



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

INVESTIGACIÓN ESTRUCTURAL DE LA TRANSFERRINA HUMANA PARA SU
POSIBLE APLICACIÓN COMO TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

CAMILA CAMPOS ESCAMILLA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Ecuaciones.....	ix
Lista de Abreviaturas y Acrónimos.....	x

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 <i>Introducción y estructura de la tesis</i>	1
1.1.1 <i>La transferrina humana</i>	1
1.1.2 <i>El ciclo de la transferrina</i>	1
1.1.3 <i>Detalles estructurales de la transferrina</i>	2
1.2 <i>Antecedentes</i>	4
1.3 <i>Hipótesis</i>	5
1.4 <i>Objetivos</i>	5
1.4.1 <i>General</i>	5
1.4.2 <i>Particulares</i>	6

CAPÍTULO 2. CRISTALIZACIÓN Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA TRANSFERRINA MEDIANTE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

2.1 <i>Introducción y generalidades</i>	7
2.2 <i>Preparación de muestras para cristalización</i>	7
2.3 <i>Fundamentos sobre la cristalización de proteínas</i>	7
2.3.1 <i>Nucleación y crecimiento cristalino</i>	8
2.4 <i>Métodos de cristalización de proteínas</i>	11
2.4.1 <i>Métodos convencionales: Difusión en fase vapor</i>	11
2.4.2 <i>Métodos no convencionales: Contradifusión en geles en medios capilares</i>	12
2.5 <i>Cristalografía de proteínas</i>	14
2.6 <i>Materiales y métodos</i>	15
2.6.1 <i>Purificación y preparación de muestras</i>	15
2.6.2 <i>Cristalización: métodos convencionales y no convencionales</i>	16
2.6.3 <i>Difracción de rayos X y análisis cristalográfico</i>	18
2.6.4 <i>Desglucosilación</i>	19
2.7 <i>Resultados y discusión</i>	19

CAPÍTULO 3. ESTUDIO ESTRUCTURAL MEDIANTE DISPERSIÓN DE RAYOS X A ÁNGULO BAJO (SAXS)

3.1	Introducción.....	35
3.2	Materiales y métodos.....	36
3.3	Resultados y discusión.....	37
CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD E INTERACCIÓN QUÍMICA EN SOLUCIÓN		
4.1	Introducción.....	45
4.2	Espectroscopía.....	45
4.2.1	Introducción.....	45
4.2.2	Materiales y métodos.....	47
4.3	Ensayo de desplazamiento térmico (<i>Thermal shift assay, TSA</i>).....	47
4.3.1	Introducción.....	48
4.3.2	Materiales y métodos.....	48
4.4	Resultados y discusión.....	49
CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS SOBRE POSIBLES SITIOS DE INTERACCIÓN PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS		
5.1	Introducción.....	56
5.2	Materiales y métodos.....	56
5.2.1	Cristalización en presencia de ligandos.....	57
5.2.2	Calorimetría de titulación isotérmica (<i>ITC</i>) y de barrido diferencial (<i>DSC</i>).....	57
5.2.3	Ensayo de desplazamiento térmico (<i>TSA</i>).....	58
5.3	Resultados y discusión.....	59
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES		
6.1	Conclusiones generales.....	68
6.2	Perspectivas generales.....	68
	Referencias bibliográficas.....	70
	APÉNDICE 1. Perspectivas experimentales de cristalización accesorias: método <i>all-inclusive</i>	a
	APÉNDICE 2. Glosario de términos.....	e
	APÉNDICE 3. Artículos publicados.....	h

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Abel Moreno Cárcamo, por su guía científica y apoyo en la investigación, por su paciencia y comprensión en la realización de este trabajo y por todas las oportunidades que me brindó a lo largo de mi formación doctoral.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros y a la Dra. Lourdes Massieu Trigo, por su apoyo a lo largo del doctorado como comité tutor, por sus consejos y guía académica.

Al Dr. José Antonio Gavira Gallardo, por su tutela durante mi estancia de investigación en el Laboratorio de Estudios Cristalográficos (LEC) del IACT-CSIC-Universidad de Granada (Granada, España); por su apoyo, paciencia, enseñanzas y colaboración en las publicaciones científicas que resultaron de este trabajo. Al Dr. Sergio Martínez Rodríguez del LEC por su apoyo, consejos y perspectivas científicas.

Al Dr. Dritan Siliqi, por su apoyo en la colecta de datos de SAXS en sincrotrón, así como sus enseñanzas y colaboración en las publicaciones científicas que resultaron de este trabajo. Al Dr. Luis Antonio González Ramírez, al Dr. Fermín Otálora y a Carmen López Sánchez por su colaboración en las publicaciones científicas que resultaron de este trabajo.

A la Dra. Mayra Cuéllar Cruz, por su apoyo en la colecta de datos cristalográficos en sincrotrón. A la Dra. Vivian Stojanoff, por su apoyo y consejos durante la colecta de datos de sincrotrón. A la Dra. Adela Rodríguez Romero por sus enseñanzas y apoyo en el LANEM-IQ.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por su apoyo con el uso del equipo de espectroscopía en el IQ. Al Dr. Enrique García, al Dr. Miguel Costas y a la M. en C. Jessica Díaz por su apoyo con el uso de los equipos de calorimetría.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), por su colaboración en mi formación doctoral, en los cursos ofrecidos y en la estancia de investigación realizada. Al Instituto de Química, UNAM, por ser la entidad académica donde se realizó este trabajo y a su personal administrativo, técnico y académico. Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca de posgrado otorgada para llevar a cabo mis estudios, con número de becario 856528. A DGAPA-UNAM por el financiamiento mediante el proyecto PAPIIT-IN207922. Al proyecto CONAHCYT de Ciencia de Frontera No. CF-2019/39216, por el financiamiento de esta tesis y el pago de viaje al sincrotrón BNL-NSLS-II.

Por el apoyo en la colecta de datos, al sincrotrón NSLS-II del Laboratorio Nacional de Brookhaven, Nueva York (Estados Unidos de América) mediante la propuesta ID 309754; al sincrotrón SSRL del SLAC, Standford (Estados Unidos de América), financiado por el Departamento de Energía de EUA bajo el contrato No. DE-AC02-76SF00515 y P30GM133894; al sincrotrón de ELETTRA, Trieste (Italia) mediante las propuestas No. 20220602 y 20220607; al sincrotrón ALBA, Barcelona (España) mediante la propuesta 2021085252 y 2022086950 y al equipo de XALOC por su asistencia durante la colecta; al sincrotrón ESRF, Grenoble (Francia) mediante el BAG MX2363.

A los sinodales por su aporte científico y observaciones para la finalización de este trabajo.

RESUMEN

La presente tesis doctoral se centra en el estudio estructural de la transferrina humana, la principal proteína involucrada en la homeostasis del hierro. Esta proteína sigue un mecanismo de transporte altamente específico conocido como endocitosis mediada por receptor, en el cual forma un complejo macromolecular con el receptor de transferrina expresado en la membrana celular. Dicho transporte además es dependiente del pH e implica cambios conformacionales de la transferrina, haciendo de esta propiedad un objeto de estudio de gran interés por su potencial para ser aplicada como sistema de transporte de fármacos. Sin embargo, antes de aproximarse a este objetivo, primero es fundamental proveer un análisis de las características que hacen a la transferrina una molécula tan especial. Por lo tanto, en los capítulos que conforman este trabajo se muestran las estrategias experimentales exploradas y sus respectivos resultados, así como las preguntas que se plantearon a raíz de ellos y las perspectivas para la continuación de la investigación al respecto.

