. Estudio de la interacción de la frataxina humana y la frataxina de levadura con la $\alpha$ -sinucleína.....	41
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>6. ANEXOS.....</b>	<b>44</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1. Frataxina: características generales

Las frataxinas son una familia de pequeñas proteínas, formadas por 100 – 220 aminoácidos, que se encuentran altamente conservadas entre los eucariotas y algunos procariotas. De todas ellas, las más estudiadas han sido la frataxina de bacteria (CyaY), procedente de *Escherichia coli*, la de levadura (Yfh1), de *Saccharomyces cerevisiae*, y la humana (Hfra). Éstas han sido escogidas como proteínas representativas de organismos de complejidad filogenética creciente, tratando de encontrar alguna similitud que permitiera relacionar su secuencia y estructura con su función biológica [Adinolfi, 2002].

La frataxina humana es una proteína mitocondrial codificada por el gen *FXN* del cromosoma 9. Los niveles más altos de proteína se encuentran en el corazón y en la médula espinal, aunque se expresa en todos los tejidos del organismo. El estudio de la Hfra ha sido promovido por su relación con la ataxia de Friedreich (FRDA), una enfermedad autosómica recesiva, progresiva y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso periférico, la médula espinal y el tejido muscular, incluido el músculo cardíaco [Lupoli, 2017]. La FRDA está causada por una expansión de tripletes GAA en el primer intrón del gen *FXN* [Campuzano, 1996]. Esta mutación genera una disminución de hasta un 30% en la expresión de la frataxina en las células neuronales y musculares, lo que da lugar a la degeneración de neuronas sensitivas y a cardiomiopatías [Campuzano, 1997]. Adicionalmente, la frataxina está siendo utilizada en investigaciones que van más allá de su relación con la FRDA, basándose en su posible acción como agente antioxidante [Kim, 2012].

#### 1.1.1. Secuencia y localización en la célula

A partir del alineamiento secuencial de las frataxinas CyaY, Yfh1 y Hfra (Figura 1), algunos autores han concluido que las proteínas presentan dos regiones diferenciadas. La primera región, que comprende unos 70 – 90 residuos del extremo N-terminal, únicamente se presenta en los eucariotas y su grado de conservación es bajo. La segunda región, que comprende unos 100 – 120 residuos del extremo C-terminal, está bastante conservada entre las distintas especies, con un porcentaje de similitud de un 45% en base a sus propiedades químicas, lo que parece indicar que ésta es la región funcional de la proteína [Pastore, 2013].

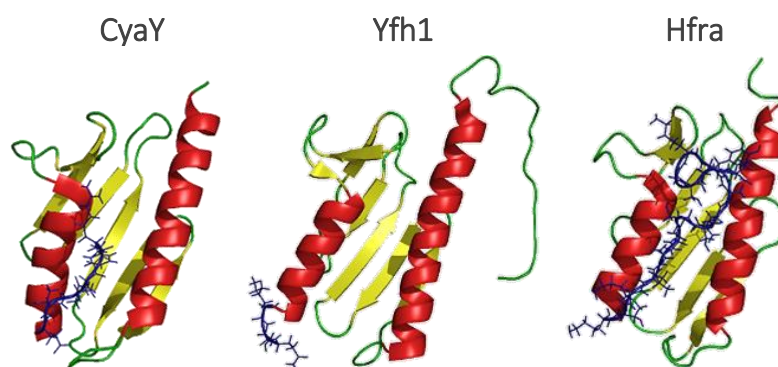
	1	10	20	30	40	----	50	60	
CYAY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
YFH1	---MIK	SLASLV	-----	-----	RVSSVM	GRRYMIAA	AGGERAR	FCPAVT-NKKNHTVNTF---Q	
HFRA	MWTLG	RRAVAGLL	ASPSPAQAQTL	TRVPRPAELAP	LCGRRGLRTDI	----	DATCTPRRASSNQRGLN	QIWNVK	
	70	80	---90	100	110	-	120	130	
CYAY	-----	-----	-----	MNDSE	FHRLADQLWLT	IEERLDDWD	-----	GDSIDCEINGGVLITIFE-	
YFH1	K--R-	FVESSTDGQV-	VPQEVNL	LPLEKYHEE	ADDYLDHL	LDSLEELSE	AHPDCIPD--	VELSHGVMLEI-P	
HFRA	KQSVYLMNLR	KSGTLGHPGS	---	LDETTYERLAEETLDS	LAEFFEDLAD-	KPYTFEDYDV	SFGSGVLT	VKLGG	
	140	150	160	170	180	190	200	210	
CYAY	NGSKI	IINRQEP	LHQVWLATKQ-	GGYHFDLKGDEWI	CDRSGETF	WDLLEQAAT	QQAGETV	SFR-----	
YFH1	AFGT	YVINKQP	PNKQIWLASPLS	GPNRFDLL	NGEWSLR	NGTKLTDIL	TEEVEK	AISKSQ-----	
HFRA	DLGT	YVINKQTP	NKQIWLSSPSS	GPKRYDWT	GKNWVYSHD	GVSLHELL	LAAELTK	ALKTKLDLSSLAYS	GKDA

**Figura 1.** Alineamiento de la secuencia de las frataxinas CyaY, Yfh1 y Hfra realizado con el programa Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK). Los residuos coloreados en verde coinciden en las tres secuencias y los coloreados en rojo o azul presentan propiedades más o menos similares. Las secuencias de la figura corresponden a los códigos P27838-CyaY, Q07540-Yfh1 y Q16595-Hfra de la base de datos Swiss-prot.

En los eucariotas, la frataxina se codifica en el núcleo y se expresa en el citoplasma en forma de precursor, con una pre-secuencia en el extremo N-terminal que actúa como señal de importación a la matriz mitocondrial, donde la proteína lleva a cabo su función [Gibson, 1996; Koutnikova, 1997]. Posteriormente, la frataxina sufre un proceso de maduración en el que la peptidasa mitocondrial escinde parte del extremo N-terminal. Estudios *in vitro* han demostrado que la frataxina humana alcanza su forma madura Hfra<sup>81-210</sup> a partir de la ruptura proteolítica de la forma intermedia Hfra<sup>42-210</sup>, aunque se ha visto que la forma Hfra<sup>56-210</sup> también es estable [Cavadini, 2000; Condò, 2007]. Sin embargo, la frataxina de levadura sufre una única ruptura proteolítica que da lugar a la forma madura Yfh1<sup>52-174</sup> [Branda, 1999]. Este hecho explicaría la baja conservación de la región N-terminal en las frataxinas eucariotas y la ausencia de ella en las procariotas que carecen de mitocondrias.

### 1.1.2. Propiedades estructurales

Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y de difracción de rayos X han demostrado que las frataxinas CyaY, Yfh1 y Hfra comparten un plegamiento de tipo sándwich  $\alpha$ - $\beta$  (Figura 2) formado por dos hélices- $\alpha$  terminales en un plano de la proteína, 5 hebras  $\beta$  antiparalelas en un segundo plano y una sexta hebra  $\beta$  (séptima en el caso de la Yfh1) que une los dos planos [Musco, 2000; Nair, 2004; He, 2004; Vilanova, 2014]. Además, se ha comprobado que el extremo N-terminal de la Yfh1 se encuentra parcialmente ordenado, adoptando una estructura de tipo hélice  $3_{10}$  entre los residuos Gln<sup>63</sup> y Leu<sup>66</sup>; mientras que el de la Hfra está desordenado [Prischi, 2009].



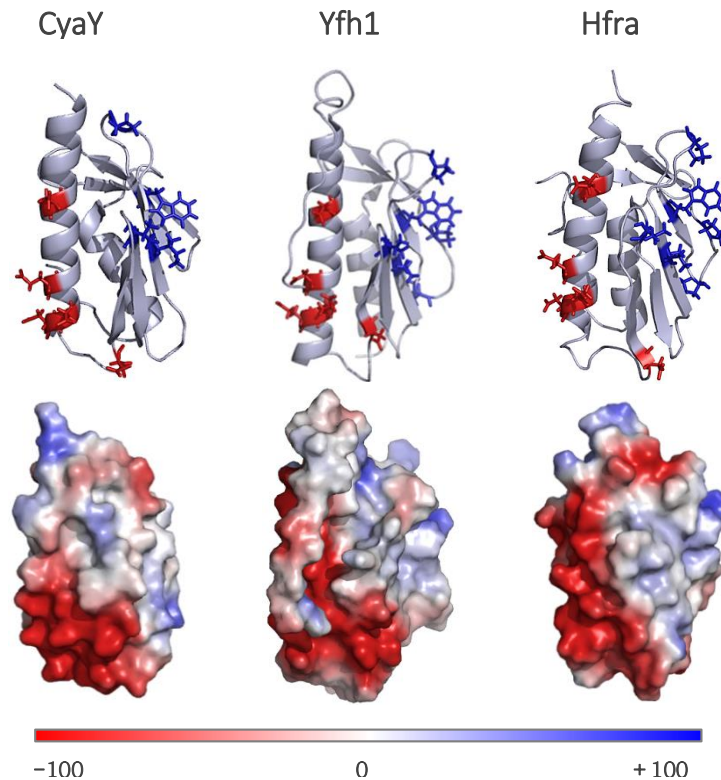
**Figura 2.** Estructura terciaria de las frataxinas de bacteria, de levadura y humana resueltas mediante RMN. Los colores rojo, verde y amarillo hacen referencia a los elementos de estructura secundaria de la proteína, mientras que en azul se indica el fragmento C-terminal sin estructura definida. Las estructuras corresponden a los códigos PDB: 1SOY (CyaY), 2GA5 (Yfh1) y 1LY7 (Hfra).

La principal diferencia en la estructura de las tres frataxinas es la longitud del extremo C-terminal. En la frataxina de levadura, este fragmento está formado por tan solo 4 residuos, mientras que el de la frataxina de bacteria y la humana presenta 7 y 16 residuos, respectivamente.

La resolución estructural de las frataxinas también ha permitido estudiar las regiones más conservadas entre los distintos homólogos, las cuales deberían ser importantes en su función y estabilidad. La primera región conservada se sitúa en la interfaz de la hélice- $\alpha_1$  y la hebra  $\beta_1$ . Esta zona está formada por numerosos residuos cargados negativamente que dan lugar a una región ácida que representa un cuarto de la superficie total de la proteína. En la frataxina humana, por ejemplo, existen 10 residuos con carga negativa en la hélice- $\alpha_1$  y 3 residuos adicionales en la hebra  $\beta_1$ . Entre ellos, el Glu<sup>100</sup>, Glu<sup>108</sup>, Glu<sup>111</sup>, Asp<sup>112</sup> y Asp<sup>122</sup> se encuentran altamente conservados. Además, las frataxinas presentan una segunda región conservada que se trata de una zona hidrofóbica situada en la lámina



$\beta$ . En esta región, los residuos Val<sup>131</sup>, Val<sup>144</sup>, Pro<sup>150</sup>, Trp<sup>155</sup>, Pro<sup>159</sup> y Pro<sup>163</sup>, correspondientes a la Hfra, también se encuentran en las demás frataxinas (Figura 3).



**Figura 3.** Arriba: Estructura de las frataxinas de bacteria, de levadura y humana donde se muestran los residuos con carga negativa (rojo) y los residuos hidrofóbicos (azul) altamente conservados. Abajo: Superficie de potencial electrostático de las frataxinas CyaY, Yfh1 y Hfra. La orientación de las proteínas es la misma que la mostrada en la parte de arriba. Las estructuras corresponden a los códigos PDB: 1SOY (CyaY), 2GA5 (Yfh1) y 1LY7 (Hfra).

A pesar de compartir el mismo plegamiento, las frataxinas presentan una estabilidad térmica muy diferente: la frataxina de levadura, con un punto de fusión ( $T_m$ ) de  $35,8 \pm 1,2^\circ\text{C}$ , es mucho menos estable que la de bacteria ( $T_m = 50,1 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ) y la humana ( $T_m = 69,4 \pm 0,04^\circ\text{C}$ ) [Adinolfi, 2002]. Además, la Yfh1 presenta la menor estabilidad térmica a baja temperatura en comparación con el resto de homólogos, perdiendo también su estructura alrededor de los  $5^\circ\text{C}$  en condiciones fisiológicas y en ausencia de cualquier agente químico desnaturizante [Adrover, 2010]. Este fenómeno ha hecho que la proteína haya sido utilizada como modelo para estudiar el proceso de desnaturización fría, el cual ocurre habitualmente por debajo del punto de congelación del agua. Pastore y colaboradores, tras diseñar una serie de frataxinas mutantes de diferente longitud en la región C-terminal, consiguieron demostrar que cuanto mayor es la longitud de este extremo, más protegidos están los residuos hidrofóbicos situados entre las dos hélices- $\alpha$  y mayor es la estabilidad térmica de las frataxinas [Adinolfi, 2004].

### 1.1.3. Capacidad de unión a cationes metálicos

Es sabido que muchas de las funciones biológicas de las frataxinas están ligadas a su capacidad de unión al hierro ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) y a otros cationes divalentes con una estequiometría y una afinidad variables. Estudios de RMN junto con estudios de mutagénesis han demostrado que los residuos ácidos de la región de la hélice- $\alpha_1$  y la hebra  $\beta_1$  constituyen la zona de unión a los cationes metálicos [Cook,

2006; Bencze, 2007; Correia, 2010]. La unión de los cationes a la proteína es de tipo electrostático, por lo que los residuos cisteína e histidina no participan, hecho que sí ocurre en la mayoría de proteínas que enlazan cationes metálicos de forma específica [Adinolfi, 2002].

La unión de las frataxinas al catión  $Fe^{2+}$  ocurre con una estequiometría 1:2 en las frataxinas de bacteria y de levadura, y 1:7 en la humana. Sin embargo, a concentraciones elevadas del catión metálico, la Yfh1 es capaz de enlazar un mayor número de iones por monómero. Además, mediante calorimetría de valoración isoterma (ITC) se ha podido determinar que las constantes de disociación globales para CyaY y Yfh1 son similares ( $\sim 4$  y  $3 \mu M$ ) [Bou-Abdallah, 2004; Cook, 2006], mientras que la de la Hfra es mucho más elevada ( $55 \mu M$ ) (Tabla 1) [Yoon, 2003].

Los estudios de ITC también han permitido estudiar la unión de la frataxina de bacteria y la humana al catión  $Fe^{3+}$ . La Hfra presenta la misma estequiometría para el  $Fe^{3+}$  que para el  $Fe^{2+}$ , pero su afinidad es mayor ( $K_{d(global)} \sim 10 \mu M$ ) [Yoon, 2003]. La CyaY también es capaz de enlazar  $Fe^{3+}$  con una estequiometría 1:7, aunque existen sitios de unión de menor afinidad con los que la proteína llega a enlazar hasta 25 iones  $Fe^{3+}$  por monómero [Bou-Abdallah, 2004]. Asimismo, mediante experimentos de atenuación de fluorescencia, se ha demostrado que la Yfh1 es capaz de enlazar  $Fe^{3+}$  con una estequiometría de 1:1 y una constante de disociación de  $\sim 30 \mu M$  [Han, 2017].

A su vez, se ha observado que la Yfh1 puede enlazar dos cationes  $Cu^{2+}$  por unidad monomérica con constantes de disociación de 0,13 y  $310 \mu M$  y un único catión  $Cu^+$  con una constante de disociación de  $0,032 \mu M$ . Además, la Yfh1 interacciona con el  $Mn^{2+}$ , formando dos complejos con constantes de disociación de 0,04 y  $0,4 \mu M$  [Han, 2017]. También se ha comprobado que la CyaY, además de interactuar con iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , es capaz de enlazar otros cationes divalentes, como  $Cu^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , y lantánidos trivalentes, aunque la estequiometría y las constantes de disociación no han sido descritas [Nair, 2004].

**Tabla 1.** Estequiometría (n) y constantes de disociación ( $K_d$ ) determinadas por fluorescencia o ITC para la interacción de las frataxinas con el hierro y el cobre.

Homólogo	Catión metálico	n	$K_d$ ( $\mu M$ )	Referencia
CyaY	$Fe^{2+}$	1:2	$3,80^b$	[Bou-Abdallah, 2004]
Yfh1		$1:2^a$	$3,00 / 2,00$	[Cook, 2006]
Hfra		1:7	$55,0^b$	[Yoon, 2003]
CyaY	$Fe^{3+}$	$1:7^a$	-	[Bou-Abdallah, 2004]
Yfh1		1:1	29,4	[Han, 2017]
Hfra		1:7	$11,0^b$	[Yoon, 2003]
Yfh1	$Cu^+$	1:1	0,032	[Han, 2017]
Yfh1	$Cu^{2+}$	1:2	$0,13 / 310$	[Han, 2017]

<sup>a)</sup> La estequiometría indicada en esta tabla solo incluye los sitios de unión de mayor afinidad, aunque es sabido que la CyaY y la Yfh1 son capaces de enlazar un mayor número de cationes  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{2+}$ , respectivamente. <sup>b)</sup> El valor de las constantes de disociación indicadas hace referencia al valor de una constante aparente que engloba todos los sitios de unión del catión metálico a la proteína.

### 1.1.4. Tendencia a oligomerizar

Otra diferencia en el comportamiento de los homólogos de frataxina es su tendencia a formar oligómeros. En ausencia de cationes metálicos, cualquiera de las tres frataxinas (CyaY, Yfh1 y Hfra) se encuentra en forma monomérica soluble. Sin embargo, en condiciones aeróbicas y en presencia de exceso de  $\text{Fe}^{2+}$  (1:20), la frataxina de bacteria y la de levadura oligomerizan [Adamec, 2000; Gakh, 2002].

Estudios de mutagénesis han demostrado que los residuos conservados de la región situada entre la hélice- $\alpha_1$  y la hebra  $\beta_1$  son esenciales en el proceso de oligomerización. Así, la sustitución de residuos importantes para la unión del hierro por otros cargados positivamente inhibe la oligomerización de las frataxinas, lo que indica que el proceso debe tener naturaleza electrostática, en la que los iones  $\text{Fe}^{2+}$  actúan como puente de unión entre los distintos monómeros [Adinolfi, 2002]. Además, la oligomerización promovida por el hierro en la CyaY y la Yfh1 se inhibe al incrementar la fuerza iónica o añadiendo especies quelantes, lo que indica que la unión es muy débil y que en condiciones fisiológicas probablemente habrá un pequeño porcentaje de frataxina en forma oligomérica [Adinolfi, 2002; Cook, 2006].

En el caso de la frataxina humana, la oligomerización solo se ha observado en la forma Hfra<sup>56-210</sup>. Bajo las mismas condiciones, la forma madura Hfra<sup>81-210</sup> mantiene su estado monomérico o precipita, pero no forma oligómeros, lo que indica que los residuos adicionales del extremo N-terminal son esenciales en el proceso de oligomerización [O'Neill, 2005; Ahlgren, 2017]. Además, la sustitución de residuos no conservados en la CyaY como Glu<sup>18</sup>, Glu<sup>19</sup>, Asp<sup>22</sup> y Glu<sup>33</sup> por los correspondientes en la Hfra ha mostrado ser suficiente para inhibir la oligomerización, lo que explicaría el diferente comportamiento de la Hfra respecto a los demás homólogos [Adinolfi, 2002].

## 1.2. Función de la frataxina

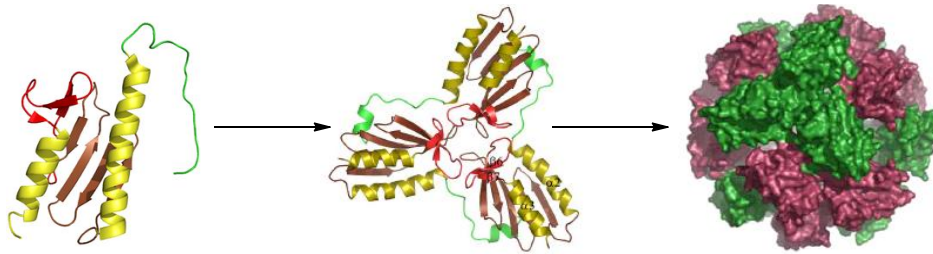
Existen evidencias experimentales que demuestran que la frataxina participa en la homeostasis del hierro en la célula. A pesar de ello, su función concreta sigue sin conocerse, ya que su deficiencia genera fenotipos bastante complicados, lo que parece indicar que la frataxina lleva a cabo más de una función en la célula [Bencze, 2006].

Estudios recientes han demostrado que organismos con niveles bajos de frataxina presentan alteraciones asociadas a la acumulación de hierro en las mitocondrias y una reducida actividad de enzimas que contienen clústers hierro-azufre (Fe-S) [Bencze, 2006; Lupoli, 2017]. Debido a ello, se ha propuesto que la frataxina podría actuar como proteína de almacenamiento de hierro y como chaperona de hierro en la biosíntesis de clústers Fe-S [Adamec, 2000; Puccio, 2001; Ramazzotti, 2004]. Además, se ha comprobado que la deficiencia de frataxina da lugar a una disfunción en la respiración mitocondrial, por lo que la proteína podría tener un papel como chaperona de hierro en la biosíntesis de grupos hemo y en la fosforilación oxidativa [Ristow, 2000; Yoon, 2004; González-Cabo, 2005].

### 1.2.1. Frataxina como proteína de almacenamiento de hierro

La primera hipótesis acerca de la función de la frataxina fue sugerida por Adamec y col. después de comprobar que la Yfh1 era capaz de unirse al hierro y formar oligómeros [Adamec, 2000]. El proceso de oligomerización de la Yfh1 sigue la progresión  $n_1 \rightarrow n_3 \rightarrow n_{24}$  (Figura 4), donde el paso del monómero (n) al trímero ( $n_3$ ) es la etapa limitante. En este proceso, la oligomerización está impulsada por dos

reacciones de oxidación consecutivas. En primer lugar, la proteína forma trímeros que, por medio de la acción de los residuos His<sup>74</sup>, Asp<sup>78</sup>, Asp<sup>79</sup>, Asp<sup>82</sup> y His<sup>83</sup>, catalizan la oxidación del Fe<sup>2+</sup>, utilizando O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidantes. Posteriormente, se produce la fusión de los trímeros para formar multímeros de orden superior, los cuales son capaces de enlazar más de 50 iones de hierro por monómero, manteniéndolo soluble y estable en forma de Fe<sup>3+</sup> [Gakh, 2002]. Además, estudios estructurales de los oligómeros que forma la Yfh1 han demostrado un mecanismo de cierre y apertura a través de cambios conformacionales, hecho que permitiría tanto la liberación del hierro a otras proteínas, como la entrada del mismo a los multímeros [Karlberg, 2006].



**Figura 4.** Proceso de formación de oligómeros de Yfh1 donde aparecen representadas las estructuras del monómero y de los oligómeros formados por 3 y 24 unidades, las cuales fueron propuestas por Karlberg y col. en base a los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica [Karlberg, 2006].

Las similitudes en la formación de oligómeros de Yfh1 con el comportamiento descrito para la ferritina fue determinante a la hora de sugerir que la frataxina puede actuar como proteína de almacenamiento de hierro. Sin embargo, el hecho de que ciertos cationes, como el magnesio o el calcio, inhiban la oligomerización o que la Hfra solo oligomerice en su forma Hfra<sup>56-210</sup> ha hecho que la función biológica de la frataxina como almacenadora de hierro no esté clara, al menos en humanos [Pandolfo, 2009].