El primer capítulo consiste en una introducción a la tesis doctoral, donde se presenta la información general conocida hasta el momento sobre la transferrina, su mecanismo y propiedades estructurales, así como los antecedentes donde se ha propuesto como una potencial molécula de transporte de fármacos. Adicionalmente, en este primer capítulo se plantea la hipótesis y los objetivos de este trabajo. El segundo capítulo se desarrolla en torno a la cristalización y la cristalografía de rayos X como una de las principales metodologías para el estudio estructural de las proteínas, así como los retos particulares que implicó el estudio de la transferrina. Se describen las técnicas de cristalización que fueron empleadas, sus fundamentos y detalles prácticos. En cuanto a la cristalografía de rayos X, se ofrece una revisión de las nociones básicas para poder interpretar los resultados que se muestran y discuten más adelante. En el tercer capítulo se describe una técnica muy poderosa para el estudio estructural de las proteínas en solución, la dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS), y cómo ésta permitió realizar observaciones invaluable sobre los cambios conformacionales de la transferrina en diferentes condiciones de pH. El cuarto capítulo resume la caracterización de la transferrina en solución mediante técnicas espectroscópicas, mientras que el quinto capítulo plantea las perspectivas hacia la propuesta de la transferrina como transportador de fármacos, mostrando algunas aproximaciones experimentales con ligandos a base de rutenio propuestos como profármacos con actividad anticancerígena. Finalmente, el sexto capítulo resume las conclusiones y perspectivas generales de este trabajo.

ABSTRACT

The present dissertation is focused on the structural study of human transferrin, the main protein involved in iron homeostasis. This protein follows a highly specific mechanism known as receptor-mediated endocytosis, in which it forms a macromolecular complex with the transferrin receptor expressed on the cellular membrane. Such transport is also known to be pH dependent, and it involves conformational changes of transferrin, making it a very interesting research target due to its potential to be applied as a drug delivery system. However, before reaching this goal, it is crucial to provide an analysis of the properties that make transferrin such a special molecule. Therefore, the following chapters of this work show the experimental strategies that were explored and their corresponding results, as well as the questions that arose from them and the perspectives for further research on this subject.

The first chapter introduces the dissertation, where current general information about transferrin is presented, regarding its mechanism and structural properties, as well as research background where its potential as a drug delivery system has been proposed. Moreover, the hypothesis and objectives of this work are presented in this first chapter. The second chapter is focused on protein crystallization and X-ray crystallography as one of the main methodologies for structural characterization of proteins, and elaborates on the challenges found while studying transferrin. The crystallization methods that were used are described, including their fundamentals and practical details. Regarding X-ray crystallography, an overview of the basics is provided in order to interpret the results shown and discussed later. The third chapter describes small angle X-ray scattering (SAXS), a very powerful technique for structural characterization of proteins in solution, and how it allowed to obtain invaluable information regarding conformational changes of transferrin at different pH conditions. The fourth chapter covers the characterization of transferrin in solution through spectroscopic techniques, while the fifth chapter offers some perspectives towards the proposal of transferrin as a drug delivery system, showing some experimental approaches using ruthenium-based ligands proposed as anti-cancer prodrugs. Finally, the sixth chapter summarizes the general conclusions and perspectives of this work.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema simplificado del ciclo de la transferrina en el transporte de hierro en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.

Figura 1.2. Residuos involucrados en el sitio de unión a metales de la transferrina.

Figura 1.3. Estructura de la transferrina dividida por dominios.

Figura 2.1. Representación ilustrativa del diagrama de fases de la cristalización de proteínas.

Figura 2.2. Gráfico del cambio en la energía libre de Gibbs *versus* el radio del núcleo crítico.

Figura 2.3. Configuración experimental de la cristalización por difusión en fase vapor en gota colgante (A) y en gota sedente (B).

Figura 2.4. Preparación y configuración experimental de la cristalización por contradifusión en geles en medios capilares.

Figura 2.5. Procedimiento general para la cristalografía de rayos X de proteínas.

Figura 2.6. Configuración experimental para el experimento de contradifusión en gel en medios capilares utilizando el material provisto por el C-Kit Ground Pro.

Figura 2.7. SDS-PAGE para comprobar la pureza de la transferrina de fuente comercial en su forma libre (apo-Tf) y unida a hierro (holo-Tf).

Figura 2.8. Cristales de transferrina obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 7.0 bajo condiciones previamente estandarizadas.

Figura 2.9. Cristales de holo-transferrina crecidos en difusión en fase vapor a 18 °C en condiciones libres de citratos para evitar la unión del hierro a los citratos del medio.

Figura 2.10. Cristales de transferrina obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 5.5 (A), a pH 7.0 (B) y a pH 8.0 (C).

Figura 2.11. Cristales de apo-transferrina crecidos a pH 5.5.

Figura 2.12. Cristales de apo-transferrina crecidos a pH 5.5 con sus respectivos patrones de difracción de rayos X y cálculos preliminares de las dimensiones de celda y grupo espacial.

Figura 2.13. Evolución espaciotemporal de cristales de transferrina crecidos mediante contradifusión en agarosa en un capilar.

Figura 2.14. Cristales de transferrina crecidos mediante contradifusión en agarosa en medios capilares.

Figura 2.15. Modelo estructural tridimensional de la apo-transferrina humana glicosilada publicado y depositado en el PDB con el ID: 7Q1L.

Figura 2.16. Modelos estructurales de la apo-Tf.

Figura 2.17. Sitio de glicosilación en el modelo estructural de la apo-Tf (PDB 7Q1L).

Figura 2.18. Superposición de los modelos de la apo-transferrina.

Figura 2.19. SDS-PAGE donde se evidencian las dos poblaciones resultantes de la desglicosilación de la transferrina.

Figura 2.20. Cromatograma de intercambio aniónico donde se separaron las poblaciones de transferrina glicosilada de la desglicosilada, tras la incubación con PNGasa F, observadas como dos picos cercanos entre sí.

Figura 2.21. SDS-PAGE de las fracciones 27-35 colectadas de transferrina.

Figura 3.1. Experimento general de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

Figura 3.2. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de la apo- y holo-transferrina.

Figura 3.3. Modelos *ab initio* resultantes del ajuste de la cadena A del modelo 2HAV con los datos experimentales de SAXS mediante DAMMIN.

Figura 3.4. Modelo estructural de apo-Tf (PDB ID: 2HAV) utilizado como referencia.

Figura 3.5. Modelado pseudo-atómico basado en datos de SAXS realizado con MultiFoXS para holo-Tf a pH 5.5.

Figura 4.1. Espectro de absorción UV-Visible de la apo-Tf (línea negra) y la holo-Tf (línea roja).

Figura 4.2. Espectro de elipticidad molar media de residuos de apo-Tf (línea negra) y holo-Tf (línea roja).

Figura 4.3. Intensidad de fluorescencia para la apo-Tf y la holo-Tf en los valores de pH de 5.5, 7.0 y 8.0

Figura 5.1. Estructuras moleculares de los ligandos cis-[Ru(bpy)₂(PTA)₂]Cl₂ (**R1**), trans-[Ru(bpy)₂(PTA)₂](CF₃SO₃)₂ (**R2**), cis-[Ru(bpy)₂(H₂O)(PTA)](CF₃SO₃)₂ (**R3**), cis-[Ru(dcbpy)₂(PTA)₂]Cl₂ (**R4**).

Figura 5.2. Ligandos de rutenio preparados para su difusión en los experimentos de cristalización.

Figura 5.3. Difusión de ligando R2 en experimentos de cristalización de apo-Tf mediante contradifusión.

Figura 5.4. Cristales de apo-Tf obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 5.5 (A), a pH 7.0 (B) y a pH 8.0 (C) en presencia del ligando R2.

Figura 5.5. Cristal de apo-Tf crecido en contradifusión en capilares a pH 5.5.

Figura 5.6. Porción del mapa de densidad electrónica con el mapa de diferencia, Fo-Fc, donde se observó una nube de densidad positiva.

Figura 5.7. Comparación de los espectros de TSA de la apo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 7.4.

Figura 5.8. Comparación de los espectros de TSA de la holo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 7.4.