### 1.2.2 Frataxina como proteína chaperona de hierro

Otra posible función de la frataxina es su capacidad para actuar como chaperona de hierro en dos procesos fundamentales para el organismo: la biosíntesis de clústers Fe-S y la biosíntesis de grupos hemo.

La participación de la frataxina en la formación de clústers Fe-S fue sugerida tras observar una disminución de la actividad de las enzimas que dependen de estos clústers en organismos con deficiencia de frataxina [Foury, 1999; Puccio, 2001]. Las enzimas Fe-S participan en numerosos procesos celulares como por ejemplo el transporte de electrones en la cadena respiratoria. En eucariotas, los clústers Fe-S se construyen en las mitocondrias a través de una maquinaria proteica muy conservada. La frataxina está relacionada con las etapas iniciales de la biosíntesis de estos clústers, ya que se cree que libera hierro a Isu1p, una proteína clave en el ensamblaje de los clústers Fe-S. De hecho, evidencias experimentales han demostrado la interacción entre Yfh1 e Isu1p [Ramazzotti, 2004]. De igual manera, se ha comprobado que Yfh1 interacciona con la aconitasa mitocondrial, una enzima que participa en el ciclo de Krebs, lo que sugiere que la frataxina también podría actuar como chaperona facilitando la transferencia de Fe<sup>2+</sup> al clúster [3Fe-4S]<sup>+</sup> de la aconitasa dañada, lo que implicaría la reactivación de esta enzima [Bulteau, 2004].

De forma alternativa, Pastore y col., en base a un estudio con CyaY de *E. coli*, propusieron que la frataxina actúa como sensor de la concentración de hierro en las mitocondrias, regulando la velocidad de síntesis de los clústers Fe-S [Adinolfi, 2009].

Por otro lado, se ha propuesto que la frataxina puede actuar como chaperona de hierro en la biosíntesis de grupos hemo, ya que la ausencia de la proteína da lugar a deficiencias en algunos citocromos. En este proceso, la frataxina catalizaría la inserción de  $\text{Fe}^{2+}$  en el anillo porfirínico, dando lugar a un grupo hemo funcional. Esta etapa también involucra la ferroquelatasa, una proteína asociada a la membrana interna de las mitocondrias que interacciona tanto con la Yfh1 como con la Hfra [Lesuisse, 2003; Yoon, 2004].

### **1.2.3 Papel de la frataxina en la fosforilación oxidativa**

Además de las hipótesis anteriores, se ha sugerido que la frataxina también es capaz de actuar como activador de la fosforilación oxidativa.

Está demostrado que la sobreexpresión de Hfra en adipocitos humanos incrementa el transporte de electrones, el potencial de membrana y la producción de ATP [Ristow, 2000], lo que podría explicar el hecho de que pacientes con FRDA presenten una menor producción de ATP en los músculos esqueléticos [Lodi, 1999] y que levaduras con bajos niveles de Yfh1 presenten defectos en la respiración [Rötig, 1997].

Adicionalmente, la interacción de la frataxina con la succinato deshidrogenasa sugiere que la proteína podría estar relacionada con la entrada de electrones en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias [González-Cabo, 2005].

## **1.3. Efecto de la frataxina sobre el estrés oxidativo**

### **1.3.1. Estrés oxidativo: origen y descripción de las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

En condiciones normales y como consecuencia del metabolismo aeróbico de las células, se generan especies químicas altamente reactivas. Los más conocidos son los radicales libres, que son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, aunque también existen otras especies reactivas no radicalarias [Birben, 2012]. Estas especies, a bajas concentraciones, tienen funciones biológicas importantes, como la señalización celular o la defensa inmunitaria. Sin embargo, cuando se encuentran en exceso pueden causar grandes daños a la célula debido a sus reacciones directas sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, hecho que puede acabar derivando en patologías como la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la diabetes o el envejecimiento [Valko, 2007].

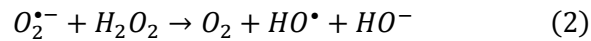
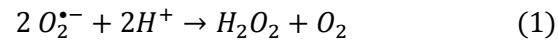
Junto con las especies reactivas, los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas antioxidantes que equilibran la producción y destrucción de las moléculas oxidantes. Cuando el balance entre las especies reactivas y los antioxidantes se desequilibra a favor de los primeros, se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan a partir del oxígeno molecular y representan la clase más abundante en los sistemas biológicos. Entre las ROS se pueden encontrar formas radicalarias y no radicalarias, entre las que destacan el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

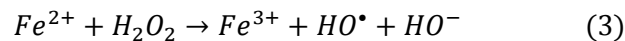
El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se genera tras la adición de un electrón al oxígeno molecular y es considerado una ROS primaria, a partir de la cual se generan otras ROS, ya sea por interacción directa con otras moléculas o mediante procesos catalizados por metales o enzimas. La producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tiene lugar, de forma

mayoritaria, en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias. Además, la acción de los sistemas enzimáticos NADPH y xantina oxidasa también produce esta especie reactiva.

En condiciones fisiológicas, el  $O_2^{\bullet-}$  se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno por la acción de las superóxido dismutasas (SODs), que catalizan la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  (Ecuación 1) [McCord, 2001]. Adicionalmente, el  $O_2^{\bullet-}$  puede reaccionar con el  $H_2O_2$  generando el radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss (Ecuación 2).



Por otro lado, en presencia de metales de transición reducidos, como el cobre o el hierro, el radical hidroxilo puede generarse a partir del  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton (Ecuación 3) [Birben, 2012].



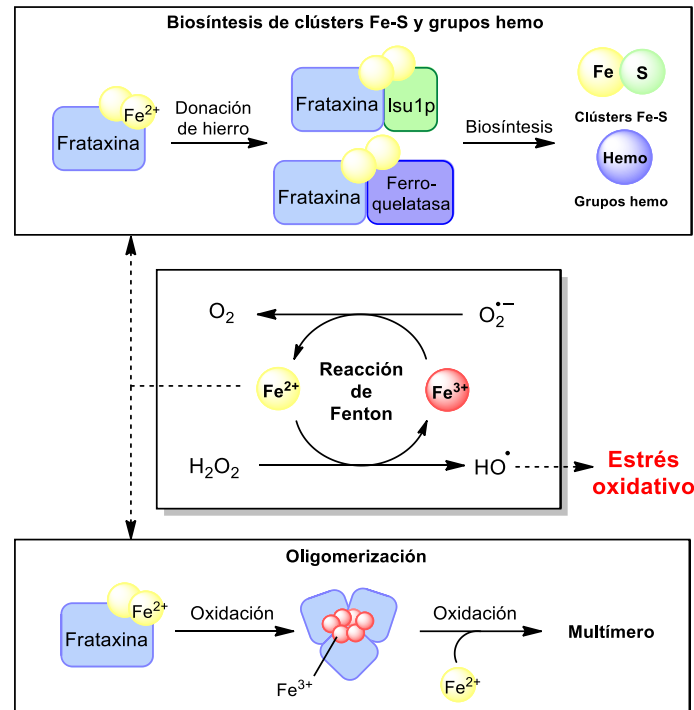
### 1.3.2. Frataxina como agente antioxidante

A día de hoy, la relación entre el estrés oxidativo y la función de la frataxina es un tanto controvertida. *In vivo*, niveles bajos de frataxina dan lugar a un incremento del estrés oxidativo, siendo éste uno de los factores que causa el daño celular de los pacientes que sufren FRDA [Lupoli, 2017]. Adicionalmente, estudios llevados a cabo en humanos y en levaduras han demostrado que la sobreexpresión de frataxina incrementa la tolerancia de las células a las condiciones de estrés oxidativo, al aumento de las concentraciones de hierro o a la presencia de  $H_2O_2$  [Runko, 2008]. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo por el que la frataxina es capaz de regular la concentración de ROS en la célula.

En bacterias y en levaduras, el proceso de oligomerización podría explicar cómo la frataxina es capaz de mantener el balance oxidativo. De acuerdo al mecanismo propuesto por Adamec y col., la presencia de  $Fe^{2+}$  y oxígeno induciría la oligomerización, reduciendo la concentración de  $Fe^{2+}$  libre en las mitocondrias y, a su vez, la formación de ROS a través de la reacción de Fenton [Adamec, 2000]. De hecho, estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de Yfh1 o CyaY inhibe la producción de  $HO^{\bullet}$  [Park, 2002; Ding, 2007]. Mientras que en humanos, si los oligómeros observados con la forma Hfra<sup>56-210</sup> de la frataxina existieran *in vivo*, también podrían ser los responsables de proteger la célula frente al daño oxidativo [O'Neill, 2005]. De igual manera, la utilización del  $Fe^{2+}$  para la biosíntesis de los clústers Fe-S y de los grupos hemo, mediante la acción de la frataxina, disminuiría la concentración del catión metálico libre en la matriz mitocondrial (Figura 5) [Pandolfo, 2009].

Adicionalmente, los estudios que demuestran que la frataxina interacciona con la aconitasa mitocondrial refuerzan la idea de que la proteína pueda actuar como agente antioxidante, aunque sea de forma indirecta. La actividad reducida de la aconitasa hace que se incremente la transcripción del mecanismo que introduce hierro en la mitocondria con el objetivo de reparar los clústers  $[3Fe-4S]^+$  de la enzima dañados por oxidación [Chen, 2004]. La liberación de  $Fe^{2+}$  desde la frataxina a la aconitasa para reparar sus clústers Fe-S reduciría la entrada de hierro en la mitocondria, disminuyendo la probabilidad de que el metal pueda acumularse e inhibiendo la formación de ROS [Bencze, 2006].





**Figura 5.** Esquema de las funciones propuestas para la frataxina, en el que se describe el proceso de formación de los clústers Fe-S y de los grupos hemo, así como el proceso involucrado en la oligomerización de la proteína. Además, se puede ver como la disminución en la concentración de  $Fe^{2+}$ , utilizado por la frataxina en los procesos descritos anteriormente, daría como resultado una menor producción del radical  $HO^\bullet$ , lo que reduciría la probabilidad de que la célula sufriera estrés oxidativo. Adaptación de [Lane, 2010].

## 1.4. Enfermedad de Parkinson y su relación con la $\alpha$ -sinucleína y la frataxina

### 1.4.1. Aspectos generales de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es uno de los desórdenes neurodegenerativos de mayor incidencia en la sociedad, con una prevalencia de un 2% en las personas mayores de 65 años [Cacabelos, 2017].

La EP se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro y por la consecuente disminución en la producción de dopamina, un neurotransmisor que actúa en el cerebro y en las células nerviosas [Wirdefeldt, 2011]. En la sustancia negra del cerebro se originan las señales del movimiento voluntario que son dirigidas hacia el área motora de la corteza cerebral mediante procesos sinápticos accionados por la dopamina. En la EP, la disminución de la concentración de dopamina hace que estas señales queden inhibidas, alterando el control de los movimientos voluntarios sobre los músculos [Hamani, 2003]. Debido a ello, los pacientes con EP suelen presentar temblores, bradicinesia, acinesia, rigidez muscular e inestabilidad postural [Dawson, 2003].

Adicionalmente, estudios *post mortem* de cerebros de pacientes que han padecido la EP revelan la presencia de inclusiones neuronales conocidas como “cuerpos de Lewy” formadas principalmente por agregados insolubles de la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn) [Baba, 1998]. Estas inclusiones alteran la función normal del cerebro, interfiriendo en los procesos de tráfico de las neuronas, alterando membranas y secuestrando proteínas [Valko, 2007; Shults, 2006].





oxidación de dopamina (una fuente importante de ROS) y la respuesta de enzimas antioxidantes [Béraud, 2013]. De hecho, las neuronas en las que no se expresa la proteína presentan un incremento en la producción de ROS y son más susceptibles al daño oxidativo [Musgrove, 2013].

Estudios *in vitro* también han demostrado que la formación del complejo  $\alpha$ -Syn/Cu<sup>2+</sup> inhibe la formación de ROS debido a la disminución de la concentración del catión metálico libre en disolución. A su vez, se ha comprobado que la  $\alpha$ -Syn monomérica presenta una alta eficacia *in vitro* secuestrando radicales HO<sup>•</sup>, lo que indicaría una elevada susceptibilidad de la proteína a modificar su función y su estructura en presencia de ROS [Pedersen, 2016].

#### 1.4.2.2 Capacidad de unión a cationes metálicos

La  $\alpha$ -Syn puede formar complejos con cationes de elementos como Al, Ca, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn o Zn [Breydo, 2012]. Sin embargo, el papel de la  $\alpha$ -Syn como agente quelante no está todavía claro. A pesar de ello, se sabe que su unión a cationes metálicos induce cambios conformacionales y promueve su agregación [Paik, 1999], por lo que estos cationes constituyen un factor de riesgo en la EP, al estimular la formación de cuerpos de Lewy. Además, dado que el estrés oxidativo podría estar involucrado en la EP, el efecto de iones metálicos con actividad redox sobre la  $\alpha$ -Syn (como el cobre o el hierro) ha sido uno de los aspectos más estudiados [Wirdefeldt, 2011].

Experimentos de ITC y de RMN han demostrado que la  $\alpha$ -Syn presenta tres sitios independientes de unión al Cu<sup>2+</sup> (Tabla 2). El de mayor afinidad ( $K_d < 1 \mu\text{M}$ ) se encuentra entre los residuos Val<sup>3</sup>-Ser<sup>9</sup> y es seguido por los sitios de unión situados entre los residuos Val<sup>48</sup>-Val<sup>52</sup> ( $K_d \approx 50 \mu\text{M}$ ) y Asp<sup>119</sup>-Ala<sup>124</sup> ( $K_d \approx 1 \text{ mM}$ ) [Binolfi, 2008; Binolfi, 2010; Ranjan 2017]. Adicionalmente, se ha comprobado que la  $\alpha$ -Syn enlaza Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> con una estequiometría 1:1, aunque los sitios de unión no se han descrito [Peng, 2010].

**Tabla 2.** Estequiometría (n =  $\alpha$ -Syn:ion) y constantes de disociación ( $K_d$ ) determinadas por ITC para la interacción de la  $\alpha$ -Syn con el hierro y el cobre.

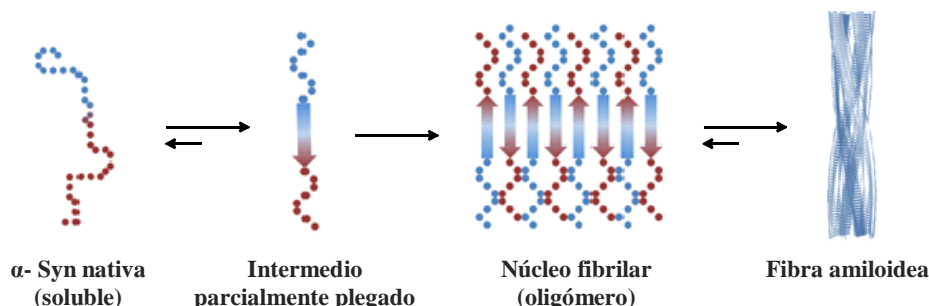
Catión metálico	n	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	Referencia
Fe <sup>2+</sup>	1:1	170	[Peng, 2010]
Fe <sup>3+</sup>	1:1	< 0,01	[Peng, 2010]
Cu <sup>2+</sup>	1:3	0,20 ( $K_{d1}$ )	[Binolfi, 2008]
		50,0 ( $K_{d2}$ )	
		1000 ( $K_{d3}$ )	

#### 1.4.2.3 Agregación de la $\alpha$ -sinucleína y su implicación patológica

Las neuronas de pacientes con EP presentan diferentes tipos de agregados como cuerpos de Lewy, neuritas de Lewy y depósitos esféricos en los axones [Giasson, 2001]. La  $\alpha$ -Syn es el componente mayoritario de los cuerpos de Lewy [Spillantini, 1997], tanto en forma de fibras amiloideas como de oligómeros [Hashimoto, 1998; Wang, 2016].

El mecanismo de formación de los agregados de  $\alpha$ -Syn se inicia a partir del monómero, el cual puede sufrir cambios conformacionales que dan lugar a especies intermedias parcialmente plegadas [Uversky, 2001]. Estas especies actúan como moldes para el ensamblaje de otros monómeros,

formando oligómeros solubles. Posteriormente, dichos oligómeros sufren un crecimiento que tiene como resultado la formación de fibras amiloides (Figura 7) [Wood, 1999; Poirier, 2002].



**Figura 7.** Esquema del proceso de formación de agregados que sufre la  $\alpha$ -Syn. Adaptación de [Cox, 2014].

Estudios de difracción de rayos X de fibras de  $\alpha$ -Syn muestran un patrón estructural característico que consiste en la formación de láminas  $\beta$  colocadas de forma perpendicular al eje longitudinal de la fibra [Serpell, 2000]. Estas láminas  $\beta$  están formadas principalmente por 12 aminoácidos ( $^{71}$ VTGVTAVAQKTV $^{82}$ ) del segundo dominio de la secuencia de la  $\alpha$ -Syn [Giasson, 2001].

Las mutaciones Ala $^{30}$ Pro y Glu $^{46}$ Lys aceleran la formación de oligómeros y fibras [Ono, 2011], induciendo el desarrollo de la EP. Además, otros factores endógenos y exógenos como metales, pesticidas, modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína, pueden facilitar la formación de agregados [Deleersnijder, 2013]. Asimismo, estudios *in vitro* han demostrado que las condiciones asociadas al estrés oxidativo promueven la agregación de la  $\alpha$ -Syn [Hashimoto, 1999] debido a la alta capacidad de la proteína captando radicales HO $^{\bullet}$  [Pedersen, 2016].

### 1.4.3. Papel de la frataxina como agente antioxidante en la enfermedad de Parkinson

Debido a la disminución de los niveles de dopamina que sufren los pacientes con EP, el tratamiento más eficaz contra los síntomas de la EP se ha basado en administrar fármacos que suplan la deficiencia del neurotransmisor, ya sea en forma de agonistas o en forma de precursor, como es la “levodopa” [Rascol, 2002].

Con la progresión de la enfermedad y el uso prolongado de fármacos, los pacientes responden menos a los medicamentos y comienzan a desarrollar fluctuaciones en sus respuestas. Además, con el uso crónico de los mismos, surgen una serie de efectos adversos que conducen a alteraciones cognitivas, psiquiátricas y gastrointestinales que limitan de forma considerable el tratamiento sintomático de la EP [Hamani, 2003].

De acuerdo a la aceptación general de que el estrés oxidativo puede ser una de las causas más relevantes de la EP, se ha propuesto que el uso de antioxidantes puede ser una nueva estrategia para paliar la enfermedad [Valko, 2007]. El principal problema es que los fármacos deben atravesar la barrera hematoencefálica para llegar a la zona afectada [Kim, 2012].

La frataxina está asociada con la homeostasis del hierro y la biosíntesis de clústers Fe-S en la célula y se ha visto que su sobreexpresión conduce a una mayor tolerancia a las condiciones de estrés oxidativo, prolongando la vida de las células [Runko, 2008]. Debido a ello, se ha propuesto como candidata a ser utilizada como terapia de las enfermedades relacionadas con las ROS, incluida la EP.

Algunos estudios han demostrado que la frataxina unida a un péptido de tipo CPP (del inglés *Cell-penetrating peptide*) es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y de proteger las neuronas dopaminérgicas del estrés oxidativo [Britti, 2018; Kim, 2012]. Además, estudios en los que se trabajó con células transfectadas con la frataxina madura, sin la secuencia de importación a la matriz mitocondrial, han demostrado que no es necesario que la frataxina se encuentre en las mitocondrias para mantener el balance oxidativo de la célula, sino que también ocurre cuando la proteína permanece en el citoplasma [Condò, 2006]. Por tanto, esto sugiere que la frataxina puede tener un papel fundamental en la protección del estrés oxidativo y prevenir la oxidación de otras proteínas como la  $\alpha$ -Syn, disminuyendo el riesgo de desarrollar EP.

## 2. OBJETIVO

Dado que la sobreexpresión de frataxina da lugar a una mayor tolerancia a las condiciones de estrés oxidativo y teniendo en cuenta que el mecanismo mediante el cual la proteína actúa como antioxidante no está establecido, en este trabajo de fin de máster se pretende estudiar la capacidad antioxidante de la frataxina humana y compararla con la de su homólogo procedente de levadura. Adicionalmente, y en base a la utilización reciente de la frataxina como terapia contra la EP, en este trabajo también se estudiará si se produce algún tipo de interacción entre la frataxina y la  $\alpha$ -sinucleína y se analizará si existe algún efecto protector o beneficioso más allá de dicha interacción.

Para conseguir el objetivo global propuesto, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Producir, purificar y caracterizar la  $\alpha$ -Syn.
- Determinar la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para inhibir la formación de las especies reactivas de oxígeno  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Determinar la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para secuestrar  $\text{HO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .
- Determinar si la capacidad de secuestro e inhibición de la formación de ROS se ve alterada por la presencia conjunta de frataxina y  $\alpha$ -Syn en el medio.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de las empresas comerciales Sigma-Aldrich, Scharlau, ACROS Organics y ThermoFisher. La  $\alpha$ -Syn fue producida siguiendo la metodología descrita en esta memoria y las frataxinas (Hfra y Yfh1) se encontraban a disposición del grupo de investigación en *Reactividad Molecular y diseño de fármacos* (ReacMol) de la Univesitat de les Illes Balears, donde he desarrollado mi trabajo de fin de máster.

#### 3.1.2. Disoluciones tampón

Las disoluciones tampón (DT) utilizadas en este trabajo se indican a continuación:

- DT1: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, pH 8,0.
- DT2: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- DT3: Tris-HCl 10 mM, NaCl 600 mM, pH 7,4.
- DT4: Tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.
- DT5: Tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM, pH 7,4.

Estas disoluciones se prepararon con agua milli-Q, obtenida mediante el sistema de purificación Milli-Q® de Millipore Corporation, y se utilizó ácido clorhídrico o hidróxido sódico para ajustar el pH, el cual fue medido con un pH-metro digital Crison modelo Basic 20+ equipado con un electrodo de vidrio Crison modelo 5029. Las disoluciones obtenidas se filtraron mediante un filtro de membrana de nailon con un diámetro de poro de 45  $\mu\text{m}$  y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

### 3.2. Métodos experimentales

#### 3.2.1. Producción, purificación y caracterización de la $\alpha$ -sinucleína

Para la producción de la  $\alpha$ -Syn se utilizó una cepa de bacterias *E. coli* modificada genéticamente con un plásmido que incluía la secuencia de nucleótidos que codifican para la  $\alpha$ -Syn humana y otra para una  $\beta$ -lactamasa que aporta a las células resistencia a la ampicilina. El cultivo celular se realizó en 20 mL del medio de cultivo *Luria Bertani* (LB) (25 g/L) previamente esterilizado, en el que se añadió una alícuota de unos 2-5  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de la cepa bacteriana y 400  $\mu\text{L}$  de una disolución de ampicilina (5 mg/mL). Esta mezcla se incubó durante 12h a 37°C y 180 rpm. La suspensión celular resultante se adicionó a 1L de medio LB que contenía ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó a 37°C y 180 rpm hasta que la mezcla alcanzó una densidad óptica a 600 nm superior a 0,6. A continuación, se adicionó 1 mL de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M con el fin de inducir la expresión de la proteína y se incubó durante 4h a 37°C y 180 rpm. Una vez transcurrido el tiempo indicado, las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación (15 min, 4°C, 4000 rpm) y el pellet resultante se resuspendió en DT1 mediante agitación durante 1h en un baño de hielo. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular sonicando la suspensión anterior durante 2 min. La mezcla resultante se centrifugó 20 min a 4°C y 10 Kxg con el fin de descartar el precipitado (P1) y recuperar el sobrenadante (S1). Seguidamente, se añadió sulfato de estreptomina a S1 hasta alcanzar una concentración del 1% (m/v) y se agitó durante 15 min en un baño de hielo con el fin de precipitar los ácidos nucleicos (P2).