Figura 5.9. Comparación de los espectros de TSA de la apo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 5.5.

Figura 5.10. Comparación de los espectros de TSA de la holo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 5.5.

Figura 5.11. Termograma de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Figura 5.12. Termograma obtenido por calorimetría de barrido diferencial (DSC) para la holo-Tf en presencia del ligando R2 con respecto a la holo-Tf sola.

Figura A1. Experimento de cristalización con el método *all-inclusive*.

Figura A2. Cristales de holo-transferrina a pH 5.5 obtenidos mediante cristalización en contradifusión en gel de agarosa en capilares, en el transcurso de 3 semanas.

Figura A3. Comparación del tamaño, tomando como referencia el diámetro máximo, de un cristal de transferrina crecido a pH 5.5 en contradifusión bajo la influencia de un campo magnético (A) *versus* control (B).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones alternativas al citrato para la cristalización de holo-transferrina.

Tabla 2. Colecta de datos y estadísticas de afinamiento para los cristales de apo-Tf obtenidos.

Tabla 3. Contenido de agua y coeficiente de Matthews de la transferrina.

Tabla 4. Datos experimentales y calculados de SAXS.

Tabla 5. Conformaciones de apo- y holo-transferrina en tres diferentes condiciones de pH, observadas con el modelado realizado a partir de SAXS con el servidor MultiFoXS.

Tabla 6. Esquema de preparación de soluciones amortiguadoras en 15 mM cacodilato de sodio para evaluar la estabilidad de la transferrina en diferentes valores de pH y en presencia de aniones bioquímicamente relevantes.

Tabla 7. Comparación entre las principales condiciones en las que se observaron efectos en el comportamiento de la transferrina en TSA.

Tabla 8. Esquema de preparación de muestras para evaluar la interacción de la transferrina con los ligandos descritos en la Figura 5.1, incluyendo blancos y controles, correspondientemente.

LISTA DE ECUACIONES

$$(2.1) \quad \Delta\mu = \mu_s - \mu_c = kT \ln \beta$$

$$(2.2) \quad \Delta G = -\left(\frac{4\pi r^3}{3}\right) \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma$$

$$(3.1) \quad I(s) \sim F(s) * S(s)$$

$$(3.2) \quad d = 2\pi/s$$

$$(A1) \quad \frac{\text{Circunferencia}_{RMN} - \text{Circunferencia}_{Control}}{\text{Circunferencia}_{Control}} \times 100 = \text{Crecimiento relativo}$$

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

° C: grado Celsius
2D: 2 dimensiones
Å: Angstrom
Asn: asparagina
Asp: ácido aspártico
BNL: *Brookhaven National Laboratory*
CD: *Circular Dichroism*; dicroísmo circular
cm: centímetro
d: distancia
Dmax: tamaño máximo
DMT1: *Divalent Metal Transporter*; transportador de metales divalentes
DSC: *Differential Scanning Calorimetry*; calorimetría de barrido diferencial
ESRF: *European Synchrotron Radiation Facility*
F(s): factor de forma
FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*; cromatografía rápida de proteínas
FS: *Fluorescence Spectroscopy*; espectroscopía de fluorescencia
g: fuerza g o fuerza centrífuga relativa
h: hora
HEPES: ácido N-2-hidroxietilopiperacina-N-2-etano sulfónico
His: histidina
I(s): dispersión isotrópica
ITC: *Isothermal Titration Calorimetry*; calorimetría de titulación isotérmica
K: Kelvin
kDa: kilo Dalton
keV: kilo electronvoltio
Leu: leucina
LM: *Low Melting point*; bajo punto de fusión
Lys: lisina
M: molar
Met: metionina
mg: miligramo
MHz: mega Hertz
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
mM: millimolar
MWCO: *Molecular Weight Cut-Off*; corte de peso molecular
NAG : N-acetil- β -D-glucosamina
nm: nanómetro
nM: nanomolar
NSLS-II: *National Synchrotron Light Source II*
P(r): distancia entre pares
p/v: peso/volumen
PDB: *Protein Data Bank*
PEG: polietilenglicol

pH: potencial de hidrógeno
Rg: radio de giro
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RMSD: *Root Mean Square Deviation*
RT-qPCR: *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*; estudio cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S(s): factor de estructura
s: segundo
s: vector de dispersión
SAXS: *Small Angle X-ray Scattering*; dispersión de rayos X a bajo ángulo
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
Ser: serina
SSRL: *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*
Tf: transferrina
TfR: receptor de transferrina
Thr: treonina
Tm: *melting temperature*; temperatura media de desnaturalización
Trp: triptófano
TSA: *Thermal Shift Assay*; ensayo de desplazamiento térmico
Tyr: tirosina
UV: ultravioleta
v/v: volumen/volumen
V: voltio
W: Watt
µg: microgramo
µl: microlitro
µm: micrómetro

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción y estructura de la tesis

1.1.1 La transferrina humana

La transferrina humana (Tf) es la principal proteína involucrada en la homeostasis del hierro, cuya función es el transporte seguro de hierro una vez que éste ha sido absorbido y exportado hacia la circulación sanguínea, hacia su almacenamiento y uso en el interior de las células que lo requieren [1]. Dependiendo del requerimiento férrico de la célula, existe mayor o menor expresión de los receptores de transferrina y por ende movimiento de transferrina; por ejemplo, uno de los organelos con mayor demanda de hierro es la mitocondria, especialmente en células neuronales [2]. La Tf es sintetizada principalmente en el hígado por los hepatocitos, aunque también se expresa en otras células, como las células endoteliales de los capilares cerebrales, en macrófagos, linfocitos y fibroblastos. Es una glicoproteína soluble que se encuentra circulando en el plasma sanguíneo, en el líquido cefalorraquídeo, la linfa y el líquido intersticial [3].

1.1.2 El ciclo de la transferrina

La Tf ha sido sujeto de interés biomédico en los últimos años gracias a su mecanismo de transporte de hierro, la endocitosis mediada por receptor, debido a que involucra la unión específica al receptor de transferrina (TfR1). Este último es expresado en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada de la transferrina hacia el sistema nervioso central [2]. Tal como se ilustra en la Figura 1.1, la holo-Tf transporta dos iones férricos (Fe^{3+}) mediante un enlace de coordinación (Figura 1.2), los cuales captura cuando se encuentra libre (apo-Tf) en el torrente sanguíneo, cuyo pH es de 7.4. La holo-Tf es reconocida por el TfR1 expresado en la superficie celular, que a su vez une dos moléculas de holo-Tf para formar un complejo macromolecular. El complejo Tf-TfR es internalizado en endosomas mediante la formación de micro cavidades o vesículas que son recubiertas por una capa de clatrin; estas últimas son proteínas que se entrecruzan, formando una red polimérica para controlar la endocitosis de receptores y su cargamento [4]. Una vez dentro del endosoma acidificado (pH 5.5), el Fe^{3+} contenido en la holo-Tf es liberado y reducido a Fe^{2+} para entonces salir del endosoma hacia el citoplasma de la célula endotelial mediante el transportador de metales divalentes (DMT1). Por su parte, la Tf ahora libre de iones metálicos (apo-Tf) es reciclada hacia la superficie celular [1]. Este ciclo se repite alrededor de cien veces, siendo que en individuos sanos, la vida media en circulación de la

transferrina es de hasta 8 días, reciclando a su vez una gran cantidad de iones de hierro cuya vida media es de tan solo 2 horas [3].

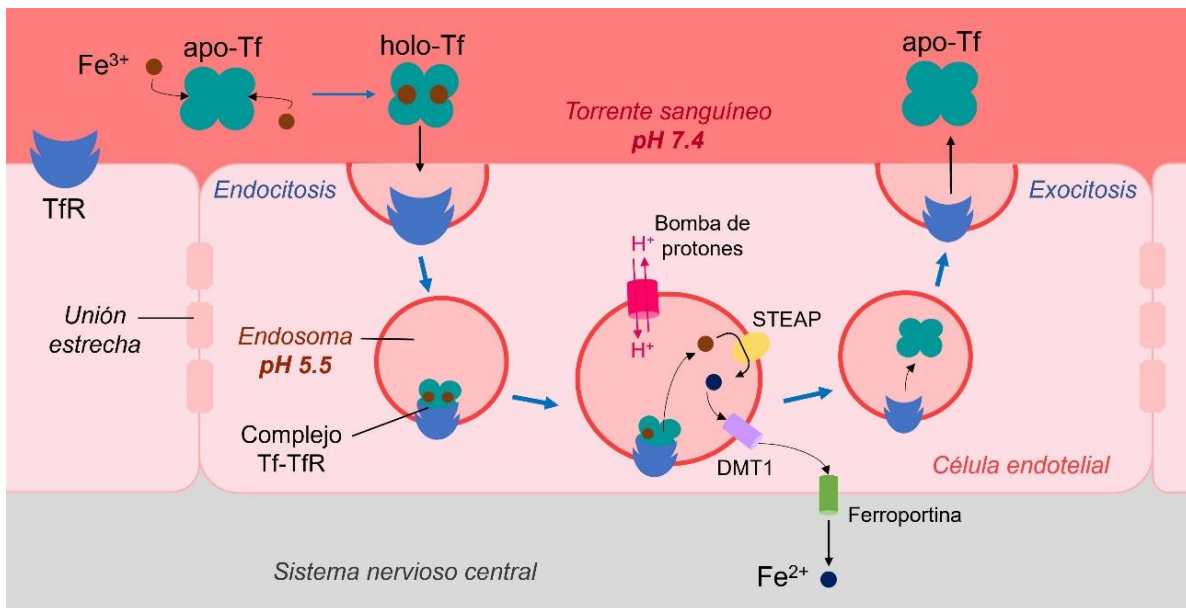


Figura 1.1. Esquema simplificado del ciclo de la transferrina en el transporte de hierro en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La transferrina (Tf) captura el ion férrico (Fe^{3+}) en el torrente sanguíneo, convirtiéndose en holo-Tf, la cual es reconocida por el receptor de transferrina (TfR) expresado en la superficie celular. El complejo Tf-TfR es internalizado en endosomas cuyo pH ácido provoca la liberación del hierro de la Tf; este último tiene varios destinos, entre los cuales está su conversión hacia el ion ferroso (Fe^{2+}) mediante la ferorreductasa STEAP y su salida al citosol mediante el transportador de metales divalentes (DMT1), para su exportación mediante la ferroportina. El Tf-TfR se disocia, el TfR se externaliza nuevamente a la membrana luminal y la apo-Tf es reciclada hacia el torrente sanguíneo para repetir el ciclo.

1.1.3 Detalles estructurales de la transferrina

La información estructural reportada hasta el momento describe a la transferrina como una glicoproteína de ~80 kDa cuya estructura está dispuesta por 2 lóbulos homólogos, uno N-terminal y otro C-terminal, unidos por un péptido no estructurado (Figura 1.3). Ambos lóbulos a su vez se subdividen cada uno en 2 dominios, entre los cuales se localiza un sitio de unión a metales, dentro del cual se une principalmente el Fe^{3+} de manera reversible mediante un enlace de coordinación octaédrico [5], [6]. Los residuos que forman el sitio de unión a metales corresponden a Asp63, Tyr95, Tyr188 e His249 en el lóbulo N-terminal y Asp392, Tyr426, Tyr517 e His585 en el lóbulo C-terminal (Figura 1.2) [7].

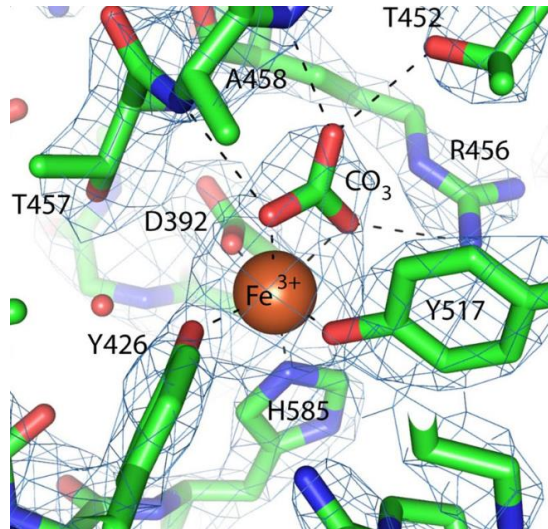


Figura 1.2. Residuos involucrados en el sitio de unión a metales de la transferrina. Obtenido de [8].

Se ha sugerido que parte del mecanismo de liberación de hierro implica un cambio de polaridad de dos residuos de lisina cercanos al sitio de unión a metales, los cuales promueven el movimiento de los residuos que conforman a dicho sitio [9]. Por otra parte, el mecanismo de liberación de hierro está influenciado por el movimiento de regiones poco estructuradas, por efecto del cambio de pH al momento de introducirse a endosomas en las células endoteliales [10].

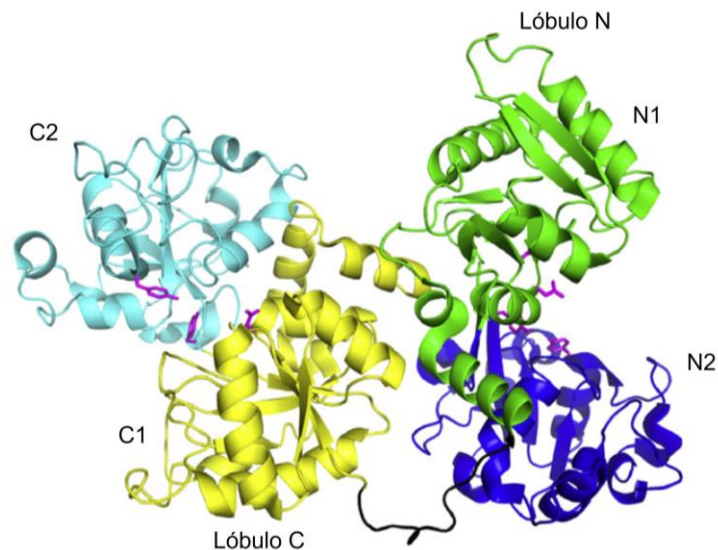


Figura 1.3. Estructura de la transferrina dividida por dominios. La transferrina se divide en 2 lóbulos homólogos, N y C, cada uno a su vez subdividido en dos dominios, denominados N1 y N2, y C1 y C2, respectivamente. Dichos lóbulos están unidos por un péptido no estructurado, mostrado en color negro. Los residuos resaltados en color magenta son aquellos que conforman el sitio de unión a metales en la cavidad inter-dominio, teniendo entonces dos sitios de unión por molécula de transferrina. Obtenido de [5].

1.2 Antecedentes

Se ha propuesto que la transferrina tiene potencial para formar parte de sistemas de transporte de fármacos hacia el sistema nervioso central, gracias a su mecanismo de endocitosis mediada por receptor [7], [10]. Desde la perspectiva de aprovechar la especificidad con su receptor, se ha propuesto emplear a la transferrina como grupo funcional dentro de sistemas más complejos únicamente como molécula de reconocimiento [11], [12]. En otros escenarios, como en el desarrollo de agentes citostáticos contra células cancerígenas, se ha buscado aprovechar la expresión aumentada de receptores de transferrina en la superficie de dichas células para focalizar el tratamiento [13]. Sin embargo, dichos estudios se han enfocado en dirigir la estrategia hacia el receptor de transferrina, más que en la transferrina en sí. Además, cuando se trata de buscar estrategias contra el cáncer es importante tomar en cuenta más factores, como el microambiente de las células tumorales. Se sabe que el microambiente extracelular de las células tumorales es más ácido que el pH extracelular de los tejidos normales, ya que éstas metabolizan la glucosa mediante la vía anaeróbica, la cual produce y excreta más iones lácticos y CO₂. Por otra parte, el pH intracelular en las células cancerígenas es similar a aquel de las normales [14], por lo que el enfoque terapéutico debe tomar en cuenta que esto podría comprometer la especificidad del tratamiento.