La mezcla obtenida se centrifugó durante 30 min a 4°C y 13,5 Kxg y se recuperó el sobrenadante (S2), al que se añadió sulfato de amonio hasta una concentración de 0,295 g/mL y se agitó durante 1h en un baño de hielo para precipitar la  $\alpha$ -Syn producida (P3). A continuación, se centrifugó la mezcla durante 30 min a 4°C y 13,5 Kxg y se descartó el sobrenadante (S3). Por último, la  $\alpha$ -Syn obtenida se disolvió en un volumen de DT2 igual a 1/20 veces el volumen inicial de medio LB y la disolución se filtró a través de un filtro de membrana de nailon con un diámetro de poro de 45  $\mu$ m.

La  $\alpha$ -Syn producida se purificó utilizando un equipo cromatográfico GE ÄKTA Start equipado con una columna de intercambio aniónico GE Healthcare RESOURCE™ Q de 6 mL y un colector de fracciones. Para llevar a cabo la elución se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 600 mM utilizando dos disoluciones tampón diferentes (DT2 y DT3) con un flujo de 4 mL/min. El método de detección utilizado fue la espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm.

Las fracciones de  $\alpha$ -Syn obtenidas durante la purificación se juntaron y la muestra se concentró, utilizando tubos equipados con una membrana de 5000 Da como peso molecular de corte y centrifugando repetidas veces a 4°C y 4 Kxg. Posteriormente, la disolución obtenida se dializó en DT4 y se determinó la concentración de  $\alpha$ -Syn midiendo la absorbancia a 280 nm, sabiendo que el coeficiente de absorción molar de la proteína a esa longitud de onda es 5960 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, de acuerdo al valor determinado a partir de su secuencia primaria mediante la plataforma on-line ExpASy-ProtParam [Gasteiger, 2005].

El grado de pureza de la  $\alpha$ -Syn se comprobó usando SDS-PAGE y MALDI-TOF/TOF, mientras que la masa exacta se determinó usando un espectrómetro de masas Q-Exactive Orbitrap de alta resolución equipado con una sonda de ionización por electroespray de alta temperatura (HESI) (Thermo Fisher). Para la electroforesis SDS-PAGE se utilizaron geles BIORAD Mini-PROTEAN® TGX™. En cada uno de los pocillos se añadieron 15  $\mu$ L de las alícuotas recogidas en el proceso de producción y purificación de la  $\alpha$ -Syn, las cuales se trataron previamente con Laemmi/DTT. La electroforesis se llevó a cabo a 200V durante 30 min y los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

### 3.2.2. Estudio de la degradación del ácido ascórbico

Las cinéticas de degradación del ácido ascórbico (AA), un antioxidante que se encuentra a elevadas concentraciones en las neuronas (~10 mM) [Covarrubias-Pinto, 2015], se estudiaron en ausencia y en presencia de cationes metálicos mediante espectroscopía UV-Vis, ya que el AA absorbe en la región UV, mostrando su máximo de absorción a 265 nm. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC de doble haz equipado con un termostato que mantuvo la temperatura a 25°C y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

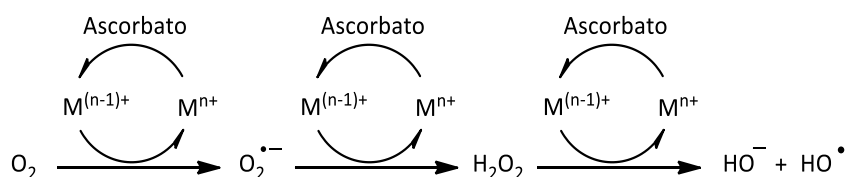
#### 3.2.2.1. En ausencia de cationes metálicos

La cinética de degradación del AA en ausencia de cationes metálicos se estudió mediante un conjunto de experimentos en los que se registró la variación de la absorbancia a 265 nm durante 90 minutos. Los experimentos se realizaron utilizando disoluciones tampón que presentaban diferente concentración de fosfato total (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (5, 10, 20 y 50 mM) y de NaCl (0, 50, 100, 150 y 200 mM). Además, se realizó un experimento en el que se siguió la degradación del AA en DT4 en presencia de EDTA (5  $\mu$ M). En los experimentos se utilizó una concentración inicial de AA de 70  $\mu$ M. Todos ellos se realizaron por triplicado.

Para llevar a cabo el estudio, se preparó a diario una disolución madre de AA 4 mM en agua milli-Q que se conservó a 4°C en un recipiente ámbar para evitar su degradación mediante reacciones fotoinducidas [Tikekar, 2011]. Además, se preparó una disolución de EDTA-Na<sub>2</sub> (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·2H<sub>2</sub>O) 100 μM en DT4.

### 3.2.2.2. En presencia de Cu<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>

El AA en condiciones aeróbicas y en presencia de cationes metálicos se degrada desencadenando una cascada de reacciones (Esquema 1) en las que se generan las ROS: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HO<sup>•</sup> [Harel, 1994]. Debido a ello, se decidió estudiar la degradación del AA catalizada por los cationes Cu<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> en ausencia y en presencia de Hfra, Yfh1 y α-Syn, lo que permitió evaluar la capacidad inhibitoria de estas proteínas sobre la degradación mencionada.



**Esquema 1.** Reacciones de formación de especies reactivas de oxígeno durante la degradación del ácido ascórbico catalizada por cationes metálicos.

Para llevar a cabo el estudio, se prepararon disoluciones 100 μM de CuCl<sub>2</sub> y 100 μM de FeCl<sub>3</sub> en DT4, a partir de disoluciones madre 20 mM preparadas utilizando como disolvente una disolución 40 mM de glicina en agua. Este procedimiento se adoptó para evitar la formación de hidróxidos insolubles al añadir los cationes al tampón DT4 [Pedersen, 2016]. Además, se preparó una disolución madre de AA 4 mM en agua milli-Q y una disolución de EDTA-Na<sub>2</sub> 100 μM en DT4.

Las cinéticas de degradación del AA se adquirieron por triplicado, registrando la absorbancia de la disolución a 265 nm durante 150 min. Las mezclas de reacción utilizadas en estos experimentos se prepararon en DT4 y contenían: I) AA 70 μM; II) AA 70 μM + M<sup>n+</sup> 2,5 μM; III) AA 70 μM + M<sup>n+</sup> 2,5 μM + x μM de Hfra, Yfh1 o α-Syn; IV) AA 70 μM + M<sup>n+</sup> 2,5 μM + x μM de frataxina (Hfra o Yfh1) + 10 μM α-Syn; V) AA 70 μM + 10 μM de Hfra o α-Syn y VI) AA 70 μM + M<sup>n+</sup> 2,5 μM + EDTA 5 μM.

### 3.2.3. Estudio de la formación de especies radicalarias

La formación de radicales procedentes de la degradación del AA catalizada por cationes metálicos se estudió registrando la disminución temporal en la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína debida a la oxidación del fluoróforo [Ou, 2002; Ahmad, 2008]. Para ello, se preparó una disolución madre de fluoresceína 2 mM en DT4 y se añadió a las mezclas de reacción hasta una concentración final de 26 μM. Las mezclas de reacción contenían AA 70 μM solo o en presencia de Cu<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup> 2,5 μM. Además, se prepararon en presencia de α-Syn (0,5 y 10 μM), Hfra (0,5 y 10 μM), Yfh1 (0,5 y 10 μM), α-Syn + Hfra (0,5/0,5 μM y 10/10 μM) y α-Syn + Yfh1 (0,5/0,5 μM). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado a 25°C, utilizando un fluorímetro *Varian Cary Eclipse* y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En todos ellos, se midió la variación en la intensidad de fluorescencia a 518 nm (λ<sub>ex</sub> 490 nm) durante 150 min.

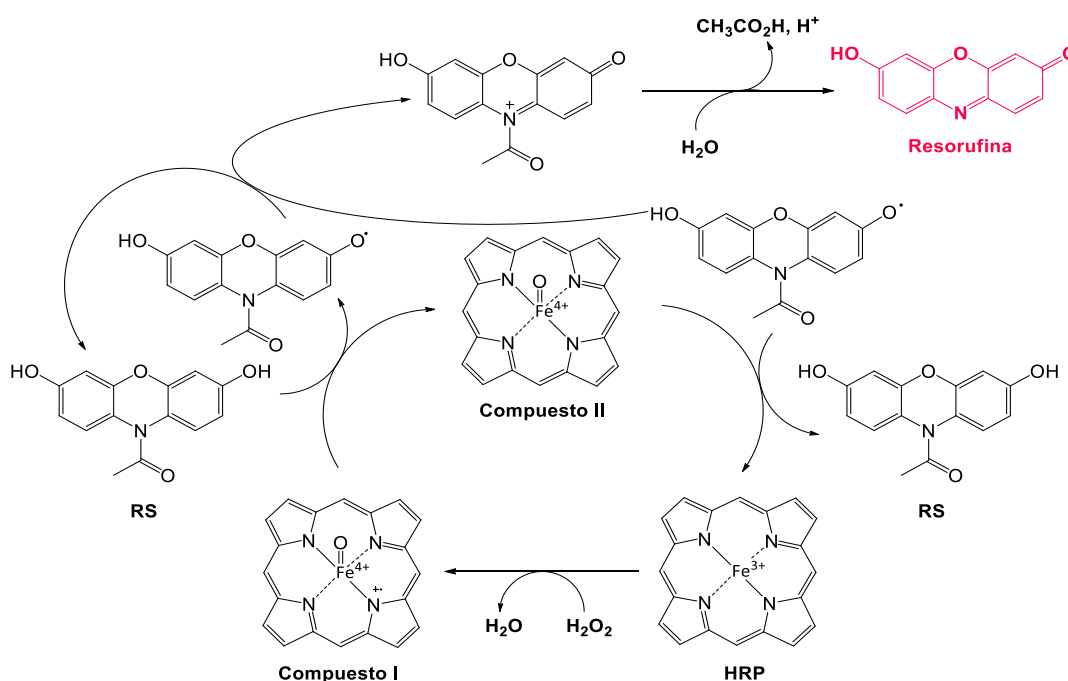
### 3.2.4. Estudio de la cinética de formación de las ROS procedentes de la degradación oxidativa del ácido ascórbico

#### 3.2.4.1. Formación del radical $O_2^{\bullet-}$

La cinética de formación del radical  $O_2^{\bullet-}$ , generado durante la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$ , se siguió añadiendo *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) al medio de reacción. Cuando el NBT reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  producido se genera formazán, un compuesto que aumenta la absorbancia de la disolución a 560 nm [Sirota, 2012]. Para realizar el estudio se preparó una mezcla de reacción que contenía AA 70  $\mu$ M,  $Cu^{2+}$  2,5  $\mu$ M y NBT 50  $\mu$ M en DT5 y se registraron los espectros de absorbancia entre 400 y 800 nm cada 5 min (25°C), utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC de doble haz y cubetas de metacrilato de 1 cm de paso óptico. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### 3.2.4.2. Formación de $H_2O_2$

Para seguir la formación del  $H_2O_2$  producido durante la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  se utilizó el kit comercial MAK165 de Sigma-Aldrich. En el ensayo, el sustrato de la *horseradish peroxidasa* (RS), que no es fluorescente, se transforma en resorufina (fluorescente) después de que la enzima (HRP) haya sido oxidada por el  $H_2O_2$  (Esquema 2) [Wang, 2017].



**Esquema 2.** Mecanismo de oxidación de RS a resorufina en presencia de HRP y  $H_2O_2$ . En este esquema solo se muestra la parte activa de HRP que participa en la reacción [Wang, 2017].

De acuerdo al protocolo de Sigma-Aldrich, el sustrato (RS) se reconstituyó en 250  $\mu$ L de DMSO para preparar la disolución madre, mientras que la peroxidasa (HRP) se reconstituyó en 1 mL del tampón que contenía el propio kit, obteniendo una disolución de 20 U/mL. A partir de las dos disoluciones se preparó otra, denominada master mix (MX), que contenía 50  $\mu$ L de la disolución madre de RS, 200  $\mu$ L de la de HRP y 4,75 mL del tampón comercial.

La formación de  $H_2O_2$  se midió en 50  $\mu$ L de mezclas que contenían AA,  $M^{n+}$  y diferentes concentraciones de Hfra, Yfh1 y  $\alpha$ -Syn, las cuales se mezclaron previamente con 50  $\mu$ L de MX. En las



mezclas de reacción finales, la concentración de cada reactivo fue: AA 70  $\mu\text{M}$ ,  $\text{M}^{\text{n}+}$  2,5  $\mu\text{M}$  y 0,5, 2,5 o 10  $\mu\text{M}$  de proteína. En todos los casos, el AA fue el último reactivo añadido e inmediatamente se midió la intensidad de fluorescencia durante 200 minutos a 590 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  540 nm). Además, se llevaron a cabo experimentos de control en los que el MX se mezcló con los reactivos por separado. Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando un fluorímetro *Varian Cary Eclipse* equipado con lector de placas. En todos los experimentos se utilizó como blanco el tampón del kit comercial (50 $\mu\text{L}$  tampón + 50 $\mu\text{L}$  MX).

Por otro lado, se determinó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido a cada instante de reacción mediante una curva de calibrado que se realizó mezclando 50  $\mu\text{L}$  de diferentes disoluciones a distinta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0; 0,5; 2; 4; 10; 20; 30 y 50  $\mu\text{M}$ ) con 50  $\mu\text{L}$  de MX. Estas mezclas se incubaron durante 30 min a 25°C y una vez transcurrido el tiempo indicado se midió su intensidad de fluorescencia a 590 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  540 nm).

### 3.2.4.3. Formación del radical $\text{HO}^\bullet$

El ácido cumarin-3-carboxílico (3-CCA) se oxida en presencia de radicales  $\text{HO}^\bullet$  para formar el ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico (7-OH-3-CCA), que emite radiación fluorescente a 450 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  395 nm). En base a esto, se decidió utilizar este compuesto para estudiar la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para inhibir la formación de radicales  $\text{HO}^\bullet$  durante la degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ .

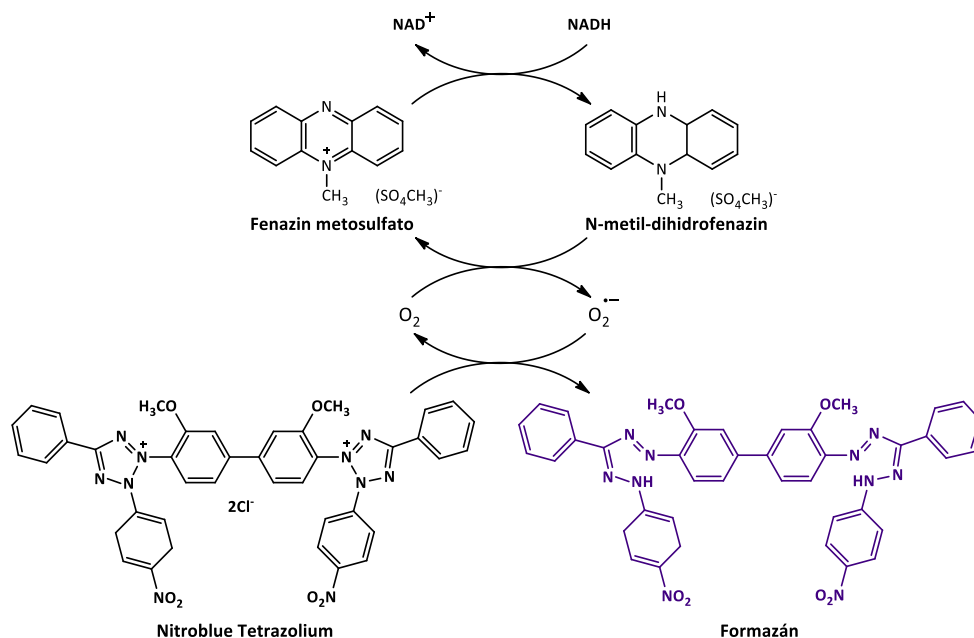
Para realizar estos experimentos, se preparó una disolución madre de 3-CCA 2,5 mM en DT5 y se añadió hasta una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  a mezclas de reacción que contenían los reactivos indicados en el apartado 3.2.2.2 (I-IV). Seguidamente, se adquirió la variación temporal de la intensidad de fluorescencia a 450 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$  395 nm) durante 150 min a 25°C, utilizando un fluorímetro *Varian Cary Eclipse* y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### 3.2.5. Estudio de la capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para secuestrar radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{HO}^\bullet$

#### 3.2.5.1. Secuestro del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ [Método (PMS)-NADH]

El estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para secuestrar o neutralizar el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se llevó a cabo utilizando el método (PMS)-NADH [Sun, 2015]. En este método, el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se genera tras la reacción del fenazín metosulfato (PMS) con el dinucleótido nicotinamida adenina (NADH) en presencia de oxígeno molecular. Posteriormente, el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generado reacciona con el NBT produciendo formazán (Esquema 3), un compuesto que absorbe en la región del visible. De esta manera, si las proteínas son capaces de secuestrar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , la producción de formazán disminuirá, al igual que la absorbancia de la disolución a 560 nm.

Para llevar a cabo el estudio se prepararon disoluciones madre de PMS (30  $\mu\text{M}$ ), NADH (338  $\mu\text{M}$ ) y NBT (200  $\mu\text{M}$ ) en DT5, las cuales se mantuvieron a 4°C y en recipientes ámbar hasta ser utilizadas. Posteriormente, se prepararon las mezclas de reacción que contenían NADH 84,5  $\mu\text{M}$  y PMS 7,5  $\mu\text{M}$ , en ausencia o en presencia de: I) Hfra 10  $\mu\text{M}$ ; II) Yfh1 10  $\mu\text{M}$ ; III)  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$ ; IV) Hfra +  $\alpha$ -Syn (10/10  $\mu\text{M}$ ); V) Yfh1 +  $\alpha$ -Syn (10/10  $\mu\text{M}$ ); y VI) AA 5, 30, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ . Seguidamente, se añadió NBT hasta una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  y se incubó la mezcla 5 min a temperatura ambiente. Por último, se registraron los espectros de absorbancia entre 400 y 800 nm a 25°C, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC de doble haz y cubetas de metacrilato de 1 cm de paso óptico. Los ensayos se realizaron por triplicado.



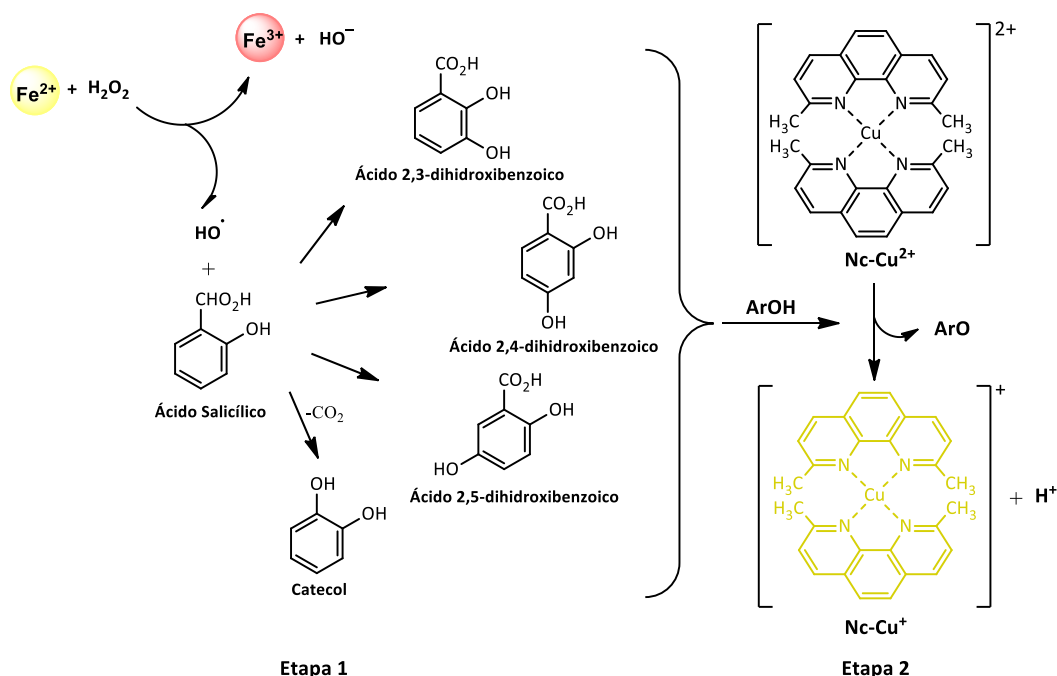
**Esquema 3.** Reacciones de formación de radicales O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y formazán de acuerdo al método (PMS)-NADH.

### 3.2.5.2. Secuestro del radical HO<sup>•</sup> (Método CUPRAC)

El estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para neutralizar el radical HO<sup>•</sup> se llevó a cabo utilizando el método CUPRAC (Esquema 4) [Özyürek, 2008; Özyürek, 2011]. En este método, el radical HO<sup>•</sup> se genera como resultado de la reacción entre el Fe<sup>2+</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, el radical formado reacciona con el ácido salicílico, dando lugar a una serie de productos hidroxilados que reaccionan con el complejo neocuproína-Cu<sup>2+</sup> (Nc-Cu<sup>2+</sup>), reduciéndolo a neocuproína-Cu<sup>+</sup> (Nc-Cu<sup>+</sup>), un complejo de color amarillo que presenta una absorbancia máxima a 450 nm. De esta manera, si las proteínas son capaces de secuestrar HO<sup>•</sup>, la formación de hidroxisalicilatos será menor, al igual que la cantidad de complejo Nc-Cu<sup>+</sup> formado, lo que se verá reflejado en una disminución de la señal de absorción.

Para llevar a cabo el ensayo, se prepararon en agua milli-Q disoluciones madre de: ácido salicílico 10 mM; FeCl<sub>2</sub> 20 mM con 40  $\mu$ L de HCl 1M por cada mL de disolución; EDTA 20 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; CuCl<sub>2</sub> 10 mM; acetato de amonio (NH<sub>4</sub>Ac) 1M; neocuproína 7,5 mM en etanol y una disolución de catalasa (298 U/mL) en tampón DT4.