Además, se han estudiado las propiedades del sitio de unión a hierro de la transferrina, a partir de su capacidad de unir otros metales. Por ejemplo, se ha unido la transferrina a metales como el bismuto, con lo cual se propuso la funcionalidad de la transferrina como transportador de metalofármacos [6]; el iterbio, para posibles aplicaciones en imagenología [15]; el cromo, para analizar la capacidad de la transferrina para la detoxificación de cromo [16] y sales de hierro como el citrato de pirofosfato férrico, propuesto para suplementar hierro [8]. Asimismo, el estudio del sitio de unión de la transferrina se ha llevado a cabo mediante técnicas indirectas empleando proteínas recombinantes o mutantes de la misma [17], con lo cual se ha determinado que existe flexibilidad y diferencias funcionales entre los sitios de unión de ambos lóbulos. Considerando que las transferrinas no se encuentran completamente saturadas con hierro [18], es posible sugerir que se cuenta con cierta disponibilidad para su interacción con otras moléculas. Convenientemente, se ha obtenido la estructura de la transferrina con diferentes metales de interés biomédico, ubicados en distintas regiones de la proteína. Por ejemplo, un modelo estructural a resolución de 2.45 Å ha sido obtenido para la transferrina monoférrica en el C-terminal con cisplatino unido en el residuo Met256 del lóbulo N-terminal. A pesar de la resolución de su modelo, los autores proponen nuevos sitios de unión en la transferrina, como cadenas laterales de residuos de histidina o metionina en regiones distantes al sitio de unión a metales [19].

Algunas otras investigaciones han caracterizado la interacción de la transferrina humana con algunos fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, o con sustancias con actividad farmacológica, como los flavonoides; sin embargo, no parecen estar encaminadas a la optimización de la administración de dicho fármaco [20], [21] sino que giran en torno a la disminución de la concentración disponible de dichas sustancias por efecto de la unión a proteínas [22].

Las investigaciones realizadas anteriormente sobre transferrina humana y sus interacciones con moléculas diferentes a su ligando natural ofrecen información útil, mas no concluyente, sobre su potencial aplicación biomédica. Por otro lado, si bien se han probado estrategias que involucran a la transferrina como molécula de reconocimiento, la proteína en sí posee un mecanismo de transporte de hierro que podría aprovecharse sin necesidad de formar complejos moleculares mayores. Por lo tanto, es necesario profundizar el conocimiento disponible para poder, desde una perspectiva estructural, proponer a la transferrina como una herramienta de transporte molecular autocontenido.

La presente tesis se desarrollará en los siguientes cinco capítulos que describirán los estudios que se realizaron sobre la transferrina en el orden lógico con el que se plantearon los objetivos, para encaminar esta investigación hasta llegar al planteamiento de las perspectivas, las cuales se discutirán en el capítulo final de esta tesis doctoral.

1.3 Hipótesis

La transferrina humana despliega mecanismos de interacción molecular derivados de sus propiedades estructurales que son determinantes para su función, y que pueden extenderse a interacciones con compuestos de interés biomédico enfocados a cumplir funciones de un transportador de fármacos.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Obtener información estructural y de interacción química de la transferrina humana con ligandos de interés biomédico para su potencial aplicación como sistema de transporte de fármacos.

1.4.2 Particulares

- Afinar la pureza de la transferrina de suero humano obtenida comercialmente en sus formas libre de hierro (apo-) y cargada con hierro (holo-).
- Mejorar la calidad de los cristales de transferrina humana mediante técnicas convencionales y no convencionales de cristalización.
- Obtener y analizar un modelo estructural de la transferrina mediante cristalografía de rayos X a partir de los cristales obtenidos.
- Observar la flexibilidad de la transferrina en solución mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) a diferentes valores de pH.
- Caracterizar espectroscópicamente el comportamiento de la transferrina en su interacción con moléculas de relevancia fisiológica y eventualmente con moléculas de interés biomédico.

CAPÍTULO 2. CRISTALIZACIÓN Y ESTUDIO ESTRUCTURAL MEDIANTE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

2.1 Introducción y generalidades

La cristalografía de rayos X es la técnica de resolución estructural más reconocida y utilizada de acuerdo con el acervo de estructuras de biomacromoléculas reportadas en el Protein Data Bank (PDB) [23]. Esta técnica consiste fundamentalmente en hacer incidir un haz de rayos X sobre un cristal de la molécula bajo estudio para obtener un patrón de difracción que provea la información necesaria para generar un mapa de densidad electrónica, con el cual se pueda construir un modelo tridimensional de la estructura de la molécula. Para esto, en primer lugar, deben obtenerse cristales de calidad adecuada de la molécula bajo estudio—por ejemplo, una proteína— lo cual no es una tarea trivial, pues se requiere controlar un conjunto de condiciones para asegurar un experimento exitoso.

2.2 Preparación de muestras para cristalización

Antes de iniciar cualquier experimento de cristalización, es necesario tener a la muestra de proteína con su máxima pureza y estabilidad posibles. Cualquier proceso de purificación implica pérdida de la proteína en cada paso y con ello, bajos rendimientos. Técnicas de purificación hay muchas y diversas, depende de las propiedades de la proteína la elección del protocolo a seguir. En el caso de proteínas comerciales, la purificación está enfocada en remover trazas de posibles contaminantes y agregados de la misma proteína que pudieron haberse originado en el proceso de liofilización. Una vez teniendo la proteína pura y estable, se procede a su cristalización [24].

2.3 Fundamentos sobre la cristalización de proteínas

La base para un análisis cristalográfico, como su nombre lo sugiere, es un cristal. Obtener un cristal de proteína no es tarea sencilla, pues existe una amplia gama de factores que influyen en el proceso de cristalización; en el proceso experimental, se busca controlarlos en la medida de lo posible, haciendo uso de una variedad de métodos de cristalización cuyo fundamento promueve el control de uno o más de ellos [25]. Antes de profundizar en los principios de estos métodos y los factores que influyen en ellos, se describirá el fenómeno de cristalización en sí.

2.3.1 Nucleación y crecimiento cristalino

La cristalización es un fenómeno de transición de fase desde un estado líquido hacia un estado sólido, que parte de un fenómeno inicial conocido como nucleación. En la teoría clásica de la nucleación, las moléculas del soluto (en este caso, las proteínas), forman núcleos mientras se asocian en cúmulos debido a regiones de alta concentración, pues de acuerdo con el mecanismo de dos pasos propuesto para la nucleación, se parte de la existencia de tres fases de equilibrio: una solución subsaturada, un líquido denso y el cristal. La diferencia entre estas tres fases reside principalmente en la concentración y en que la fase del cristal adquiere una estructura. La nucleación ocurre dentro de dichos cúmulos después de que se forma una región de líquido denso que contiene una concentración mayor de proteína, comúnmente conocido como coacervado, dando lugar a un fenómeno conocido como separación de fase líquido-líquido. Esto último sugiere entonces la existencia de estados intermedios que siguen distintos mecanismos, dependiendo de las características fisicoquímicas del sistema. Las diferentes fases por las que atraviesa la proteína pueden representarse esquemáticamente de manera aproximada y generalizada como se ilustra en la Figura 2.1, teniendo en cuenta que se trata de un fenómeno cinético característico para cada proteína [26], [27].

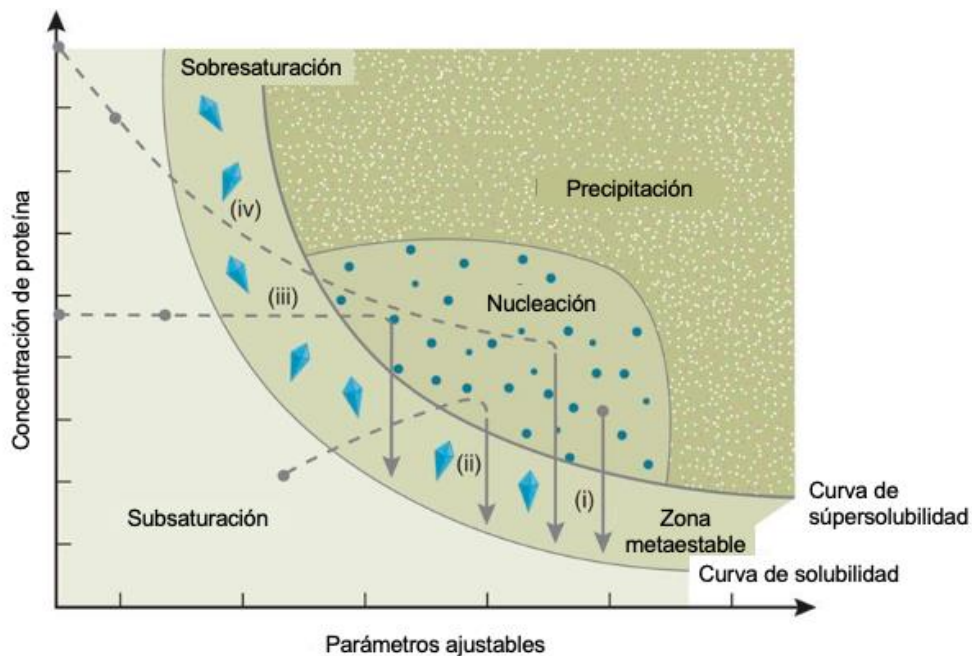


Figura 2.1. Representación ilustrativa del diagrama de fases de la cristalización de proteínas. Los puntos grises indican los puntos de partida y las flechas siguen las transiciones de fases entre regiones de diferente grado de saturación de la proteína de acuerdo con su curva de solubilidad y los diferentes métodos de cristalización para alcanzarlas: (i) microbatch, (ii) difusión en fase vapor, (iii) diálisis y (iv) difusión en interfase libre. Estos últimos corresponden a asumir que el parámetro ajustable es la concentración de agente precipitante, aunque otros parámetros ajustables incluyen

la temperatura, el pH o la concentración de aditivos. La curva de solubilidad se define como la concentración de proteína en el soluto que se encuentra en equilibrio con los cristales, mientras que la de supersolubilidad indica las condiciones en las que ocurre la separación de fases y nucleación bajo condiciones en las que la gota de cristalización se mantiene clara sin ser perturbada. Obtenido de [28], [29]

Durante la nucleación, las moléculas dispersas en solución comienzan a acumularse hasta alcanzar un equilibrio de sobresaturación en la gota de cristalización dispuesta bajo condiciones específicas, lo cual permite una transición de fase desde un estado desordenado en solución a un arreglo molecular ordenado conocido como el núcleo del cristal. Esta transición depende de que el sistema siga un camino energético favorable para aumentar la diferencia de energía molar de Gibbs o potencial químico, $\Delta\mu$, de la molécula en solución (μ_s) y en la fase cristalina (μ_c), siendo que:

$$\Delta\mu = \mu_s - \mu_c = kT \ln \beta \quad (2.1)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y β es el cociente de la concentración real del soluto entre la concentración al equilibrio, $\beta = C/C_e$, que indica la sobresaturación. $\Delta\mu$ entonces es la fuerza motriz para cambiar la energía del sistema en respuesta a la transferencia de moléculas desde una fase hacia la otra durante la nucleación [30]. En la teoría de nucleación de Gibbs, el cambio de energía de Gibbs por mol es necesario para que la gota sobresaturada se transforme en la nueva fase que conformará el núcleo de cristalización, y la describe como la suma del volumen del núcleo y del área superficial del mismo, de manera que:

$$\Delta G = -\left(\frac{4\pi r^3}{3}\right) \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma \quad (2.2)$$

Donde r es el radio de la gota, asumiéndose esférica, γ es la tensión superficial y $\Delta\mu$ es la sobresaturación antes descrita, cuyo valor debe ser positivo ($\Delta\mu > 0$) para que ocurra el subsecuente crecimiento del cristal de manera espontánea. Asimismo, cuando el primer término de la ecuación (2.2) es mayor, el sistema se aproxima más al máximo de la barrera energética, ΔG^* , que debe alcanzarse para formar el núcleo crítico.

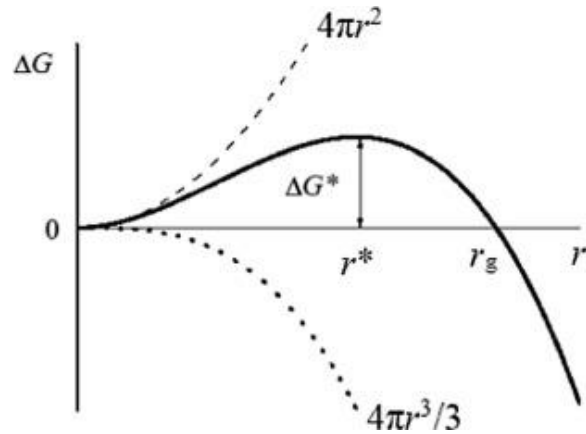


Figura 2.2. Gráfico del cambio en la energía libre de Gibbs *versus* el radio del núcleo crítico, indicado como r^* posicionado en el punto donde se alcanza el equilibrio. Se considera al núcleo como una gota, asumida esférica, lo suficientemente estable para crecer. Obtenido de [31].

Si bien la nucleación en la cristalización de proteínas está regida por los mismos principios físicos que la de moléculas pequeñas, la complejidad bioquímica de las proteínas hace de su nucleación un proceso más complejo. En principio, la composición de la superficie de la proteína determina la posibilidad de tener interacciones con otras moléculas, ya sea de la misma proteína, del solvente, de ligandos o de otras especies en la solución. La superficie de las proteínas suele ser heterogénea e irregular; entonces, para que una molécula de proteína se asocie con otra para formar una red cristalina, es necesario que los contactos sean estrechos, polares e hidrofílicos y que estén correctamente orientados espacialmente, pues en caso contrario, la interacción resultaría en agregación de la proteína [32]. Por lo tanto, los parámetros que deben controlarse al inicio de un experimento de cristalización—como la temperatura, la concentración de proteína, la concentración de agente precipitante y el pH—son determinantes para ubicar al sistema en la región de sobresaturación adecuada para promover la nucleación [28], [33].

La función del agente precipitante es reducir la solubilidad de la proteína, ya sea modificando el microambiente de la proteína para que ésta reoriente la distribución de sus cargas electrostáticas, o alterando la actividad química del agua (a través de la modificación de la constante dieléctrica, promoviendo la interacción proteína-proteína), lo cual suele suceder con ciertas sales o mediante la modificación del pH. Por otro lado, algunos agentes, como los polímeros, actúan por una parte secuestrando el agua del medio, reduciendo la capa hídrica que rodea a la proteína, y por otra reduciendo el volumen disponible al ocuparlo, de tal manera que segregan a las proteínas, favoreciendo los contactos proteína-proteína sobre aquellos proteína-solvente. En ocasiones, se adicionan solventes orgánicos para alterar la constante dieléctrica del medio y favorecer la interacción entre las moléculas de

proteína; sin embargo, esta práctica debe realizarse en cantidades mínimas y procurando adicionarlas a baja temperatura para evitar la desnaturalización de la proteína [24], [32].