El experimento se realizó preparando 0,5 mL de una mezcla de reacción (R1) en DT4 que contenía: ácido salicílico 0,5 mM; Fe<sup>2+</sup> 0,5 mM; EDTA 0,5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; y 10  $\mu$ M de Hfra, Yfh1,  $\alpha$ -Syn, Hfra+ $\alpha$ -Syn (10/10  $\mu$ M) o Yfh1+ $\alpha$ -Syn (10/10  $\mu$ M). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue el último reactivo añadido y una vez adicionado, se incubó la mezcla a 37°C y 500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se añadió catalasa hasta una concentración final de 15 U/mL para eliminar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se agitó la mezcla 30 s y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Adicionalmente, se preparó 1 mL de una mezcla de reacción (R2) en agua que contenía Cu<sup>2+</sup> 1 mM, Nc 0,75 mM, NH<sub>4</sub>Ac 0,2 M y 100  $\mu$ L de R1. La disolución se dejó reposar durante 2,5 h a temperatura ambiente y, posteriormente, se adquirió su espectro UV-Vis entre 340 y 600 nm a 25°C, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC de doble haz y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los experimentos se realizaron por triplicado. Como blanco se utilizó una mezcla que contenía los reactivos de R2 y 100  $\mu$ L de agua, en lugar de R1.



**Esquema 4.** Mecanismo de reacción del método CUPRAC. En la etapa 1 se forma el radical  $\text{HO}^\bullet$  y los derivados hidroxilados del ácido salicílico ( $\text{ArOH}$ ). En la etapa 2 se produce la reacción redox entre el complejo  $\text{Nc-Cu}^{2+}$  y  $\text{ArOH}$ .

### 3.2.6. Efecto del secuestro de ROS sobre algunas propiedades de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína

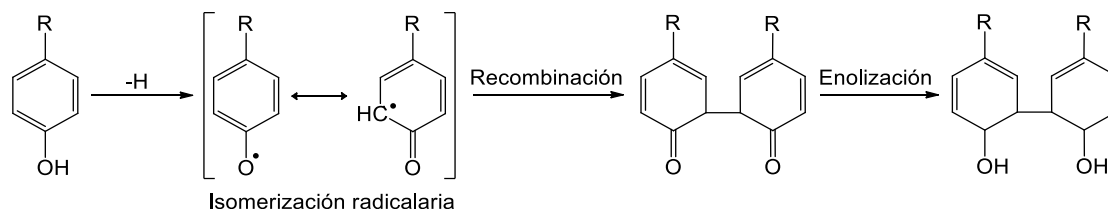
#### 3.2.6.1. Efecto sobre el peso molecular proteico

Para estudiar si la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn eran capaces de secuestrar las ROS formadas durante la degradación del AA, se analizaron por MALDI-TOF/TOF mezclas de reacción que contenían: I) AA 70  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$ ; II) AA 70  $\mu\text{M}$  +  $\text{M}^{n+}$  2,5  $\mu\text{M}$  + Hfra/Yfh1/ $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$ ; III) AA 70  $\mu\text{M}$  +  $\text{M}^{n+}$  2,5  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$  + Hfra/Yfh1 5  $\mu\text{M}$  y IV) AA 70  $\mu\text{M}$  +  $\text{M}^{n+}$  2,5  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$  + Hfra 10  $\mu\text{M}$ , a distintos tiempos de incubación (0 y 150 min). Así, el secuestro de ROS por parte de estas proteínas debería quedar plasmado en un incremento de su peso molecular.

Las mezclas de reacción se prepararon en DT4 y se congelaron después de 0 y 150 min de incubación a 25°C. Posteriormente, 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra se mezcló con 1  $\mu\text{L}$  de una disolución matriz (10  $\mu\text{g}$  de ácido sinapínico en una disolución de agua:acetonitrilo 70:30 y ácido trifluoroacético al 0,1%) y la mezcla resultante se depositó sobre una placa de acero que se secó con aire. Seguidamente, las muestras se analizaron en un espectrómetro Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF equipado con un láser de  $\text{N}_2$  pulsado de 200 MHz. Los voltajes de las fuentes de ionización 1 y 2 fueron de 20 y 18,5 kV, respectivamente, y el de la lente 7,5 kV.

#### 3.2.6.2. Efecto sobre el entrecruzamiento de residuos tirosina

El efecto de las ROS sobre los residuos Tyr de las proteínas puede inducir su unión covalente mediante un proceso que da lugar a la dimerización proteica (Esquema 5). Este hecho da como resultado la pérdida de la señal de fluorescencia correspondiente a la Tyr ( $\lambda_{\text{em\_max}}$  305 nm) y un aumento de la intensidad de fluorescencia entre los 405-410 nm [Correia, 2009; Al-Hilaly, 2016].

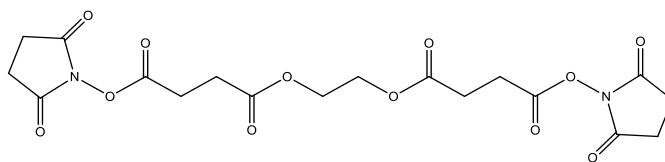


**Esquema 5.** Mecanismo de dimerización en el que dos residuos tirosina se unen para formar di-tirosina [Correia, 2012].

Para estudiar si las ROS formadas durante la degradación del AA catalizada por cationes metálicos son capaces de inducir entrecruzamientos entre los residuos tirosina de las proteínas utilizadas en este trabajo, se registraron cada 5 minutos los espectros de fluorescencia entre 375 y 550 nm ( $\lambda_{ex}$  325 nm) de mezclas de reacción que contenían: I) 10  $\mu$ M Hfra/Yfh1/ $\alpha$ -Syn +  $M^{n+}$  2,5  $\mu$ M + AA 70  $\mu$ M; II) 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Syn +  $Cu^{2+}$  10  $\mu$ M + AA 100 mM y III) 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Syn +  $Cu^{2+}$  5/10/20  $\mu$ M + AA 70  $\mu$ M. Los experimentos se realizaron a 25°C, por duplicado, utilizando un fluorímetro *Varian Cary Eclipse* y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### 3.2.7. Estudio de la interacción de la frataxina humana y la frataxina de levadura con la $\alpha$ -sinucleína

En este trabajo se estudió si se producía algún tipo de interacción entre las frataxinas y la  $\alpha$ -Syn. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento químico, utilizando el éster bifuncional “etilen glicol bis-(succinimidil succinato)” (EGS) (Figura 8) [Ciric, 2015]. Este compuesto contiene dos grupos éster que pueden romperse al interactuar con las aminas proteicas (del extremo N-terminal o de los grupos  $N\epsilon$  de las lisinas). Así, si las proteínas llegan a estar suficientemente cerca durante un tiempo suficientemente largo y poseen grupos accesibles que puedan reaccionar con el EGS, quedarán unidas mediante la formación de enlaces covalentes con el linker.



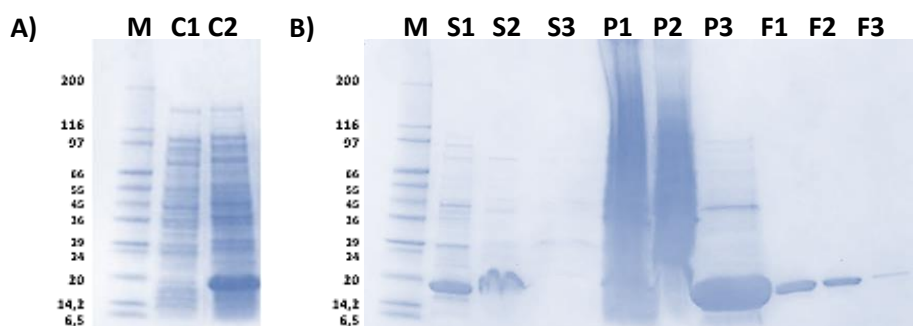
**Figura 8.** Estructura química del EGS.

Para llevar a cabo el estudio, se preparó una disolución madre de EGS 10 mM en una disolución de  $CH_3COOH$ :agua (50:50). Esta disolución se añadió hasta una concentración final de 0,1 mM a mezclas de reacción que contenían 10  $\mu$ M de  $\alpha$ -Syn, Hfra, Yfh1,  $\alpha$ -Syn+Hfra o  $\alpha$ -Syn+Yfh1 en DT4. Estas mezclas de reacción se incubaron a 25°C durante 30 min. Seguidamente, se añadió tampón Tris 0,3 M a pH 7,5 hasta una concentración final de 50 mM con el fin de eliminar el exceso de EGS que no había reaccionado. La mezcla resultante se incubó durante 15 min a 25°C. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF/TOF para comprobar si se habían formado dímeros u otras especies poliméricas. Para la electroforesis SDS-PAGE se añadieron 15  $\mu$ L de las muestras, que habían sido tratadas previamente con Laemmi/DTT, en cada uno de los pocillos y se aplicó un voltaje de 200 V durante 30 min. Finalmente, los geles obtenidos se tiñeron con Silver Staining. Por otro lado, la espectroscopía MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.2.6, midiendo la aparición de señales en torno a los 30.000 Da. En este estudio se utilizaron como control las mezclas de reacción preparadas sin la presencia de EGS.

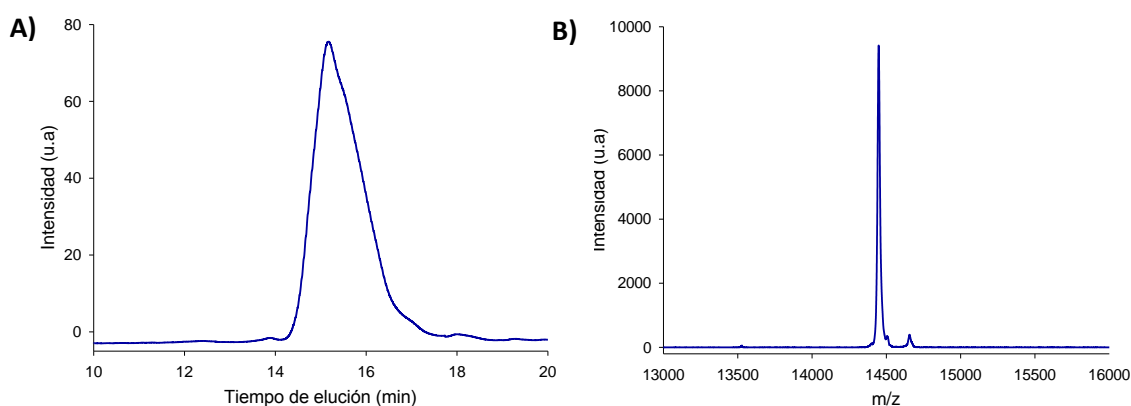
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Producción, purificación y caracterización de la $\alpha$ -sinucleína

La producción recombinante de la  $\alpha$ -Syn se siguió recogiendo alícuotas de cada etapa de la producción y de la purificación para su posterior análisis mediante SDS-PAGE (Figura 9). El gel del cultivo bacteriano antes y después de la inducción evidenció la aparición de una banda en torno a los 15.000 Da que debería corresponder a la  $\alpha$ -Syn (Figura 9A). Este hecho confirmó la correcta expresión de la proteína al añadir IPTG. El seguimiento de esta misma banda en las alícuotas de sobrenadante y de precipitado obtenidas durante la purificación (Figura 9B) confirmó que el aislamiento de la proteína fue el adecuado y que no se perdió parte de ella al descartar las fracciones correspondientes. Por otro lado, la aparición de una única banda en las fracciones en las que se dividió el pico obtenido durante la cromatografía de intercambio aniónico (Figura 10A) confirmó que la proteína obtenida era pura y que no existían formas oligoméricas. Este hecho también pudo confirmarse a partir del espectro MALDI-TOF/TOF (Figura 10B) en el que la señal más intensa apareció en torno a los 14.500 Da. En cuanto a la masa exacta de la proteína, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (Anexo Fig.1), fue de 14.451,26 Da, que corresponde al peso molecular de la  $\alpha$ -Syn.



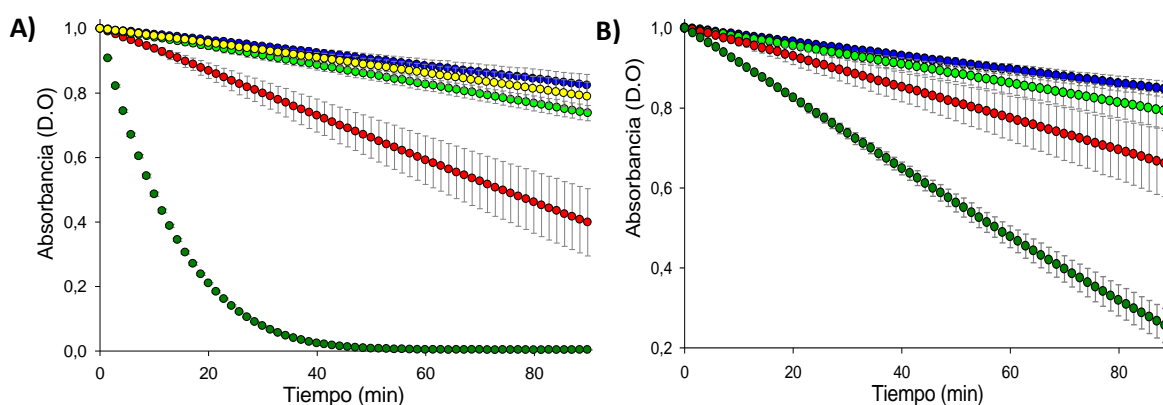
**Figura 9.** Geles SDS-PAGE de las alícuotas recogidas durante la producción y la purificación de la  $\alpha$ -Syn. **A)** Bandas correspondientes al cultivo bacteriano antes (C1) y después (C2) de añadir IPTG. **B)** Bandas correspondientes a las alícuotas de sobrenadante (S1, S2, S3) y de precipitado (P1, P2, P3) recogidas durante la purificación y fracciones (F1, F2, F3) en las que se dividió el pico cromatográfico obtenido en la cromatografía de intercambio aniónico. M hace referencia al marcador utilizado (Sigma S8445) (peso en kDa).



**Figura 10.** Caracterización de la-Syn producida. **A)** Pico mayoritario del cromatograma obtenido durante la purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. **B)** Espectro MALDI-TOF/TOF de la muestra recogida en la cromatografía de intercambio aniónico en el que la señal más intensa corresponde a la  $\alpha$ -Syn monomérica.

## 4.2. Elección de las condiciones experimentales en función de la velocidad de degradación del ácido ascórbico

La selección del medio de reacción se realizó con el objetivo de que fuera lo más parecido posible al medio fisiológico. Es por ello que se decidió trabajar en una disolución tamponada de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7,4 y en presencia de NaCl. Además, se buscaron unas condiciones en las que la velocidad de degradación del AA fuera mínima para que este proceso no interfiriera en el estudio. Con este objetivo, se analizó la cinética de degradación del AA en función de la concentración de fosfato y la de NaCl. Cuanto mayor fue la concentración de NaCl menor fue la velocidad de degradación del AA (Figura 11A); mientras que con la concentración de fosfato ocurrió lo contrario (Figura 11B). Ya es sabido que el NaCl inhibe la oxidación del AA y la producción de ROS, dificultando la interacción entre los cationes de transición y el oxígeno molecular [Harel, 1994]. Aunque en estos experimentos no se añadieron cationes metálicos, es posible que hubiera trazas de los mismos, hecho que pudo comprobarse añadiendo EDTA al medio de reacción, lo que dio como resultado una velocidad de degradación del AA menor que en ausencia del compuesto quelante (Anexo Fig.2).



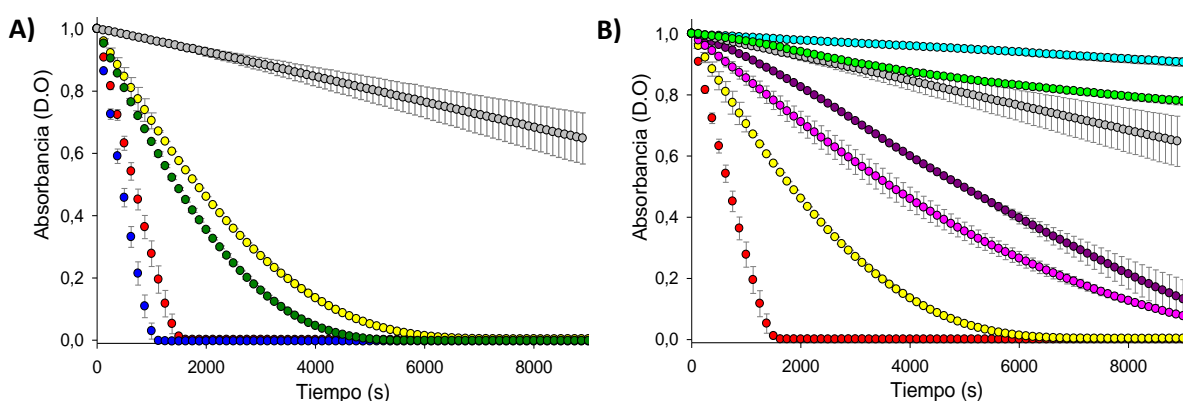
**Figura 11.** Degradación del ácido ascórbico a 25°C en disoluciones tampón con distinta concentración de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y NaCl. **A)** En función de la concentración de NaCl, manteniendo una concentración de fosfato de 10mM. Las concentraciones de NaCl utilizadas fueron: 0mM (●), 50mM (●), 100mM (●), 150mM (●) y 200mM (●). **B)** En función de la concentración de fosfato, manteniendo una concentración de NaCl de 150mM. Las concentraciones de fosfato fueron: 50mM (●), 20mM (●), 10mM (●) y 5mM (●).

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron las concentraciones 10 mM de fosfato y 150 mM de NaCl para preparar la disolución tampón con la que se abordaría el trabajo. Aunque estas concentraciones no corresponden a las condiciones en las que la degradación del AA es mínima ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM y NaCl 200 mM) la diferencia existente entre esta velocidad y la de las condiciones seleccionadas es muy baja. De esta forma, se aseguraba que la concentración de fosfato era suficiente para tamponar el medio y que la concentración de NaCl no era demasiado elevada para evitar la agregación de las proteínas [Kastelic, 2015].

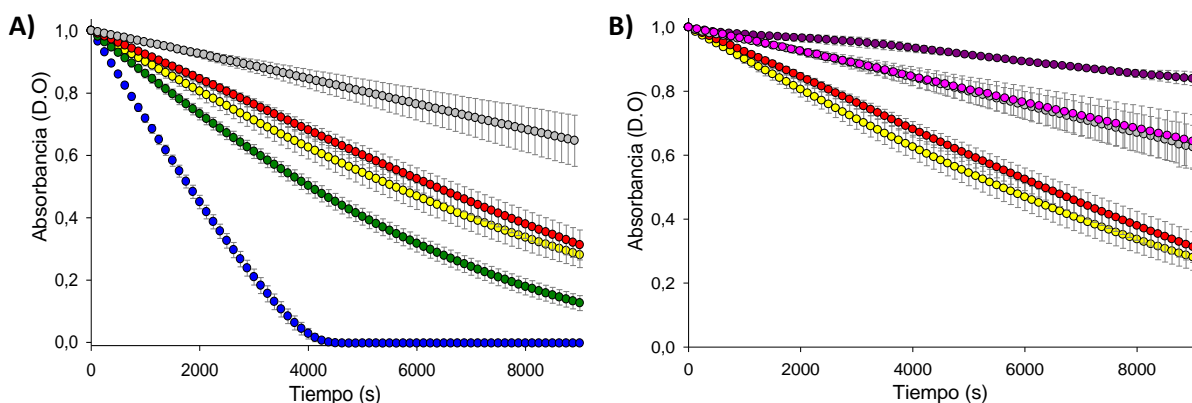
## 4.3. Efecto de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína sobre la velocidad de degradación del ácido ascórbico catalizada por cationes metálicos

La adición de  $\text{Cu}^{2+}$  y de  $\text{Fe}^{3+}$  acelera la degradación oxidativa del AA, tal y como evidenció el aumento en la velocidad de descenso de la absorbancia a 265 nm respecto a los datos obtenidos sin estos cationes metálicos (Figuras 12 y 13). Además, bajo las condiciones experimentales escogidas, el  $\text{Cu}^{2+}$  hace que la absorbancia disminuya por completo a los 20 min de reacción; mientras que con el

$\text{Fe}^{3+}$ , la señal no llega a desaparecer durante los 150 min registrados, sugiriendo que el  $\text{Cu}^{2+}$  cataliza mejor la reacción de oxidación del AA que el  $\text{Fe}^{3+}$ . Por otro lado, la presencia de Hfra, Yfh1 o  $\alpha$ -Syn altera la velocidad de degradación del AA. Cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , la Hfra acelera la degradación del AA (Figura 12A). Sin embargo, la  $\alpha$ -Syn y la Yfh1 la inhiben de forma más o menos efectiva (Yfh1 >  $\alpha$ -Syn), siendo necesaria una mayor concentración de  $\alpha$ -Syn que de Yfh1 para conseguir el mismo efecto (Figura 12B). Cuando la reacción se realiza en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , la Hfra mantiene el comportamiento observado con el  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 13A); mientras que la  $\alpha$ -Syn pierde su capacidad para inhibir la degradación del AA y la Yfh1 la incrementa, siendo necesaria una menor concentración de Yfh1 para lograr el mismo efecto que con el  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 13B). En cuanto al efecto que causa la presencia conjunta de  $\alpha$ -Syn y frataxina (Hfra o Yfh1) sobre la velocidad de degradación del AA (Figuras 12 y 13), el perfil cinético obtenido aparece en la zona intermedia a los registrados con las proteínas por separado, tanto en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  como de  $\text{Fe}^{3+}$ , lo que sugiere que la presencia simultánea de las dos proteínas no induce ningún efecto adicional al observado cuando las proteínas son añadidas por separado.



**Figura 12.** Degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$ . En la Figura A se compara el efecto de la Hfra y la  $\alpha$ -Syn sobre la cinética de degradación del AA y en la B, el de la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn. La composición de las mezclas de reacción de la Figura A es: AA (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra 10 $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●); mientras que la de la Figura B es: AA (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1 0,5 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1 0,5 $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1 1 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1 2,5 $\mu\text{M}$  (●). En todos los experimentos la concentración de AA fue 70 $\mu\text{M}$  y la de  $\text{Cu}^{2+}$  2,5 $\mu\text{M}$ .



**Figura 13.** Degradación del AA catalizada por  $\text{Fe}^{3+}$ . En la Figura A se compara el efecto de la Hfra y la  $\alpha$ -Syn sobre la cinética de degradación del AA y en la B, el de la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn. La composición de las mezclas de reacción de la Figura A es: AA (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Hfra 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Hfra 10 $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●); mientras que la de la Figura B es: AA (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Yfh1 0,5 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Yfh1 0,5 $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Yfh1 1 $\mu\text{M}$  (●), AA +  $\text{Fe}^{3+}$  + Yfh1 2,5 $\mu\text{M}$  (●). En todos los experimentos la concentración de AA fue 70 $\mu\text{M}$  y la de  $\text{Fe}^{3+}$  2,5 $\mu\text{M}$ .