Una vez que los núcleos se han formado y han alcanzado cierta estabilidad—es decir, que la energía de volumen de formación de un núcleo ha superado a la energía superficial—es posible que ocurra el crecimiento cristalino (dado que el valor de la energía de Gibbs resulta negativo y por ende el proceso es espontáneo), siempre y cuando existan las condiciones adecuadas para ello. Conforme un cristal crece, van incorporándose más moléculas de proteína en su superficie, disminuyendo a su vez la concentración de proteína en la solución (véase la Figura 2.1). Esto ocurre mediante fenómenos de transporte de masa que, junto con el movimiento de las moléculas de agua que se liberan del cristal o que, por el contrario, se incorporan como aguas estructurales, determinan la velocidad de crecimiento. Sin embargo, esto último también puede traer consigo la incorporación de impurezas que pueden producir defectos en el cristal [30], [34], los cuales pueden no ser evidentes en la superficie, sino evidenciarse hasta que éste ha crecido, o peor aún, inhibir o aniquilar dicho crecimiento.

2.4 Métodos de cristalización de proteínas

Como se menciona en la Figura 2.1, existen diversos métodos de cristalización convencionales que siguen diferentes vías para alcanzar el equilibrio de sobresaturación para crecer cristales; sin embargo, las opciones no se limitan a las descritas en dicha Figura, pues existe una amplia gama de métodos no convencionales que se basan en la modificación de otros parámetros que influyen en la cristalización. A continuación se describirán algunos de los métodos convencionales y no convencionales de cristalización utilizados en el presente trabajo.

2.4.1 Métodos convencionales: Difusión en fase vapor

Este método se basa en la difusión de agua en fase vapor y otros componentes volátiles de la solución presentes en la gota de cristalización, hacia alcanzar el equilibrio con la solución de reservorio en un sistema cerrado. La gota de cristalización puede estar dispuesta en dos diferentes configuraciones, colgante o sedente, como se ilustra en la Figura 2.3. En la primera, ésta se coloca sobre una superficie lisa, dígame un cubreobjetos, que se posiciona de manera invertida sobre el reservorio y se mantiene estática gracias a la tensión superficial. En la segunda, la gota se coloca en un compartimento de la placa de cristalización. En cualquier caso, la gota de cristalización contiene a la solución de proteína en la proporción

deseada con el agente precipitante y, de ser así, cualquier otra sustancia que se desee integrar al cristal; por su parte, el reservorio contendrá un volumen mucho mayor de todo menos la solución de proteína, en términos generales.

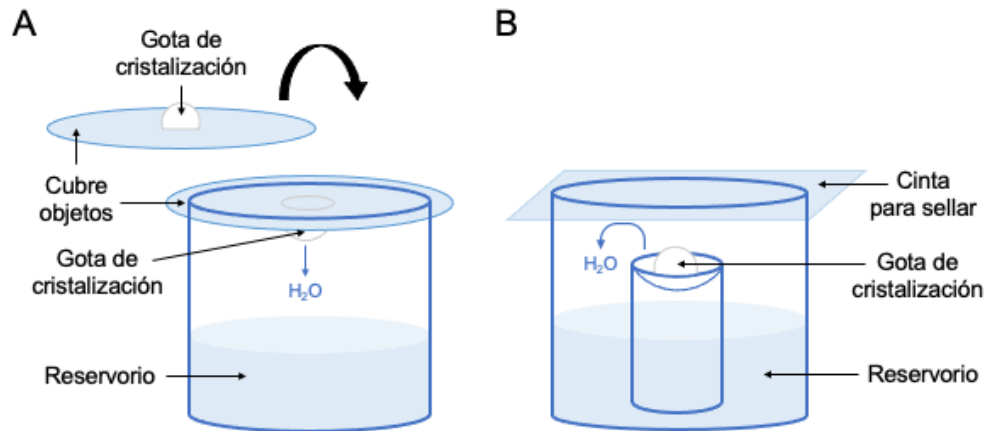


Figura 2.3. Configuración experimental de la cristalización por difusión en fase vapor en gota colgante (A) y en gota sedente (B).

Existen varios factores que pueden afectar la reproducibilidad de un experimento de cristalización mediante esta técnica. Como se ilustra en la Figura 2.1, la gota de cristalización inicia como una solución subsaturada que gradualmente alcanza un máximo de sobresaturación que permite iniciar la nucleación y, posteriormente, se mantiene en la zona metaestable para permitir el crecimiento de los cristales. Sin embargo, es importante cuidar la manera en la que entran en contacto las soluciones al colocar el experimento, pues la diferencia en la densidad de las mismas puede provocar una fuerza de empuje excesiva que genere corrientes convectivas, acelerando las interacciones intermoleculares hacia la precipitación [34].

2.4.2 Métodos no convencionales: Contradifusión en geles en medios capilares

En ocasiones, el empaquetamiento de los cristales se ve afectado por la alta energía térmica producida por las corrientes de convección generadas por el movimiento de las moléculas durante la nucleación, resultando en cristales de baja calidad que complican el análisis por difracción de rayos X. Teniendo en cuenta este factor de convección, se han desarrollado estrategias para evitarlo y promover que el transporte de masa requerido para la nucleación ocurra exclusivamente mediante fenómenos difusivos [35]. Una de estas estrategias es la cristalización en geles (difusión-reacción), lo cual ofrece una manera de simular condiciones de microgravedad, al mantener a las moléculas de proteína embebidas en la matriz del gel [36]. Esto además puede realizarse dentro de medios capilares, que contribuyen

a la minimización de las corrientes convectivas al restringir el espacio—lo cual, a su vez, disminuye el número de Grashof, parámetro que describe el efecto relativo de las fuerzas de empuje y viscosidad del medio [33]. Entonces, un experimento de contradifusión (Figura 2.4) consiste en mezclar cuidadosamente la solución de proteína, en determinada proporción, con una solución de agarosa de bajo punto de fusión—para evitar la desnaturalización de la proteína por temperaturas elevadas—y permitir que la agarosa gelifique a baja temperatura, quedando retenida la proteína en los poros del gel formado. Esta mezcla, ya en estado sólido, es puesta en contacto con el agente precipitante de manera que éste pueda difundir gradualmente en el gel a lo largo del capilar. Entonces, la nucleación ocurre en la intercara y el crecimiento de los cristales se desarrolla a lo largo del capilar [37]. Las concentraciones iniciales de la proteína y del agente precipitante suelen utilizarse al doble de lo que se usaría en un experimento, por ejemplo, de difusión en fase vapor, debido a la presencia de la agarosa, que diluye al sistema proporcionalmente.