Dado que el EDTA es capaz de reducir la velocidad de degradación del AA en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y de  $\text{Fe}^{3+}$  (Anexo Fig.2), la actividad inhibidora de las proteínas debe estar relacionada con su capacidad para coordinar a estos cationes, haciendo que la concentración de catión metálico que puede reaccionar con el oxígeno molecular del medio disminuya [Pedersen, 2016]. La  $\alpha$ -Syn se une al  $\text{Cu}^{2+}$  con una constante de disociación ( $k_{d1} \approx 0,20 \mu\text{M}$ ) mayor que la del  $\text{Fe}^{3+}$  ( $k_d < 0,01 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, el número de sitios de unión con los que la proteína coordina al  $\text{Cu}^{2+}$  es mayor que en el caso del  $\text{Fe}^{3+}$ , lo que explicaría la mayor capacidad de la  $\alpha$ -Syn para inhibir la degradación del AA en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , respecto al otro catión metálico [Binolfi, 2008; Peng, 2010]. La Yfh1 se une al  $\text{Cu}^{2+}$  con una constante de disociación ( $k_{d1} \approx 0,13 \mu\text{M}$ ) y una estequiometría similares a las de la  $\alpha$ -Syn. No obstante, se ha comprobado que, en ausencia de cationes metálicos, la simple presencia de Yfh1 ralentiza la velocidad de degradación del AA y la de  $\alpha$ -Syn la acelera ligeramente (Anexo Fig.3), lo que podría influir en el hecho de que la Yfh1 presente una mayor capacidad de inhibición de la degradación del AA en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  que la  $\alpha$ -Syn. Por otro lado, a pesar de que la Yfh1 no posee una gran afinidad al  $\text{Fe}^{3+}$  ( $k_d \approx 30 \mu\text{M}$ ), podría llegar a enlazar un elevado número de cationes hierro, lo que explicaría su mayor capacidad para inhibir la degradación del AA catalizada por este catión metálico [Cook, 2006; Han, 2017]. En cuanto al hecho de que la Hfra acelera la degradación del AA, podría deberse a su baja afinidad por los cationes metálicos. De hecho, no existe una constante de asociación descrita para el  $\text{Cu}^{2+}$ . Además, se ha comprobado que, en ausencia de cationes metálicos, la simple presencia de la proteína acelera ligeramente la velocidad de degradación del AA (Anexo Fig.3), por lo que la Hfra debe poseer regiones estructurales que aceleran la degradación del compuesto.

#### **4.4. Capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para inhibir la formación de las ROS**

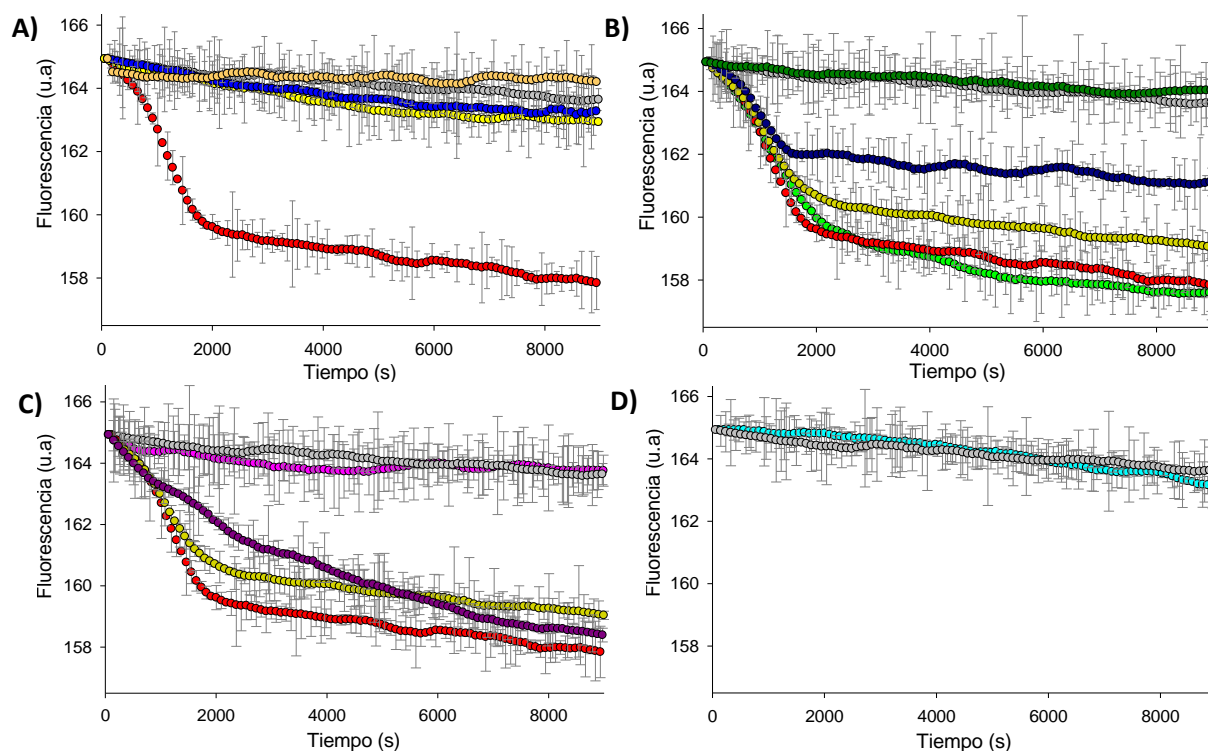
##### **4.4.1. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de especies radicalarias**

Una vez estudiado el efecto de las diferentes proteínas sobre la degradación del AA, se analizó su efecto sobre la formación de radicales libres. La presencia simultánea de AA y  $\text{Cu}^{2+}$  implica una notable disminución temporal de la intensidad de fluorescencia emitida por la fluoresceína durante los primeros 25 min de reacción, momento en que la velocidad de descenso de la señal recogida disminuye (Figura 14A). Este hecho demuestra que las especies radicalarias se generan a la vez que el AA es oxidado por el  $\text{Cu}^{2+}$ , de manera que el tiempo en el que la fluorescencia de la fluoresceína disminuye de forma más rápida es prácticamente igual a lo que tarda el AA en degradarse en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\sim 20$  min) (Figura 12). Sin embargo, la presencia de Hfra, Yfh1 o  $\alpha$ -Syn reduce la disminución de la intensidad fluorescente en función de la concentración de las mismas, hecho que sugiere que estas proteínas son capaces de inhibir la formación de radicales libres a pesar de que el AA se degrade (Figura 14A, 14B y 14C). No obstante, hay que destacar que la capacidad de cada tipo de proteína para inhibir la formación de radicales no es la misma y parece que sigue el orden: Hfra >  $\alpha$ -Syn > Yfh1. En cuanto al efecto causado por la presencia conjunta de  $\alpha$ -Syn y frataxina (Hfra o Yfh1), se ha comprobado que, al utilizar una concentración de proteínas en la que se consigue una inhibición pequeña por separado ( $0,5\mu\text{M}$ ), la mezcla de  $\alpha$ -Syn y Yfh1 ( $0,5/0,5 \mu\text{M}$ ) da lugar a una inhibición total (Figura 14C); mientras que la mezcla de  $\alpha$ -Syn y Hfra ( $0,5/0,5 \mu\text{M}$ ) hace que se pierda por completo la capacidad observada con las proteínas por separado (Figura 14B). No obstante, cuando se aumenta la concentración de Hfra y  $\alpha$ -Syn ( $10/10\mu\text{M}$ ), la inhibición conseguida es mayor que con las proteínas por separado (Figura 14B).

Por otro lado, se ha comprobado que la formación de radicales procedentes de la degradación del AA catalizada por  $\text{Fe}^{3+}$  es prácticamente nula, ya que la disminución de la fluorescencia emitida por la



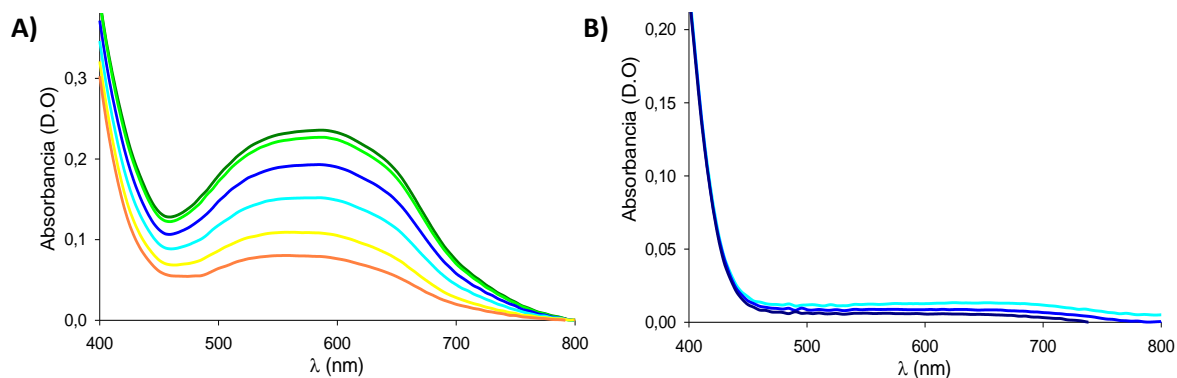
fluoresceína en presencia de este catión metálico coincide con el comportamiento observado con el AA solo (Figura 14D), por lo que no se procedió a la utilización de proteínas sobre este sistema.



**Figura 14.** Formación de radicales seguida a partir de la disminución en la señal fluorescente a 518 nm de la fluoresceína. **A)** Estudio de la capacidad inhibitoria de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn. Mezclas compuestas por: AA ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra  $10\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn  $10\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) y AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1  $10\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). **B)** Análisis del efecto que causa la presencia conjunta de Hfra y  $\alpha$ -Syn. La composición de las mezclas fue: AA ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra  $0,5\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn  $0,5\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra +  $\alpha$ -Syn ( $0,5/0,5\mu\text{M}$ ) ( $\bullet$ ) y AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Hfra +  $\alpha$ -Syn ( $10/10\mu\text{M}$ ) ( $\bullet$ ). **C)** Estudio del efecto que causa la presencia conjunta de Yfh1 y  $\alpha$ -Syn. La composición de las mezclas fue: AA ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn  $0,5\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), AA +  $\text{Cu}^{2+}$  + Yfh1  $0,5\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) y AA +  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn + Yfh1 ( $0,5/0,5\mu\text{M}$ ) ( $\bullet$ ). **D)** Disminución de la señal fluorescente durante la degradación del AA en ausencia ( $\bullet$ ) o en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\bullet$ ). En todas las mezclas, la concentración de fluoresceína fue  $26\mu\text{M}$ , la de AA  $70\mu\text{M}$  y la de  $\text{M}^{n+}$   $2,5\mu\text{M}$ . Los datos se han suavizado utilizando la función exponencial negativa del programa SigmaPlot.

#### 4.4.2. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$

La formación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  no ha podido seguirse con el método NBT, ya que estos radicales reaccionan rápidamente con el AA libre, dando lugar a un ciclo en el que el AA se autooxida [Jackson, 1998].



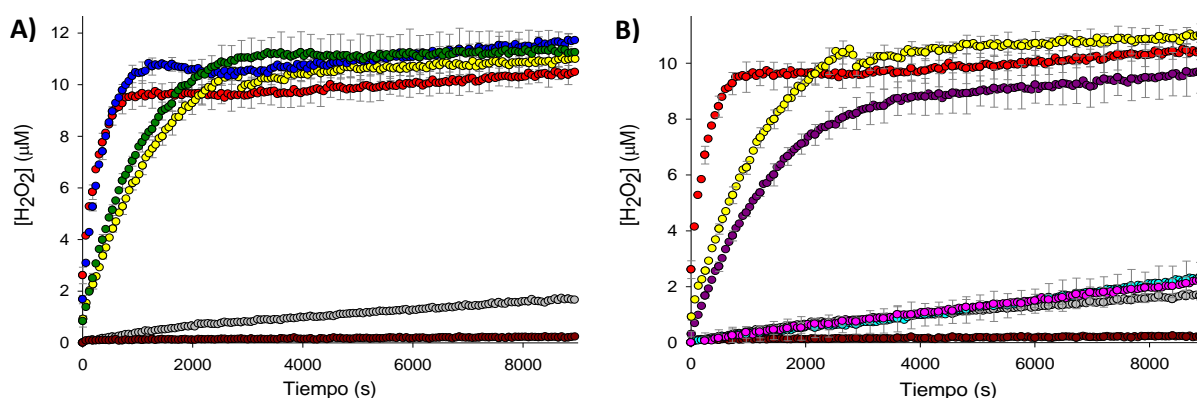
**Figura 15.** Estudio de la capacidad del AA para secuestrar e inhibir la formación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . **A)** Espectros UV-Vis de mezclas compuestas por PMS  $7,5\mu\text{M}$ , NADH  $84,5\mu\text{M}$  y NBT  $50\mu\text{M}$  en ausencia ( $\text{—}$ ) y en presencia de AA a diferentes concentraciones [5 ( $\text{—}$ ), 30 ( $\text{—}$ ), 100 ( $\text{—}$ ), 200 ( $\text{—}$ ) y 500 ( $\text{—}$ )  $\mu\text{M}$ ]. **B)** Espectros UV-Vis de una mezcla formada por AA  $70\mu\text{M}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$   $2,5\mu\text{M}$  y NBT  $50\mu\text{M}$  a diferentes tiempos de reacción [5 ( $\text{—}$ ), 20 ( $\text{—}$ ) y 50 ( $\text{—}$ ) min].

En base a lo anterior, el AA es capaz de secuestrar los radicales  $O_2^{\bullet-}$  en función de su concentración (Figura 15A). Por este motivo, durante el estudio de la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$  no se produce ningún aumento temporal de la concentración de  $O_2^{\bullet-}$ , impidiendo llevar a cabo el estudio en presencia de las proteínas utilizadas en este trabajo (Figura 15B).

#### 4.4.3. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de $H_2O_2$

Tanto el  $Cu^{2+}$  como el  $Fe^{3+}$  son capaces de oxidar el AA dando lugar a la formación de  $H_2O_2$  (Figuras 16 y 17). Sin embargo, la concentración de  $H_2O_2$  generado durante la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$  es bastante mayor que en presencia de  $Fe^{3+}$ , lo que puede relacionarse con la distinta velocidad de degradación del AA en presencia de cada uno de los cationes metálicos utilizados (Figuras 12 y 13). Además, tanto en presencia de  $Cu^{2+}$  como de  $Fe^{3+}$ , las tres proteínas utilizadas en este trabajo son capaces de ralentizar, de forma más o menos efectiva la formación de  $H_2O_2$ .

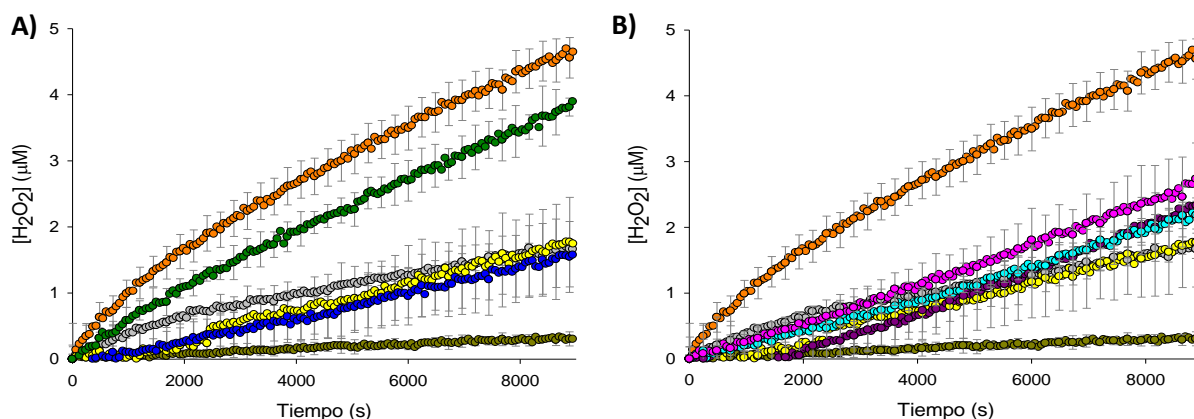
Cuando la reacción ocurre en presencia de  $Cu^{2+}$  (Figura 16), la capacidad de las proteínas para retrasar la formación de  $H_2O_2$  sigue el orden: Hfra <  $\alpha$ -Syn < Yfh1, el cual se puede relacionar con su capacidad para coordinar el catión metálico, de tal manera que cuanto mayor es ésta, más tarda el AA en degradarse y, por tanto, más tarda el  $H_2O_2$  en aparecer. Asimismo, se ha comprobado que el efecto provocado por la presencia simultánea de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn es el mismo que el observado anteriormente para la inhibición de la degradación del AA (Figura 12), donde el perfil cinético aparece en la zona intermedia a los obtenidos con las proteínas por separado. No obstante, en presencia de Yfh1 y  $\alpha$ -Syn, la frataxina parece tener un mayor efecto sobre la formación de  $H_2O_2$ , ya que la capacidad de ésta para inhibir la degradación del AA es notablemente superior que la de la  $\alpha$ -Syn.



**Figura 16.** Estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para inhibir la formación de  $H_2O_2$  procedente de la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$ . En la figura A se compara el efecto inhibitorio de la Hfra y la  $\alpha$ -Syn y en la B, la de la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn. Las mezclas estudiadas estaban compuestas por 50 $\mu$ L de Master Mix + 50 $\mu$ L de mezcla de reacción, alcanzando las concentraciones finales de: **A)**  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M (●), AA 70 $\mu$ M (○),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M (●),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Hfra 10 $\mu$ M (●),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M (●) y  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Hfra 10 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M (●); y **B)**  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M (●), AA 70 $\mu$ M (○),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M (●),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M (●),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 2,5 $\mu$ M (●),  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 0,5 $\mu$ M (●) y  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 2,5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M (●).

En presencia de  $Fe^{3+}$  (Figura 17), la capacidad de las proteínas para inhibir la formación de  $H_2O_2$  es similar (Yfh1  $\approx$  Hfra  $\approx$   $\alpha$ -Syn), a diferencia de lo observado en presencia de  $Cu^{2+}$ . Debido a ello, este comportamiento no puede relacionarse directamente con la afinidad de las proteínas por el  $Fe^{3+}$ . Además, la presencia conjunta de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn en el medio acelera la formación de  $H_2O_2$  respecto a lo observado con las proteínas por separado, lo que parece indicar que, de alguna

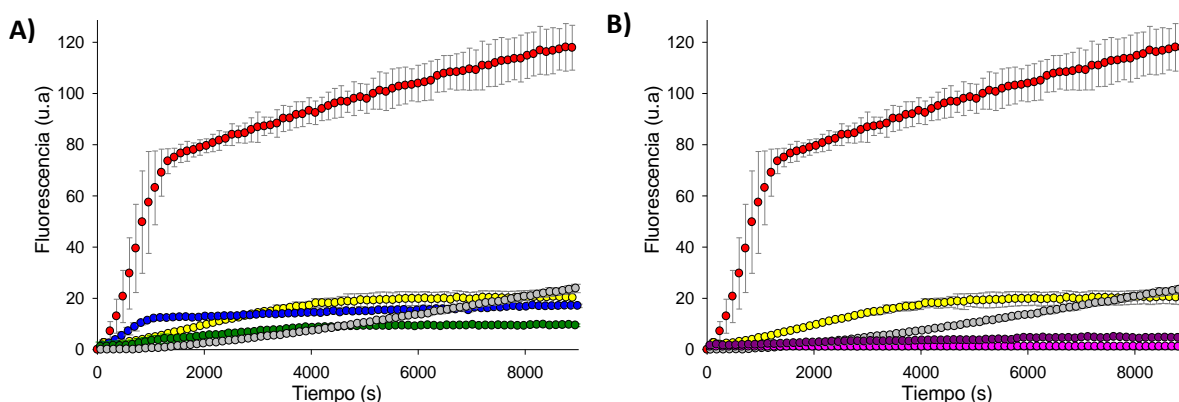
manera, la mezcla de frataxina y  $\alpha$ -Syn aumenta la tendencia a formar  $H_2O_2$ , siendo más acusado para el caso de la Hfra. Este hecho podría ser relevante, siempre y cuando no se forme  $HO^\bullet$  a continuación, ya que el  $H_2O_2$  es la ROS menos reactiva que se forma en el proceso de degradación del AA y podría ser eliminado posteriormente por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos presentes en las células.



**Figura 17.** Estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y el  $\alpha$ -Syn para inhibir la formación de  $H_2O_2$  procedente de la degradación del AA catalizada por  $Fe^{3+}$ . En la figura A se compara el efecto inhibitor de la Hfra y el  $\alpha$ -Syn y en la B, la de la Yfh1 y el  $\alpha$ -Syn. Las mezclas estudiadas estaban compuestas por 50 $\mu$ L de Master Mix + 50 $\mu$ L de mezcla de reacción, alcanzando las concentraciones finales de: **A)**  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M ( $\bullet$ ), AA 70 $\mu$ M ( $\circ$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M ( $\circ$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Hfra 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ) y  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Hfra 10 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ); y **B)**  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M ( $\bullet$ ), AA 70 $\mu$ M ( $\circ$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M ( $\circ$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 2,5 $\mu$ M ( $\bullet$ ),  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 0,5 $\mu$ M ( $\bullet$ ) y  $Fe^{3+}$  2,5 $\mu$ M + AA 70 $\mu$ M + Yfh1 2,5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ).

#### 4.4.4. Estudio de la capacidad de inhibición sobre la formación de $HO^\bullet$

La formación de radicales  $HO^\bullet$  solo se detectó a partir de la degradación del AA catalizada por el  $Cu^{2+}$  (Figura 18). En presencia de  $Fe^{3+}$ , la variación de la intensidad de fluorescencia de la mezcla de reacción coincidió con la del AA solo (Anexo Fig. 4), lo que sugiere que el  $Fe^{3+}$  no dirige la degradación del AA hacia la formación de este tipo de radicales, confirmando los resultados obtenidos en el estudio de la formación de especies radicalarias (Figura 14D).



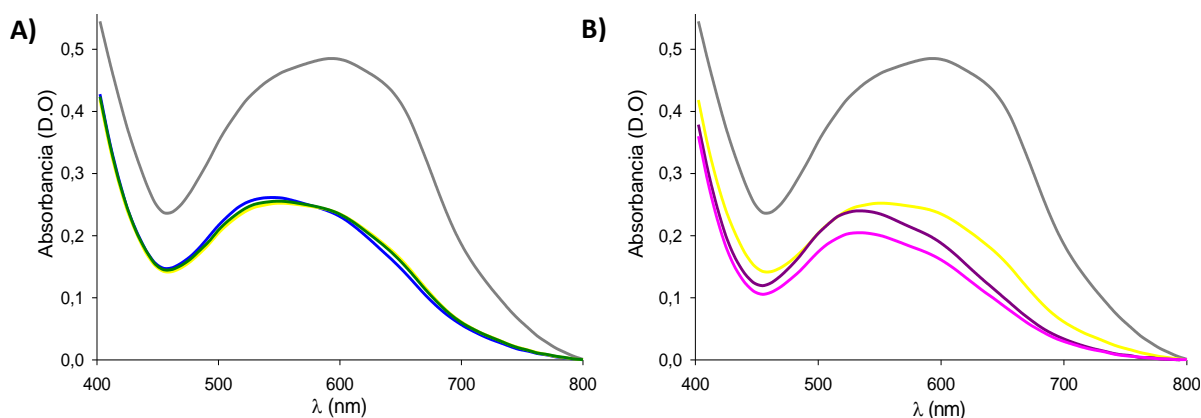
**Figura 18.** Estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y el  $\alpha$ -Syn para inhibir la formación de  $HO^\bullet$  procedentes de la degradación del AA catalizada por  $Cu^{2+}$ . Medición de la intensidad de fluorescencia a 450 nm del 7-OH-3-CCA en presencia de: **A)** AA ( $\circ$ ), AA +  $Cu^{2+}$  ( $\bullet$ ), AA +  $Cu^{2+}$  + Hfra 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ), AA +  $Cu^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ) y AA +  $Cu^{2+}$  + Hfra +  $\alpha$ -Syn (10/10 $\mu$ M) ( $\bullet$ ); y **B)** AA ( $\circ$ ), AA +  $Cu^{2+}$  ( $\bullet$ ), AA +  $Cu^{2+}$  +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ), AA +  $Cu^{2+}$  + Yfh1 10 $\mu$ M ( $\bullet$ ), AA +  $Cu^{2+}$  + Yfh1 +  $\alpha$ -Syn (10/10 $\mu$ M) ( $\bullet$ ). En todos los casos la concentración de AA fue 70 $\mu$ M y la de  $Cu^{2+}$  2,5 $\mu$ M.

En la degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$ , la presencia de Hfra, Yfh1 o  $\alpha$ -Syn inhibe la formación de radicales  $\text{HO}^\bullet$  (Figura 18). Este hecho explica la menor oxidación de la fluoresceína en presencia de proteínas obtenida durante el estudio de la formación de especies radicalarias (Figura 14A) y se puede relacionar con el hecho de que las proteínas inhiben la degradación del AA y retrasan la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, la presencia simultánea de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn hace que la inhibición observada sea mayor que con las proteínas por separado, lo cual es muy importante teniendo en cuenta la reactividad de esta especie radicalaria y los problemas que puede generar en la célula.

## 4.5. Capacidad de la frataxina humana, la frataxina de levadura y la $\alpha$ -sinucleína para secuestrar las ROS procedentes de la degradación del ácido ascórbico

### 4.5.1. Estudio de la capacidad de secuestro de $\text{O}_2^{\bullet-}$

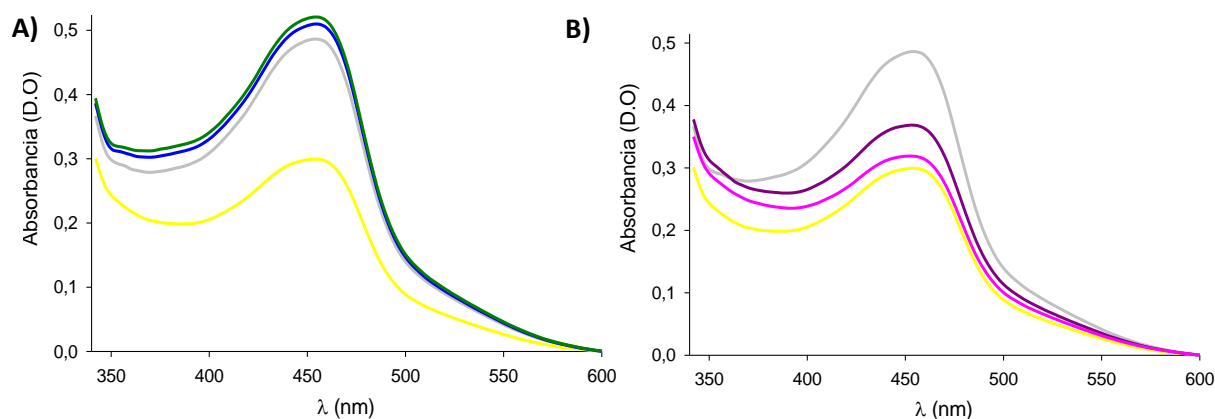
El secuestro de radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se ha podido estudiar aplicando el método (PMS)-NADH, comprobando que las tres proteínas (Hfra, Yfh1 y  $\alpha$ -Syn) son capaces de secuestrar este tipo de radicales con la misma eficacia (Figura 19). Además, la presencia simultánea de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn en la mezcla no hace que aparezca ningún comportamiento notablemente diferente al observado con las proteínas por separado, lo que indica que ninguna de las dos frataxinas son capaces de proteger a la  $\alpha$ -Syn del daño oxidativo que le provocarían estos radicales una vez formados. Asimismo, el hecho de que las tres proteínas utilizadas en este trabajo secuestran radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  podría explicar la capacidad de las mismas para retrasar la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figuras 16 y 17) y  $\text{HO}^\bullet$ , ya que en la degradación oxidativa del AA este radical es imprescindible para la formación de estas ROS (Esquema 1).



**Figura 19.** Estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para secuestrar radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Espectros UV-Vis de mezclas de reacción compuestas por PMS 7,5 $\mu\text{M}$ , NADH 84,5 $\mu\text{M}$  y NBT 50 $\mu\text{M}$  (—) solos o en presencia de Hfra 10 $\mu\text{M}$  (—),  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  (—), Hfra +  $\alpha$ -Syn (10/10 $\mu\text{M}$ ) (—), Yfh1 10 $\mu\text{M}$  (—) o Yfh1 +  $\alpha$ -Syn (10/10 $\mu\text{M}$ ) (—).

### 4.5.2. Estudio de la capacidad de secuestro de $\text{HO}^\bullet$

Los experimentos realizados mediante el método CUPRAC han demostrado que la  $\alpha$ -Syn y la Yfh1 secuestran radicales  $\text{HO}^\bullet$ . Sin embargo, no se ha observado este comportamiento para la Hfra. Además, la presencia simultánea de Hfra y  $\alpha$ -Syn en el medio de reacción inhibe la capacidad de la  $\alpha$ -Syn para secuestrar estos radicales (Figura 20A) y el efecto es proporcional a la concentración de Hfra (Anexo Fig. 5). Mientras que en presencia de Yfh1 y  $\alpha$ -Syn se obtiene un comportamiento intermedio al observado con las proteínas por separado (Figura 20B).



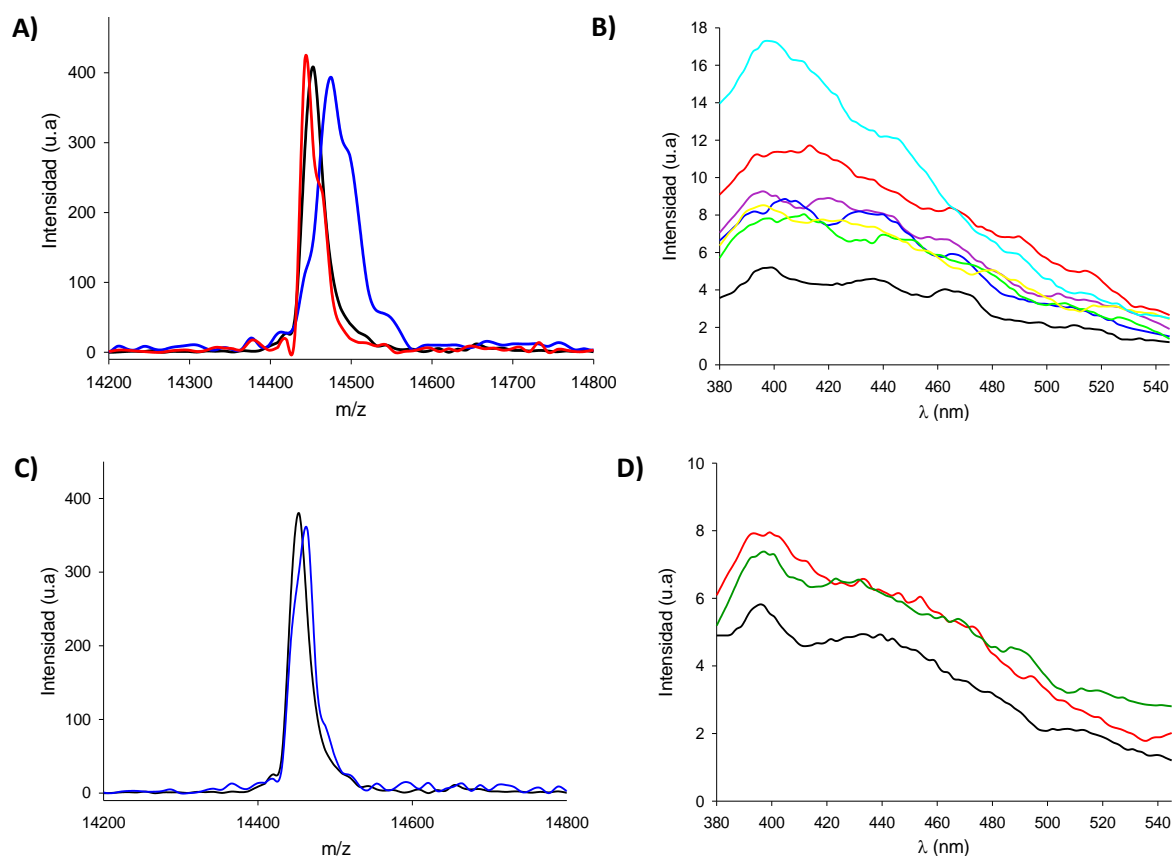
**Figura 20.** Estudio de la capacidad de la Hfra, la Yfh1 y la  $\alpha$ -Syn para secuestrar radicales  $\text{HO}^\bullet$ . Espectros de absorción de la reacción realizada por el método CUPRAC en ausencia de proteínas (—) y en presencia de Hfra 10  $\mu\text{M}$  (—),  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$  (—), Hfra 10  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$  (—), Yfh1 10  $\mu\text{M}$  (—), Yfh1 10  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -Syn 10  $\mu\text{M}$  (—).

#### 4.5.3. Efecto del secuestro de radicales libres sobre el peso molecular proteico y sobre el entrecruzamiento de residuos tirosina

Los espectros obtenidos por MALDI-TOF/TOF han evidenciado un incremento del peso molecular de la  $\alpha$ -Syn durante la degradación oxidativa del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 21A), lo cual puede relacionarse con la capacidad de la  $\alpha$ -Syn para secuestrar los radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HO}^\bullet$ , tal y como se ha demostrado en este trabajo (Figuras 19 y 20). Además, la oxidación sufrida por la  $\alpha$ -Syn al secuestrar estos radicales libres da lugar a la formación parcial de di-tirosina, lo cual ya fue propuesto por Al-Hilaly y col. quienes demostraron que los residuos tirosina de la  $\alpha$ -Syn se encuentran entrecruzados en los cuerpos de Lewy [Al-Hilaly, 2016]. A su vez, se ha comprobado que la tendencia de la  $\alpha$ -Syn a formar di-tirosina es proporcional a la concentración de AA y  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 21B). Por otro lado, la  $\alpha$ -Syn en presencia de AA y  $\text{Fe}^{3+}$  no sufre ningún tipo de oxidación (Figuras 21C y 21D), lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de la formación de radicales libres, donde se ha comprobado que la degradación del AA catalizada por  $\text{Fe}^{3+}$  no genera especies radicalarias (Figura 14D).

La Hfra también incrementa su peso molecular durante la degradación del AA en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , aunque el aumento de peso observado en su espectro MALDI-TOF/TOF (Figura 22A) no es tan importante como en el detectado para la  $\alpha$ -Syn, ya que la Hfra, a diferencia de la  $\alpha$ -Syn, no secuestra radicales  $\text{HO}^\bullet$  (Figura 20A). Además, los espectros de fluorescencia de la proteína ( $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ ) (Figura 22B) han demostrado que no se forman entrecruzamientos entre los residuos tirosina, ya sea porque los radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  secuestrados no interactúan con estos residuos o porque la estructura terciaria de la proteína impide que queden suficientemente cerca como para que tenga lugar el entrecruzamiento. Por otro lado, se ha comprobado que en presencia de AA y  $\text{Fe}^{3+}$  la proteína no secuestra radicales ni sufre entrecruzamientos en sus residuos tirosina (Figuras 22C y 22D).

La Yfh1, a diferencia del comportamiento observado con las otras dos proteínas, no sufre un aumento del peso molecular cuando la degradación del AA está catalizada por el  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 23A), lo que probablemente se debe a que su capacidad para inhibir la degradación del AA es mucho mayor que la de la Hfra y la  $\alpha$ -Syn (Figura 12), de tal manera que si el AA no se degrada, tampoco se forman radicales libres que pueden dañar su estructura. A su vez, se ha comprobado que durante la reacción no se entrecruzan los residuos tirosina de la proteína (Figura 23B). De igual manera, el comportamiento descrito en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , ha sido también observado al utilizar  $\text{Fe}^{3+}$  como catalizador (Figuras 23C y 23D).



**Figura 21.** Estudio de la capacidad de la  $\alpha$ -Syn para secuestrar los radicales libres generados durante la degradación oxidativa del AA. **A)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la  $\alpha$ -Syn a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M (—) o AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M (—). **B)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{ex}=325$ nm) de la  $\alpha$ -Syn a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M (—), AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M (—), AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 5 $\mu$ M (—), AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 10 $\mu$ M (—), AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 20 $\mu$ M (—) y AA 100 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 10 $\mu$ M (—). **C)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la  $\alpha$ -Syn a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 2,5 $\mu$ M (—). **D)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{ex}=325$ nm) de la  $\alpha$ -Syn a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 2,5 $\mu$ M (—) y AA 100 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 10 $\mu$ M (—). Los datos experimentales mostrados en los espectros de fluorescencia se han suavizado utilizando la función exponencial negativa del programa SigmaPlot.

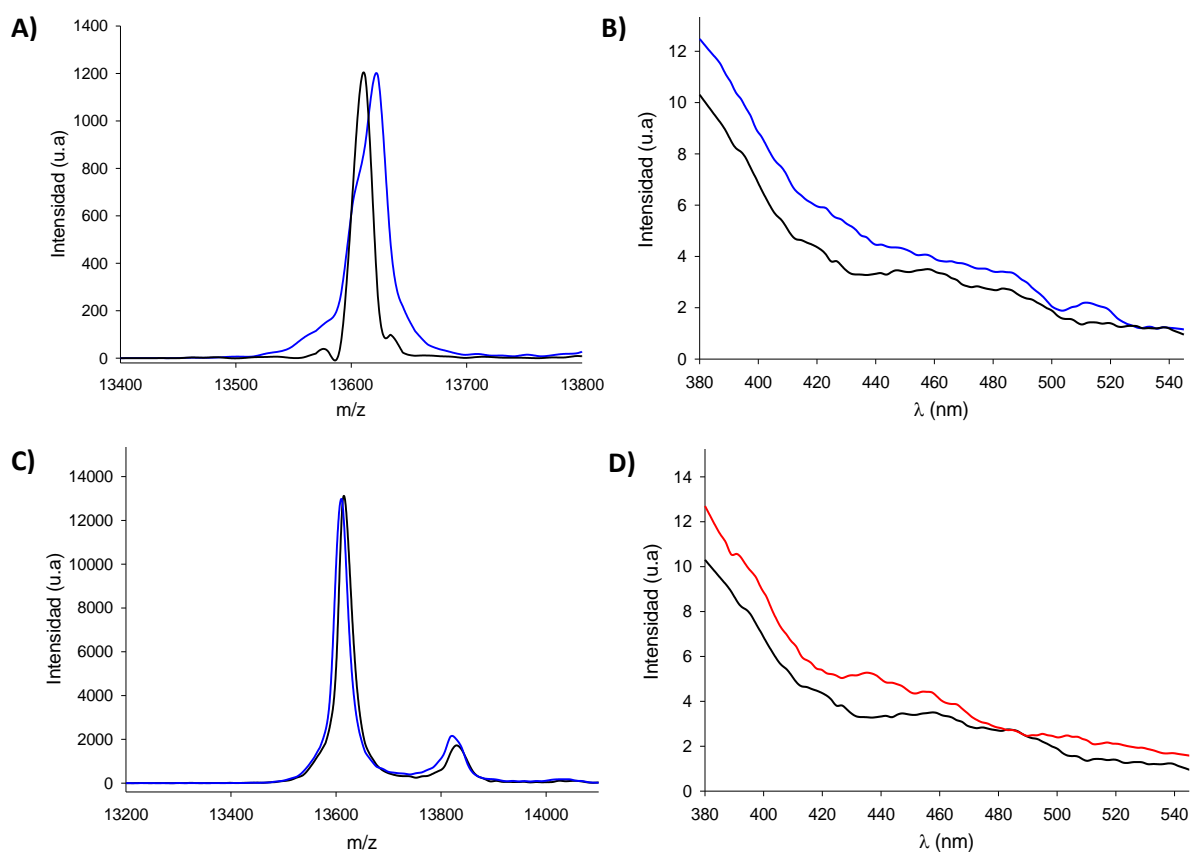
La presencia simultánea de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn en el medio de reacción inhibe la tendencia de la  $\alpha$ -Syn a secuestrar los radicales formados durante la degradación del AA catalizada por Cu<sup>2+</sup>, observando que el peso molecular de ambas proteínas se mantiene inalterado tras llevar a cabo la reacción. En el caso de la Hfra, se ha comprobado que su efecto inhibitor depende de la concentración de frataxina presente en el medio (Figuras 24A y 24B). Sin embargo, la presencia de Yfh1 inhibe por completo la tendencia de la  $\alpha$ -Syn para secuestrar radicales, incluso cuando la concentración de Yfh1 es inferior a la de la  $\alpha$ -Syn (Figura 25A). Asimismo, cuando la reacción de degradación del AA está catalizada por el Fe<sup>3+</sup> ninguna de las proteínas muestra un incremento en su peso molecular (Figuras 24C y 25B), tal y como se ha observado hasta ahora.

El hecho de que la Hfra haga que el peso molecular de la  $\alpha$ -Syn se mantenga inalterado después de haber sido incubada en presencia de AA y Cu<sup>2+</sup> debe estar relacionado con la capacidad de la Hfra para impedir que la  $\alpha$ -Syn secuestre radicales HO<sup>•</sup> y sugiere que la Hfra es capaz de proteger a la  $\alpha$ -Syn impidiendo que su estructura se vea dañada por el secuestro de radicales libres.

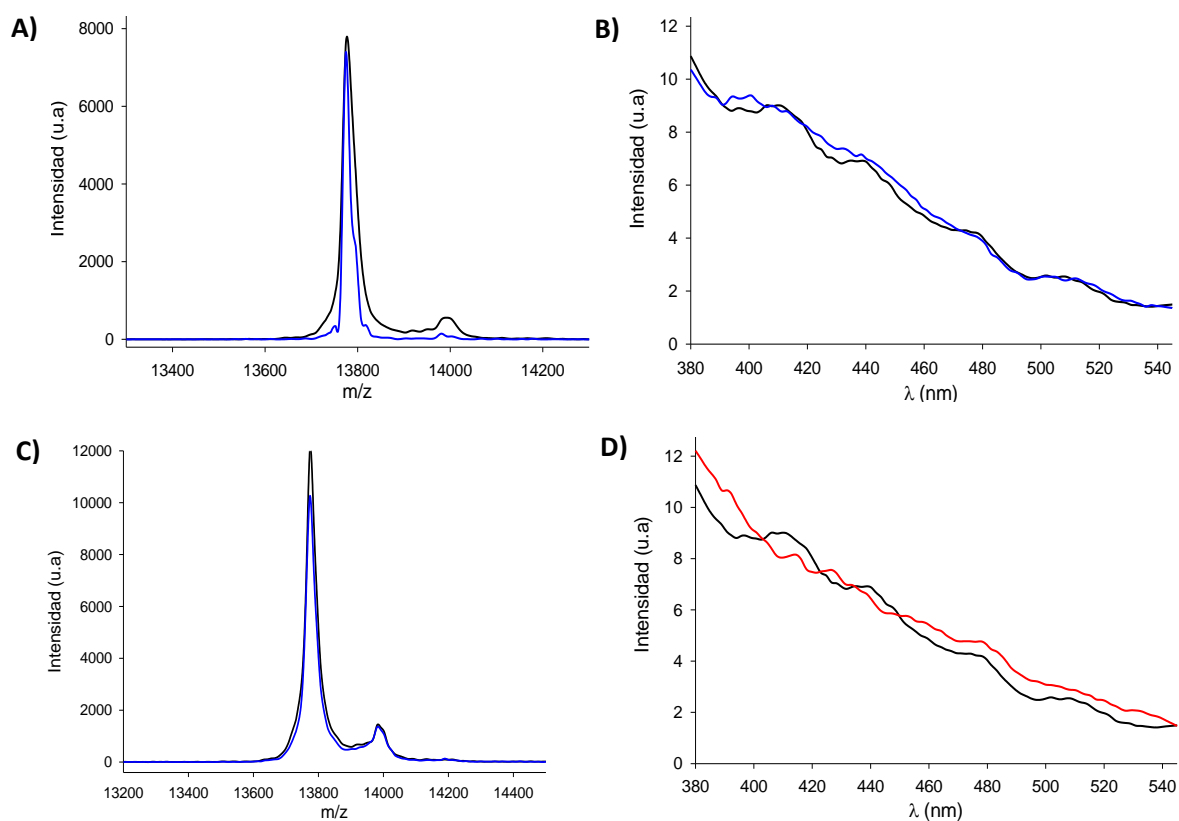


Por otro lado, el hecho de que el peso molecular de la Yfh1 y de la  $\alpha$ -Syn se mantenga inalterado cuando las dos proteínas se incuban de forma conjunta en presencia de AA y  $\text{Cu}^{2+}$  se puede atribuir a la gran capacidad de la Yfh1 para inhibir la degradación del AA, impidiendo la formación de radicales libres que puedan ser secuestrados por las dos proteínas.

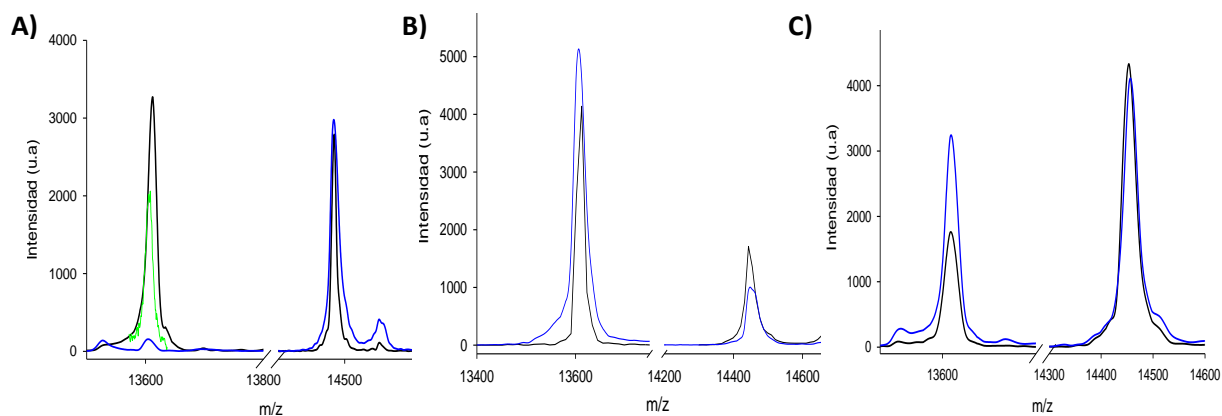
En base a los resultados obtenidos, el hecho de que la frataxina (Hfra o Yfh1) impida que la  $\alpha$ -Syn secuestre radicales libres apoya la idea de que esta proteína pueda ser utilizada farmacológicamente como terapia contra la EP [Kim, 2012], ya que impediría que proteínas como la  $\alpha$ -Syn puedan ser dañadas por las especies radicalarias y dar lugar a la formación de los cuerpos de Lewy presentes en las neuronas de pacientes con EP. Además, su presencia en la célula reduciría la formación de radicales libres, tal y como se ha demostrado en los experimentos en los que se ha estudiado la oxidación de la fluoresceína, por lo que la frataxina también podría ser utilizada como fármaco en otras enfermedades inducidas por las ROS.



**Figura 22.** Estudio de la capacidad de la Hfra para secuestrar los radicales libres generados durante la degradación oxidativa del AA. **A)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la Hfra a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 μM (—) o AA 70 μM +  $\text{Cu}^{2+}$  2,5 μM (—). **B)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ ) de la Hfra a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 100 μM +  $\text{Cu}^{2+}$  10 μM (—). **C)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la Hfra a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 μM +  $\text{Fe}^{3+}$  2,5 μM (—). **D)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ ) de la Hfra a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 100 μM +  $\text{Fe}^{3+}$  10 μM (—). Los datos experimentales mostrados en los espectros de fluorescencia se han suavizado utilizando la función exponencial negativa del programa SigmaPlot.

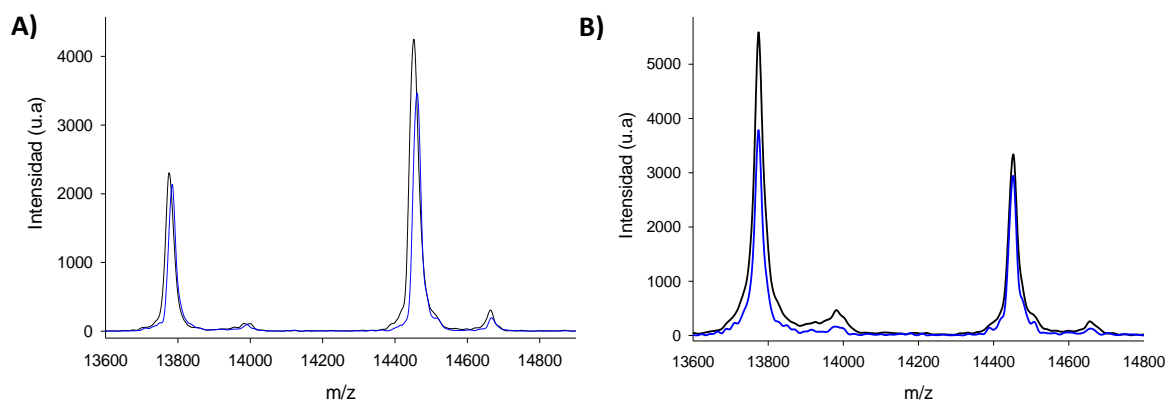


**Figura 23.** Estudio de la capacidad de la Yfh1 para secuestrar los radicales libres generados durante la degradación oxidativa del AA. **A)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la Yfh1 a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M (—) o AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M (—). **B)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ =325nm) de la Yfh1 a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 100 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 10 $\mu$ M (—). **C)** Espectro MALDI-TOF/TOF en el que se muestra la señal correspondiente a la Yfh1 a tiempo 0 (—) y tras 150 min de incubación en presencia de AA 70 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 2,5 $\mu$ M (—). **D)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ =325nm) de la Yfh1 a tiempo 0 (—) y después de 150 min de incubación en presencia de AA 100 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 10 $\mu$ M (—). Los datos experimentales mostrados en los espectros de fluorescencia se han suavizado utilizando la función exponencial negativa del programa SigmaPlot.



**Figura 24.** Estudio del efecto que causa la presencia conjunta de Hfra y  $\alpha$ -Syn sobre el secuestro de radicales procedentes de la degradación oxidativa del AA. Espectros MALDI-TOF/TOF de mezclas de reacción compuestas por: **A)** AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M + Hfra 5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M; **B)** AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M + Hfra 10 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M; **C)** AA 70 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 2,5 $\mu$ M + Hfra 5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M, a tiempo 0 (—) y tras 150 minutos de incubación (—). La línea verde de la figura A (—) muestra una ampliación de la señal procedente de la Hfra.

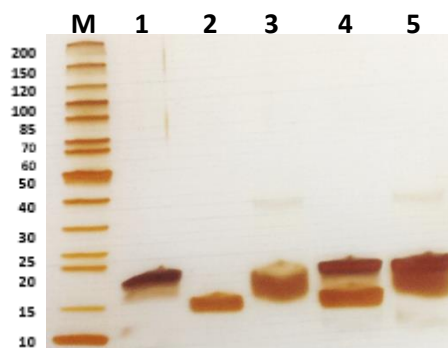




**Figura 25.** Estudio del efecto que causa la presencia conjunta de Yfh1 y  $\alpha$ -Syn sobre el secuestro de radicales procedentes de la degradación oxidativa del AA. Espectros MALDI-TOF/TOF de mezclas de reacción compuestas por: **A)** AA 70 $\mu$ M + Cu<sup>2+</sup> 2,5 $\mu$ M + Yfh1 5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M; **B)** AA 70 $\mu$ M + Fe<sup>3+</sup> 2,5 $\mu$ M + Yfh1 5 $\mu$ M +  $\alpha$ -Syn 10 $\mu$ M, a tiempo 0 (—) y tras 150 minutos de incubación (—).

#### 4.6. Estudio de la interacción de la frataxina humana y la frataxina de levadura con la $\alpha$ -sinucleína

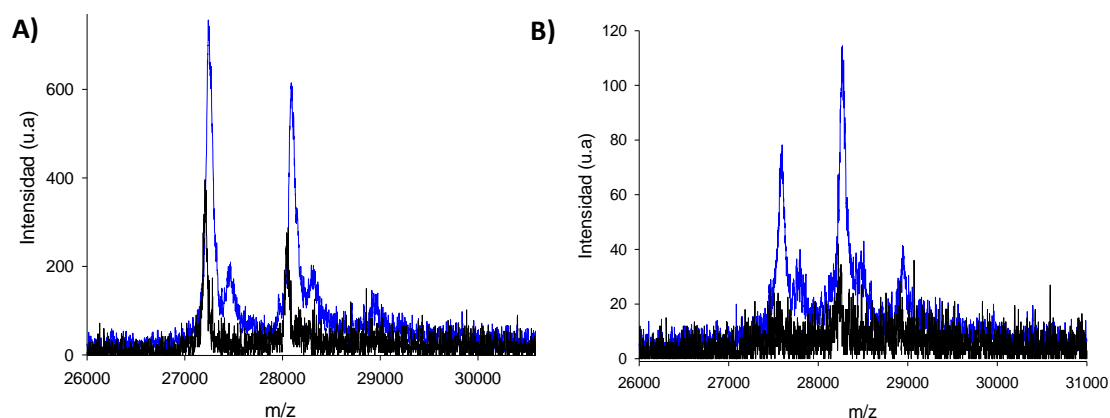
Después de analizar el efecto que causa la presencia simultánea de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn sobre la formación y el secuestro de ROS, se estudió si se produce algún tipo de interacción entre ambas proteínas. El gel SDS-PAGE obtenido después de incubar la mezcla de proteínas (Hfra +  $\alpha$ -Syn y Yfh1 +  $\alpha$ -Syn) en presencia de EGS (Figura 26) no evidenció la aparición de bandas debidas a la formación de oligómeros de frataxina y  $\alpha$ -Syn, lo que indica que las proteínas no se encuentran lo suficientemente cerca en la disolución como para interactuar. Sin embargo, la Yfh1 incubada con EGS dio lugar a la aparición de una banda en torno a los 40.000 Da, sugiriendo que la Yfh1 es capaz de interactuar consigo misma y de formar oligómeros. Este hecho puede estar relacionado con la presencia de residuos adicionales en el extremo N-terminal de la Yfh1 madura, respecto a la Hfra, los cuales pueden facilitar la formación de oligómeros, tal y como han sugerido algunos autores [O'Neill, 2005; Ahlgren, 2017].



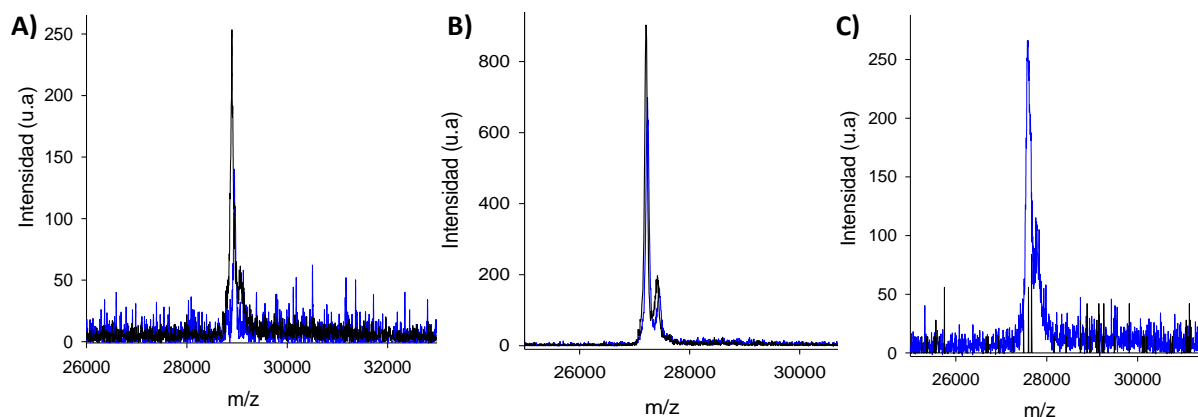
**Figura 26.** Gel SDS-PAGE de muestras compuestas por: 1)  $\alpha$ -Syn + EGS; 2) Hfra + EGS; 3) Yfh1 + EGS; 4)  $\alpha$ -Syn + Hfra + EGS; y 5)  $\alpha$ -Syn + Yfh1 + EGS. En todos los casos, la concentración de proteína fue 10  $\mu$ M y la de EGS 0,1mM. M hace referencia al marcador utilizado (peso en kDa) (Thermo Scientific 26614).

A partir de los espectros MALDI-TOF/TOF también se ha podido comprobar que la frataxina y la  $\alpha$ -Syn no interactúan entre sí en la disolución (Figura 27), ya que la aparición de picos en torno a los 30.000 Da se da tanto en presencia como en ausencia de EGS. Además, la aparición de estas señales ocurre tanto en las mezclas de frataxina y  $\alpha$ -Syn (Figura 27) como en las muestras de las proteínas

aisladas (Figura 28). Es por ello que la aparición de estas señales debe ser consecuencia de la interacción de las proteínas cuando son ionizadas por el láser del MALDI, no debido a la formación de enlaces covalentes mediante entrecruzamientos con EGS.



**Figura 27.** Estudio de la formación de dímeros de  $\alpha$ -Syn + Hfra (A) y  $\alpha$ -Syn + Yfh1 (B). Espectros MALDI-TOF/TOF de mezclas de proteína 10/10 $\mu$ M, en DT4, en ausencia (—) y en presencia (—) de EGS (0,1mM). Los pesos moleculares aproximados de las proteínas son: 14.450 Da ( $\alpha$ -Syn), 13.600 Da (Hfra) y 13.770 Da (Yfh1).



**Figura 28.** Estudio de la formación de dímeros de  $\alpha$ -Syn (A), Hfra (B) y Yfh1 (C). Espectros MALDI-TOF/TOF de muestras de proteína 10 $\mu$ M, en DT4, en ausencia (—) y en presencia (—) de EGS (0,1mM). Los pesos moleculares aproximados de las proteínas son: 14.450 Da ( $\alpha$ -Syn), 13.600 Da (Hfra) y 13.770 Da (Yfh1).

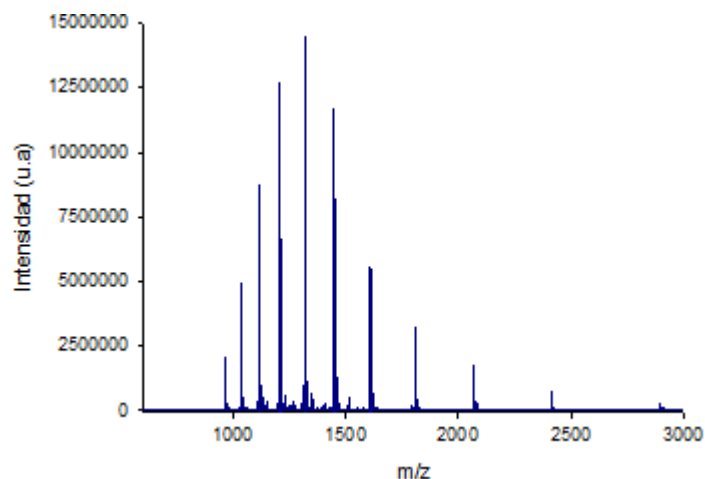
Estos resultados sugieren que el efecto protector de la frataxina sobre la  $\alpha$ -Syn frente al estrés oxidativo comprobado en este trabajo no implica la interacción de las proteínas, sino que la simple presencia de frataxina en el medio es capaz de evitar que proteínas como la  $\alpha$ -Syn sean oxidadas por las ROS.

## 5. CONCLUSIONES

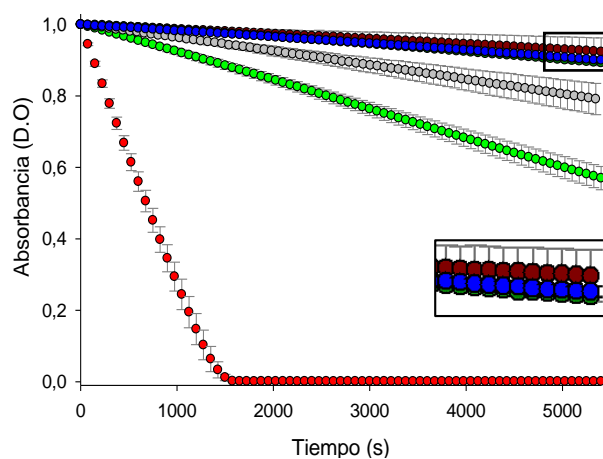
Con el fin de estudiar la actividad antioxidante de las frataxinas (Hfra y Yfh1), en este trabajo de fin de máster se ha analizado la capacidad de estas proteínas para inhibir la formación de ROS procedentes de la degradación oxidativa del AA y su capacidad para secuestrar radicales libres. Además, con el objetivo de determinar si la presencia de frataxina es capaz de proteger a la  $\alpha$ -Syn del estrés oxidativo, se ha estudiado la capacidad de inhibición y de secuestro de ROS de la mezcla de frataxina y  $\alpha$ -Syn y se ha analizado si los resultados se deben a la interacción entre ambas proteínas. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo han permitido concluir que:

- a) La velocidad de degradación del AA en ausencia de proteínas es directamente proporcional a la concentración de fosfato e inversamente proporcional a la concentración de NaCl utilizadas para preparar la disolución tampón con la que se ha abordado el trabajo.
- b) La capacidad de las proteínas (Hfra, Yfh1 y  $\alpha$ -Syn) para inhibir la degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  está relacionada con la afinidad de las mismas por el catión metálico, de manera que cuanto mayor es ésta, menor es la velocidad de degradación del AA. Además, la presencia de determinadas regiones secuenciales en la proteína puede acelerar la degradación estudiada. Así, la capacidad de las proteínas para inhibir la degradación del AA sigue el orden:  $\text{Yfh1} > \alpha\text{-Syn} > \text{Hfra}$ .
- c) Las tres proteínas utilizadas en este trabajo (Hfra, Yfh1 y  $\alpha$ -Syn) son capaces de inhibir la formación de radicales libres procedentes de la degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  y de retrasar la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto si el catalizador es el  $\text{Cu}^{2+}$  como el  $\text{Fe}^{3+}$ , reduciendo así la concentración de ROS que se generan.
- d) La  $\alpha$ -Syn secuestra radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HO}^{\bullet}$  dando lugar a un aumento de su peso molecular y al entrecruzamiento parcial de residuos tirosina. La Hfra también secuestra radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y sufre oxidaciones que se ven reflejadas en el aumento de su peso molecular. Sin embargo, sus residuos tirosina no se entrecruzan. La Yfh1, a pesar de ser capaz de secuestrar radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HO}^{\bullet}$ , inhibe por completo la degradación del AA evitando que su estructura se vea dañada por el secuestro de radicales.
- e) La presencia conjunta de frataxina (Hfra o Yfh1) y  $\alpha$ -Syn dirige la degradación del AA catalizada por  $\text{Fe}^{3+}$  hacia la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo ésta la ROS menos reactiva que podría generarse.
- f) La presencia conjunta de Hfra y  $\alpha$ -Syn protege a la  $\alpha$ -Syn del daño oxidativo causado por los radicales  $\text{HO}^{\bullet}$ , inhibiendo la capacidad de ésta para secuestrarlos.
- g) La presencia conjunta de Yfh1 y  $\alpha$ -Syn no hace que la  $\alpha$ -Syn pierda su capacidad para secuestrar radicales libres. Sin embargo, la Yfh1 es capaz de inhibir por completo la degradación del AA, impidiendo que se generen las ROS correspondientes. Es por ello que la Yfh1 también protege a la  $\alpha$ -Syn del daño oxidativo.
- h) El efecto protector de la frataxina (Hfra o Yfh1) sobre la  $\alpha$ -Syn no se debe a interacciones físico-químicas entre las dos proteínas.

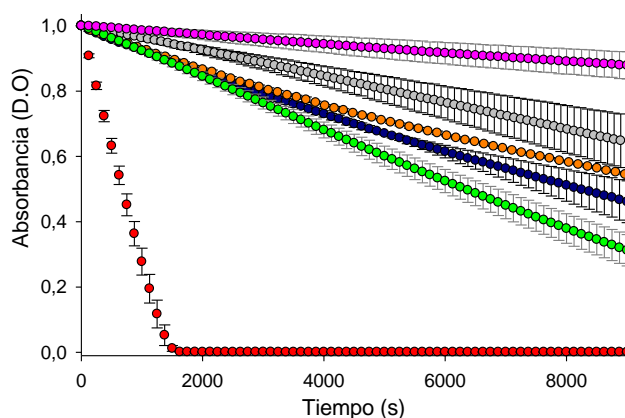
## 6. ANEXOS



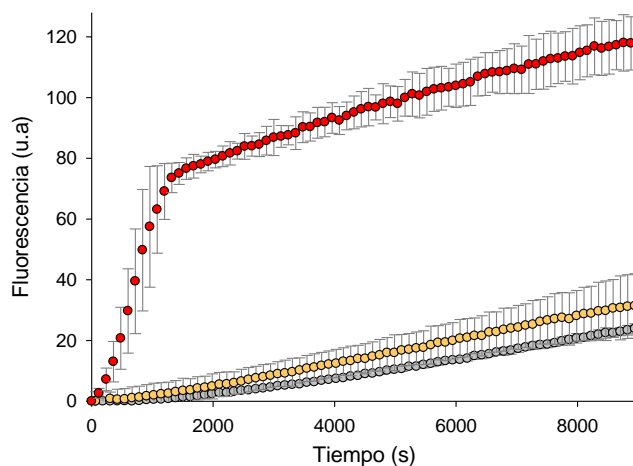
**Figura A1.** Espectro de masas ESI-Orbitrap de la  $\alpha$ -Syn producida y purificada en este trabajo. Utilizando el programa *Protein Deconvolution 3.0* (Thermo) se ha podido determinar el peso molecular exacto de la proteína (14451,263 Da).



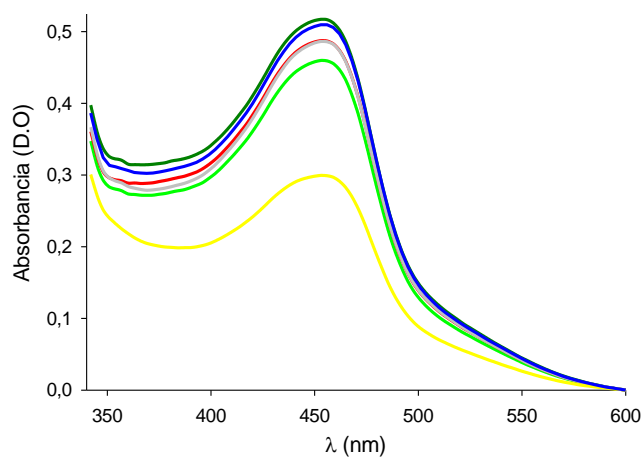
**Figura A2.** Degradación del ácido ascórbico solo ( $\bullet$ ) y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), EDTA 5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), EDTA 5 $\mu\text{M}$  +  $\text{Cu}^{2+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) y EDTA 5 $\mu\text{M}$  +  $\text{Fe}^{3+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). En todos los casos la concentración de AA es 70 $\mu\text{M}$ . En la figura se muestra una ampliación de los tres perfiles cinéticos obtenidos al añadir EDTA al medio de reacción para poder apreciar la diferencia de absorbancia con mayor claridad.



**Figura A3.** Degradación del ácido ascórbico solo ( $\bullet$ ) y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  2,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ),  $\alpha$ -Syn 10 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), Hfra 10 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) y Yfh1 0,5 $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). En todos los casos la concentración de AA es 70 $\mu\text{M}$ .



**Figura A4.** Formación de radicales  $\text{HO}^\bullet$  procedentes de la degradación del AA catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Medición de la intensidad de fluorescencia a 450nm ( $\lambda_{\text{exc}}=395\text{nm}$ ) del Ácido 7-OH-3-Coumarin Carboxílico en presencia de AA  $70\ \mu\text{M}$  ( $\square$ ), AA  $70\ \mu\text{M}$  +  $\text{Cu}^{2+}$   $2,5\ \mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) y AA  $70\ \mu\text{M}$  +  $\text{Fe}^{3+}$   $2,5\ \mu\text{M}$  ( $\circ$ ).



**Figura A5.** Estudio de la capacidad de la Hfra para inhibir el secuestro de radicales  $\text{HO}^\bullet$  por parte de la  $\alpha\text{-Syn}$ . Espectros de absorción de la reacción realizada por el método CUPRAC en ausencia de proteínas ( $\text{—}$ ) y en presencia de Hfra  $10\ \mu\text{M}$  ( $\text{—}$ ),  $\alpha\text{-Syn}$   $10\ \mu\text{M}$  ( $\text{—}$ ), Hfra  $10\ \mu\text{M}$  +  $\alpha\text{-Syn}$   $10\ \mu\text{M}$  ( $\text{—}$ ), Hfra  $5\ \mu\text{M}$  +  $\alpha\text{-Syn}$   $10\ \mu\text{M}$  ( $\text{—}$ ) y Hfra  $2,5\ \mu\text{M}$  +  $\alpha\text{-Syn}$   $10\ \mu\text{M}$  ( $\text{—}$ ).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [Abeliovich, 2000] A. Abeliovic, Y. Schmitz, I. Fariñas et al. 'Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System', *Neuron*, **2000**, 25, 239–52.
- [Adamec, 2000] J. Adamec, F. Rusnak, W. Owen et al. 'Iron-Dependent Self-Assembly of Recombinant Yeast Frataxin: Implications for Friedreich Ataxia', *Am. J. Hum. Genet.*, **2000**, 67, 549–62.
- [Adinolfi, 2002] S. Adinolfi, M. Trifuoggi, A. Politou et al. 'A Structural Approach to Understanding the Iron-Binding Properties of Phylogenetically Different Frataxins', *Hum. Mol. Genet.*, **2002**, 11, 1865–77.
- [Adinolfi, 2004] S. Adinolfi, M. Nair, A. Politou et al. 'The Factors Governing the Thermal Stability of Frataxin Orthologues: How to Increase a Protein's Stability', *Biochemistry*, **2004**, 43.21, 6511–18.
- [Adinolfi, 2009] S. Adinolfi, C. Iannuzzi, F. Prischi et al. 'Bacterial Frataxin CyaY Is the Gatekeeper of Iron-Sulfur Cluster Formation Catalyzed by IscS', *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, 16, 390–96.
- [Adrover, 2010] M. Adrover, V. Esposito, G. Martorell et al. 'Understanding Cold Denaturation: The Case Study of Yfh1', *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16240–46.
- [Ahlgren, 2017] E. Ahlgren, M. Fekry, M. Wiemann et al. 'Iron-Induced Oligomerization of Human FXN81-210 and Bacterial CyaY Frataxin and the Effect of Iron Chelators', *PLoS ONE*, **2017**, 12, 1–25.
- [Ahmad, 2008] M. Ahmad, D. Singh, A. Taiyab et al. 'Selective Cu<sup>2+</sup> Binding, Redox Silencing, and Cytoprotective Effects of the Small Heat Shock Proteins  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-Crystallin', *J. Mol. Biol.*, **2008**, 382, 812–24.
- [Al-Hilaly, 2016] Y. Al-Hilaly, L. Biasetti, B. Blakeman et al. 'The Involvement of Dityrosine Crosslinking in  $\alpha$ -Synuclein Assembly and Deposition in Lewy Bodies in Parkinson's Disease', *Scientific Reports*, **2016**, 6, 1–13.
- [Baba, 1998] M. Baba, S. Nakajo, P. Tu et al. 'Aggregation of Alpha-Synuclein in Lewy Bodies of Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies.', *Am. J. Pathol.*, **1998**, 152, 879–84.
- [Bencze, 2006] K. Bencze, K. Kondapalli, J. Cook et al. 'The Structure and Function of Frataxin', *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.*, **2006**, 41, 269–91.
- [Bencze, 2007] K. Bencze, T. Yoon, C. Millán-Pacheco et al. 'Human Frataxin: Iron and Ferrochelatase Binding Surface', *Chem. Commun.*, **2007**, 1, 1798–1800.
- [Béraud, 2013] D. Béraud, H. Hathaway, J. Trecki et al. 'Microglial Activation and Antioxidant Responses Induced by the Parkinson's Disease Protein  $\alpha$ -Synuclein', *J. Neuroimmune Pharm.*, **2013**, 8, 94–117.
- [Binolfi, 2008] A. Binolfi, G. Lamberto, R. Duran et al. 'Site-Specific Interactions of Cu(II) with  $\alpha$  and  $\beta$ -Synuclein: Bridging the Molecular Gap between Metal Binding and Aggregation', *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 11801-11812.

- [Binolfi, 2010] A. Binolfi, E. Rodriguez, D. Valensin et al. 'Bioinorganic Chemistry of Parkinson's Disease: Structural Determinants for the Copper-Mediated Amyloid Formation of Alpha-Synuclein', *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 10668-10679.
- [Birben, 2012] E. Birben, U. Murat, M. Sahiner et al. 'Oxidative Stress and Antioxidant Defense', *WAO Journal*, **2012**, 5, 9–19.
- [Bodner, 2009] C. Bodner, C. Dobson y A. Bax. 'Multiple Tight Phospholipid-Binding Modes of  $\alpha$ -Synuclein Revealed by Solution NMR', *J. Mol. Biol.*, **2009**, 390, 775–90.
- [Bou-Abdallah, 2004] F. Bou-Abdallah, S. Adinolfi, A. Pastore et al. 'Iron Binding and Oxidation Kinetics in Frataxin CyaY of Escherichia Coli', *J. Mol. Biol.*, **2004**, 341, 605–15.
- [Branda, 1999] S. Branda, P. Cavadini, J. Adamec et al. 'Yeast and Human Frataxin Are Processed to Mature Form in Two Sequential Steps by the Mitochondrial Processing Peptidase', *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 22763–69.
- [Breydo, 2012] L. Breydo, J. Wu y V. Uversky, ' $\alpha$ -Synuclein Misfolding and Parkinson's Disease', *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 1822, 261–85.
- [Britti, 2018] E. Britti, F. Delaspre, A. Feldman et al. 'Frataxin-Deficient Neurons and Mice Models of Friedreich Ataxia Are Improved by TAT-MTScs-FXN Treatment', *J. Cell. Mol. Med.*, **2018**, 22, 834–48.
- [Brown, 2007] D. Brown. 'Interactions between Metals and  $\alpha$ -Synuclein - Function or Artefact?', *FEBS Journal*, **2007**, 274, 3766–74.
- [Bulteau, 2004] A. Bulteau, H. O'Neill, M. Kennedy et al. 'Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity', *Science*, **2004**, 305, 242-5.
- [Burré, 2015] J. Burré. 'The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein', *J. Parkinson Dis*, **2015**, 5, 699–713.
- [Cacabelos, 2017] R. Cacabelos. 'Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics', *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18.
- [Campuzano, 1996] V. Campuzano, L. Montermini, M. Molto et al. 'Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion', *Science*, **1996**, 271, 1423-27.
- [Campuzano, 1997] V. Campuzano, L. Montermini, Y. Lutz et al. 'Frataxin Is Reduced in Friedreich Ataxia Patients and Is Associated with Mitochondrial Membranes.', *Hum. Mol. Genet.*, **1997**, 6, 1771–80.
- [Cavadini, 2000] P. Cavadini, J. Adamec, F. Taroni et al. 'Two-Step Processing of Human Frataxin by Mitochondrial Processing Peptidase: Precursor and Intermediate Forms Are Cleaved at Different Rates', *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 41469–75.
- [Chen, 1995] X. Chen, H. de Silva, M. Pettenati et al. 'The Human NACP/ $\alpha$ -Synuclein Gene: Chromosome Assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP Analysis', *Genomics*, **1995**, 26, 425–27.
- [Chen, 2004] O. Chen, R. Crisp, M. Valachovic et al., 'Transcription of the Yeast Iron Regulon Does Not Respond Directly to Iron but Rather to Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis', *J. Biol. Chem.*, **2002**, 279, 29513–18.

- [Ciric, 2015] D. Ciric, C. Richard, M. Moudjou et al. 'Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway', *J. Virol.*, **2015**, 89, 6287–93.
- [Condò, 2006] I. Condò, N. Ventura, F. Malisan et al. 'A Pool of Extramitochondrial Frataxin That Promotes Cell Survival', *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 16750–56.
- [Condò, 2007] I. Condò, N. Ventura, F. Malisan et al. 'In Vivo Maturation of Human Frataxin', *Hum. Mol. Genet.*, **2007**, 16, 1534–40.
- [Cook, 2006] J. Cook, K. Bencze, A. Jankovic et al. 'Monomeric Yeast Frataxin Is an Iron Binding Protein.', *Biochemistry*, **2006**, 45, 7767–77.
- [Correia, 2009] A. Correia, S. Ow, P. Wright et al. 'The Conserved Trp155 in Human Frataxin as a Hotspot for Oxidative Stress Related Chemical Modifications', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, 390, 1007–11.
- [Correia, 2010] A. Correia, T. Wang, E. Craig et al. 'Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the acidic ridge region', *Biochem J*, **2010**, 426, 197-203.
- [Correia, 2012] M. Correia, M. Neves-Petersen, P. Jeppesen et al. 'UV-Light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Dishulphide Bond Photolysis', *PLOS One*, **2012**, 12.
- [Covarrubias-Pinto, 2015] A. Covarrubias-Pinto, P. Moll, M. Solís-Maldonado et al. 'Beyond the Redox Imbalance: Oxidative Stress Contributes to an Impaired GLUT3 Modulation in Huntington's Disease', *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, 89, 1085–96.
- [Cox, 2014] D. Cox, J. Carver y H. Ecroyd, 'Preventing  $\alpha$ -Synuclein Aggregation: The Role of the Small Heat-Shock Molecular Chaperone Proteins', *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1842, 1830–43.
- [Crowther, 1998] R. Crowther, R. Jakes, M. Spillantini et al. 'Synthetic Filaments Assembled from C-Terminally Truncated  $\alpha$ -Synuclein', *FEBS Lett.*, **1998**, 436, 309–12.
- [Dawson, 2003] T. Dawson y V. Dawson, 'Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease', *Science*, **2003**, 302, 819–22.
- [Deleersnijder, 2013] A. Deleersnijder, M. Gerard, Z. Debyser et al. 'The remarkable conformational plasticity of  $\alpha$ -synuclein: blessing or curse?', *Trends Mol. Med*, **2013**, 19, 368-77.
- [Ding, 2007] H. Ding, J. Yang, L. Coleman et al. 'Distinct Iron Binding Property of Two Putative Iron Donors for the Iron-Sulfur Cluster Assembly: IscA and the Bacterial Frataxin Ortholog CyaY under Physiological and Oxidative Stress Conditions', *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 7997–8004.
- [Fernández, 2004] C. Fernández, W. Hoyer, M. Zweckstetter et al. 'NMR of  $\alpha$ -Synuclein-Polyamine Complexes Elucidates the Mechanism and Kinetics of Induced Aggregation', *EMBO Journal*, **2004**, 23, 2039–46.
- [Foury, 1999] F. Foury. 'Low Iron Concentration and Aconitase Deficiency in a Yeast Frataxin Homologue Deficient Strain', *FEBS Letters*, **1999**, 456, 281–84.
- [Gakh, 2002] O. Gakh, J. Adamec, A. Gacy et al. 'Physical Evidence That Yeast Frataxin Is an Iron Storage Protein', *Biochemistry*, **2002**, 41, 6798–6804.



- [Gasteiger, 2005] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker et al. 'Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server' in J. M. Walker: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, **2005**, 571-607.
- [Giasson, 2001] B. I. Giasson, I. Murray, J. Trojanowski et al. 'A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of  $\alpha$ -Synuclein Is Essential for Filament Assembly', *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 2380-86.
- [Gibson, 1996] T. Gibson, E. Koonin, G. Musco et al. 'Friedreich's Ataxia Protein: Phylogenetic Evidence for Mitochondrial Dysfunction', *Trends Neurosci.*, **1996**, 19, 465-68.
- [González-Cabo, 2005] P. González-Cabo, R. Vázquez-Manrique, M. García-Gimeno et al. 'Fratxin Interacts Functionally with Mitochondrial Electron Transport Chain Proteins', *Hum. Molec. Genet.*, **2005**, 14, 2091-98.
- [Hamani, 2003] C. Hamani y A. Lozano, 'Physiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease', *Ann. New York Acad. Sci.*, **2003**, 991, 15-21.
- [Han, 2017] T. Han, J. Camadro, R. Santos et al. 'Mechanisms of Iron and Copper-Fratxin Interactions', *Metallomics*, **2017**, 9, 1073-85.
- [Harel, 1994] S. Harel. 'Oxidation of Ascorbic Acid and Metal Ions as Affected by NaCl', *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 2402-6.
- [Hashimoto, 1998] M. Hashimoto, L. Hsu, A. Sisk et al. 'Human Recombinant NACP/ $\alpha$ -Synuclein Is Aggregated and Fibrillated in Vitro: Relevance for Lewy Body Disease', *Brain Research*, **1998**, 799, 301-6.
- [Hashimoto, 1999] M. Hashimoto, Hsu, Y. Xia et al. 'Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ $\alpha$ -synuclein in vitro', *Neuroreport*, **1999**, 10, 717-21.
- [He, 2004] Y. He, S. Alam, S. Proteasa et al. 'Yeast Frataxin Solution Structure, Iron Binding, and Ferrochelatase Interaction', *Biochemistry*, **2002**, 43, 16254-62.
- [Jackson, 1998] T. Jackson, A. Xu, J. Vita et al. 'Ascorbate Prevents the Interaction of Superoxide and Nitric Oxide Only at Very High Physiological Concentrations', *Circ. Res.*, **1998**, 2, 916-23.
- [Karlberg, 2006] T. Karlberg, U. Schagerlöf, O. Gakh et al. 'The Structures of Frataxin Oligomers Reveal the Mechanism for the Delivery and Detoxification of Iron', *Structure*, **2006**, 14, 1535-46.
- [Kastelic, 2015] M. Kastelic, Y. Kalyuzhnyi, B. Hribar-L et al. 'Protein Aggregation in Salt Solutions', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2015**, 112, 6766-70.
- [Kim, 2012] M. Kim, D. Kim, H. Jeong et al. 'Tat-Fratxin Protects Dopaminergic Neuronal Cells against MPTP-Induced Toxicity in a Mouse Model of Parkinson's Disease', *Biochimie*, **2012**, 94, 2448-56.
- [Koutnikova, 1997] H. Koutnikova, V. Campuzano, F. Foury et al. 'Studies of Human, Mouse and Yeast Homologues Indicate a Mitochondrial Function for Frataxin', *Nature Genetics*, **1997**, 16, 345-51.
- [Lane, 2010] D. R. Lane y D. R. Richardson, 'Fratxin, a Molecule of Mystery: Trading Stability for Function in Its Iron-Binding Site', *Biochem. J.*, **2010**, 426.

- [Larumbe, 2009] R. Larumbe. 'Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson', *An. Sist. Sanit. Navar.*, **2009**, 21, 187-196.
- [Lesuisse, 2003] E. Lesuisse, R. Santos, B. Matzanke et al. 'Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue', *Hum. Molec. Genet*, **2003**, 12, 879–89.
- [Lodi, 1999] R. Lodi, J. Cooper, J. Bradley et al. 'Deficit of in Vivo Mitochondrial ATP Production in Patients with Friedreich Ataxia', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 11492–95.
- [Lupoli, 2017] F. Lupoli, T. Vannocci, G. Longo et al. 'The Role of Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia', *FEBS Letters*, **2018**, 592, 718–27.
- [Madine, 2006] J. Madine, Doig y Middleton. 'Study of the regional effects of  $\alpha$ -synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers', *Biochem*, **2006**, 45, 5783-92.
- [Maroteaux, 1988] L. Maroteaux, Campanelli y Scheller, 'Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal', *Neurosci*, **1988**, 8, 2804–15.
- [McCord, 2001] J. McCord, 'Analysis of superoxide dismutase activity', *Curr. Protoc. Toxicol.*, **2001**, 7.
- [Murray, 2003] I. Murray, B. Giasson, S. Quinn et al. 'C-Terminal Truncation: Role of Alpha-Synuclein Carboxy-Terminus on Fibril Formation in Vitro', *Biochemistry*, **2003**, 42, 8530–40.
- [Musco, 2000] G. Musco, G. Stier, B. Kolmerer et al. 'Towards a Structural Understanding of Friedreich's Ataxia: Solution Structure of Frataxin', *Structure*, **2000**, 8, 695–707.
- [Musgrove, 2013] R. Musgrove, A. King y T. Dickson, ' $\alpha$ -Synuclein Protects Neurons from Apoptosis Downstream of Free-Radical Production through Modulation of the MAPK Signalling Pathway', *Neurotox. Res.*, **2013**, 23, 358–69.
- [Nair, 2004] M. Nair, S. Adinolfi, C. Pastore et al. 'Solution Structure of the Bacterial Frataxin Ortholog, CyaY: Mapping the Iron Binding Sites', *Structure*, **2004**, 12, 2037–48.
- [Ono, 2011] K. Ono, T. Ikeda, J. Takasaki et al. 'Familial Parkinson Disease Mutations Influence  $\alpha$ -Synuclein Assembly', *Neurobiol. Dis.*, **2011**, 43, 715–24.
- [O'Neill, 2005] H. O'Neill, O. Gakh, S. Park et al. 'Assembly of Human Frataxin Is a Mechanism for Detoxifying Redox-Active Iron', *Biochemistry*, **2005**, 44, 537–45.
- [Ou, 2002] B. Ou, M. Hampsch-woodill y J. Flanagan, 'Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention', *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2772–77.
- [Özyürek, 2008] M. Ozyürek, B. Bektasoglu, K. Güçlü et al. 'Hydroxyl Radical Scavenging Assay of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method Using Catalase for Hydrogen Peroxide Degradation.', *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 616, 196–206.
- [Özyürek, 2011] M. Özyürek, K. Güçlü y R. Apak, 'The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement', *Trends Analyt. Chem.*, **2011**, 30, 652–64.
- [Paik, 1999] S. Paik, H. Shin, J. Lee et al. 'Copper(II)-Induced Self-Oligomerization of  $\alpha$ -Synuclein', *Biochem. J.*, **1999**, 340, 821–28.

- [Pandolfo, 2009] M. Pandolfo y A. Pastore, 'The Pathogenesis of Friedreich Ataxia and the Structure and Function of Frataxin', *J. Neurol.*, **2009**, 256, 9–17.
- [Park, 2002] S. Park, O. Gakh, S. Mooney et al. 'The Ferroxidase Activity of Yeast Frataxin', *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 38589–95.
- [Pastore, 2013] A. Pastore y H. Puccio, 'Frataxin: A Protein in Search for a Function', *J. Neurochem.*, **2013**, 126, 43–52.
- [Pedersen, 2016] J. Pedersen, S. Chen, C. Borg et al. 'Amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ -Synuclein Decrease the Level of Metal-Catalyzed Reactive Oxygen Species by Radical Scavenging and Redox Silencing', *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 3966–69.
- [Peng, 2010] Y. Peng, C. Wang, H. Xu et al. 'Binding of  $\alpha$ -Synuclein with Fe(III) and with Fe(II) and Biological Implications of the Resultant Complexes', *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 365–70.
- [Pérez, 2002] R. Pérez, J. Waymire, E. Lin et al. 'A Role for  $\alpha$ -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis', *J. Neurosci.*, **2002**, 22, 3090–99.
- [Perrin, 2000] R. Perrin, W. Woods, D. Clayton et al. 'Interaction of Human  $\alpha$ -Synuclein and Parkinson's Disease Variants with Phospholipids: Structural Analysis Using Site-Directed Mutagenesis', *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 34393–98.
- [Poirier, 2002] M. Poirier, H. Li, J. Macosko et al. 'Huntingtin Spheroids and Protofibrils as Precursors in Polyglutamine Fibrilization', *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 41032–37.
- [Prischi, 2009] F. Prischi, C. Giannini, S. Adinolfi et al. 'The N-Terminus of Mature Human Frataxin Is Intrinsically Unfolded', *FEBS Journal*, **2009**, 276, 6669–76.
- [Puccio, 2001] H. Puccio, D. Simon, M. Cossée et al. 'Mouse Models for Friedreich Ataxia Exhibit Cardiomyopathy, Sensory Nerve Defect and Fe-S Enzyme Deficiency Followed by Intramitochondrial Iron Deposits', *Nat. Genet.*, **2001**, 27, 181–86.
- [Ramazzotti, 2004] A. Ramazzotti, V. Vanmansart y F. Foury, 'Mitochondrial Functional Interactions between Frataxin and Isu1p, the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein, in *Saccharomyces Cerevisiae*', *FEBS Letters*, **2004**, 557, 215–20.
- [Ranjan, 2017] P. Ranjan, D. Ghosh, D. Yarramala et al. 'Differential Copper Binding to Alpha-Synuclein and Its Disease-Associated Mutants Affect the Aggregation and Amyloid Formation', *Biochim. Biophys. Acta*, **2017**, 1861, 365–74.
- [Rascol, 2002] O. Rascol, C. Goetz, W. Koller et al. 'Treatment Interventions for Parkinson's Disease: An Evidence Based Assessment', *Lancet*, **2002**, 359, 1589–98.
- [Ristow, 2000] M. Ristow, M. Pfister, Yee et al. 'Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation', *Proc Natl Acad Sci*, **2000**, 97, 12239.
- [Rötig, 1997] A. Rötig, P. de Lonlay, D. Chretien et al. 'Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia', *Nat. Genet.*, **1997**, 15, 57–61.
- [Runko, 2008] A. Runko, A. Griswold y K. Min, 'Overexpression of Frataxin in the Mitochondria Increases Resistance to Oxidative Stress and Extends Lifespan in *Drosophila*', *FEBS Letters*, **2008**, 582, 715–19.
- [Serpell, 2000] L. Serpell, J. Berriman, R. Jakes et al. 'Fiber Diffraction of Synthetic Alpha - Synuclein Filaments Shows Amyloid-like Cross-Beta Conformation', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, 97, 4897–4902.

- [Shults, 2006] C. Shults, 'Lewy Bodies', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103, 1661–68.
- [Sirota, 2012] T. Sirota, 'Use of Nitro Blue Tetrazolium in the Reaction of Adrenaline Autooxidation for the Determination of Superoxide Dismutase Activity', *Biochemistry*, **2012**, 6, 254–60.
- [Spillantini, 1997] M. Spillantini, M. Schmidt, V. Lee et al. 'Alpha-Synuclein in Lewy Bodies', *Nature*, **1997**, 388, 839–40.
- [Sun, 2015] Y. Sun, B. Yang, Y. Wu et al. 'Structural Characterization and Antioxidant Activities of  $\kappa$ -Carrageenan Oligosaccharides Degraded by Different Methods', *Food Chemistry*, **2015**, 178, 311–18.
- [Sung, 2006] Y. Sung, C. Rospigliosi y D. Eliezer, 'NMR Mapping of Copper Binding Sites in Alpha-Synuclein', *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1764, 5–12.
- [Tikekar, 2011] R. Tikekar, Anantheswaran, Elias et al. 'UV-Induced oxidation of Ascorbic Acid in a model juice system: Identification of degradation products', *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 8244–48.
- [Uversky, 2001] V. Uversky, J. Li y A. Fink, 'Evidence for a Partially Folded Intermediate in  $\alpha$ -Synuclein Fibril Formation', *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 10737–44.
- [Valko, 2007] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol et al. 'Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease', *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 39, 44–84.
- [Vilanova, 2014] B. Vilanova, D. Sanfelice, G. Martorell et al. 'Trapping a Salt-Dependent Unfolding Intermediate of the Marginally Stable Protein Yfh1', *Front. Mol. Biosci.*, **2014**, 1, 1–8.
- [Wang, 2016] W. Wang, L. Nguyen, C. Burlak et al. 'Caspase-1 Causes Truncation and Aggregation of the Parkinson's Disease-Associated Protein  $\alpha$ -Synuclein', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, 113, 9587–92.
- [Wang, 2017] N. Wang, C. Miller, P. Wang et al. 'Quantitative Determination of Trace Hydrogen Peroxide in the Presence of Sulfide Using the Amplex Red/horseradish Peroxidase Assay', *Anal. Chim. Acta*, **2017**, 963, 61–67.
- [Wirdefeldt, 2011] K. Wirdefeldt, H. Adami, P. Cole et al. 'Epidemiology and Etiology of Parkinson's Disease: A Review of the Evidence', *Eur. J. Epidemiol.*, **2011**, 26, 1–58.
- [Wood, 1999] S. Wood, J. Wypych, S. Steavenson et al. ' $\alpha$ -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-Dependent', *Biochemistry*, **1999**, 19509–12.
- [Yoon, 2003] T. Yoon y J. Cowan, 'Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. Characterization of Frataxin as an Iron Donor for Assembly of [2Fe-2S] Clusters in ISU-Type Proteins', *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 6078–84.
- [Yoon, 2004] T. Yoon y J. Cowan, 'Frataxin-Mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis', *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 25943–46.
- [Zhu, 2006] M. Zhu, Z. Qin, D. Hu et al. ' $\alpha$ -Synuclein Can Function As an Antioxidant Preventing Oxidation of Unsaturated Lipid in Vesicles', *Biochemistry*, **2006**, 45, 8135–42.