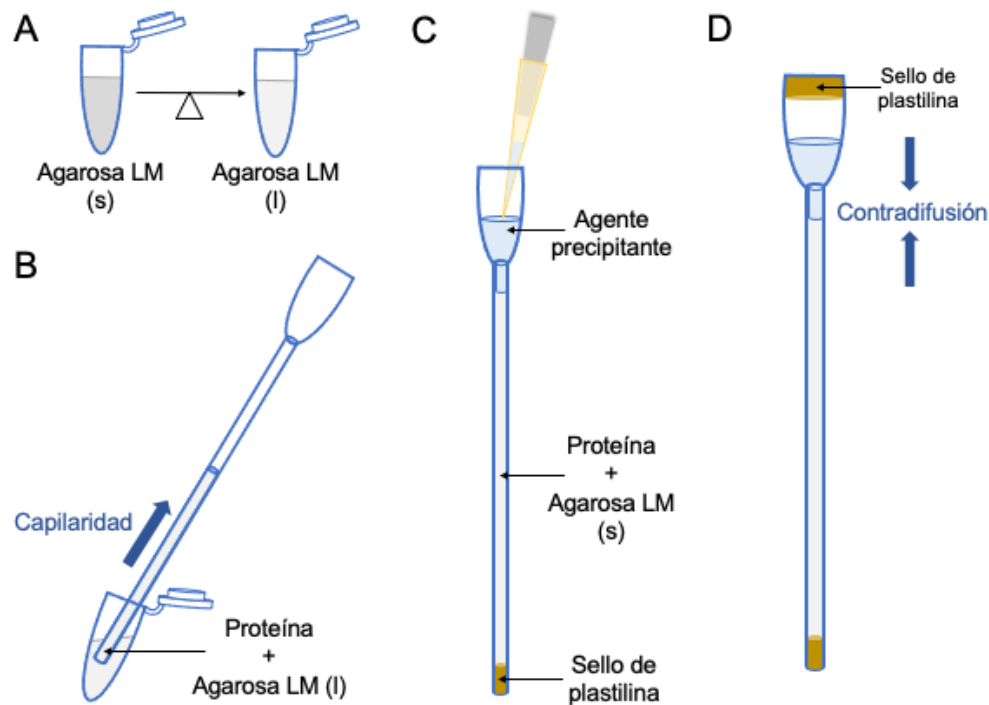


Figura 2.4. Preparación y configuración experimental de la cristalización por contradifusión en geles en medios capilares. A) La agarosa de bajo punto de fusión (*low melting point*, Agarosa LM) preparada en solución acuosa se mantiene en estado sólido (s) a temperatura ambiente, por lo que es necesario calentarla suavemente para obtenerla en estado líquido (l). B) Posteriormente, la agarosa líquida atemperada se mezcla con la solución de proteína y se introduce al capilar mediante capilaridad. C) El sistema se sella por su parte inferior y una vez formado el gel de agarosa con la proteína embebida en sus poros, se coloca el agente precipitante en la parte superior del capilar, en contacto sobre el gel, sin mezclar. D) Finalmente, se sella el sistema en la parte superior y el fenómeno de contradifusión ocurre entre el agente precipitante y la proteína contenida en el gel de agarosa.

2.5 Cristalografía de proteínas

Como se mencionó previamente, la cristalografía de rayos X de proteínas consiste fundamentalmente en hacer incidir un haz de rayos X sobre un cristal de la molécula de estudio. A partir de dicho cristal, emergen reflexiones que son observadas a través de un detector, en forma de puntos dispuestos bidimensionalmente en un patrón, que representan intensidades de la difracción de rayos X. Estas reflexiones son en realidad ondas que poseen una longitud de onda, una amplitud y una fase característica para cada una. La intensidad, que corresponde al cuadrado de la amplitud, es proporcional a la intensidad del rayo incidido y a la posición de los átomos en el espacio recíproco donde se colectó una muestra del plano que se generaría si se realizara un corte en el arreglo tridimensional del cristal. Dicho de otra forma, cada patrón de difracción colectado es como un fotograma que ilustra la orientación exacta del cristal conforme el haz incidió sobre éste. A las reflexiones, entonces, se les asignan índices que corresponden a planos, que a su vez representan fracciones de la celda unitaria, el elemento de volumen más simple representativo del cristal, con lo cual se conoce la orientación y simetría del cristal, así como un estimado de las dimensiones de la celda unitaria [38]. La Figura 2.5 ilustra esquemáticamente el procedimiento general para la obtención de modelos estructurales a través de cristalografía de rayos X.

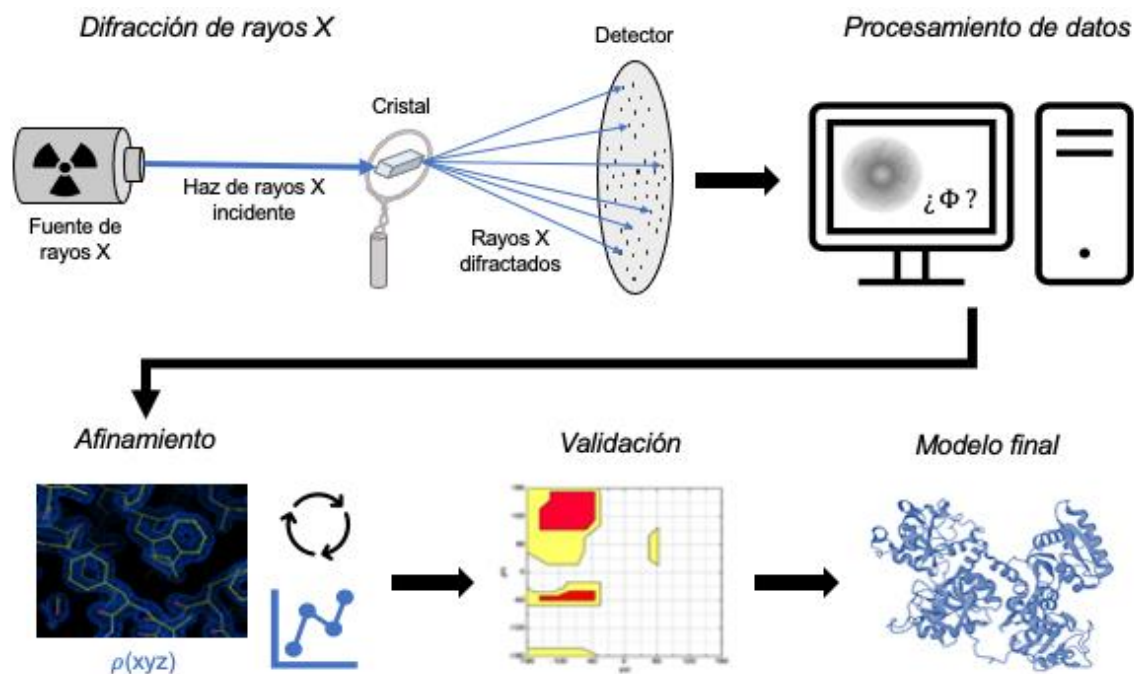


Figura 2.5. Procedimiento general para la cristalografía de rayos X de proteínas.

Uno de los mayores problemas en la cristalografía de rayos X es que las fases de las reflexiones no pueden medirse directamente, y la intensidad de las reflexiones no es suficiente para generar un mapa de la distribución de la densidad electrónica en el cristal. Existen diversos métodos para asignar las fases, entre los cuales está el reemplazo molecular, que consiste en emplear fases de una estructura conocida, que se usará como un modelo para hacerlas coincidir lo mejor posible con las intensidades experimentales. Esto se realiza mediante el cálculo de la transformada de Fourier del conjunto de amplitudes observadas experimentalmente, F_{obs} , y las fases calculadas, φ_{calc} . Si bien las intensidades no son suficientes por sí solas para generar el mapa de densidad electrónica que dará lugar al modelo estructural final, sí lo son para diferenciar a los datos experimentales de aquellos provistos por el modelo usado para obtener las fases. Ahora bien, la superposición de este último con la estructura de la molécula bajo estudio es exitosa siempre y cuando exista la misma simetría y dimensiones de la celda unitaria (la cual puede ser calculada a partir de los datos crudos), y que ambas moléculas se encuentren en la misma orientación. Cuando esto se logra, el mapa resultante es la primera aproximación a un modelo estructural de la molécula bajo estudio, el cual debe atravesar un proceso de afinamiento iterativo para lograr la mayor concordancia entre las amplitudes observadas (F_{obs}) y las calculadas del modelo generado (F_{calc}). Esta concordancia es evaluada mediante el parámetro cristalográfico residual, factor R, cuyo valor espera acercarse lo más posible a cero, pero suele ser útil desde 0.4 para la estimación de modelos iniciales. El afinamiento del modelo estructural se realiza tanto en el espacio recíproco—analizando los factores estructurales obtenidos a partir de las amplitudes de las reflexiones—como en el espacio real, examinando el mapa obtenido tras la transformada de Fourier. Para esto existe *software* especializado que permite la automatización, pero para cuyo uso deben conocerse y aplicarse los principios cristalográficos y las propiedades bioquímicas de la molécula en estudio y, de esta manera, producir un modelo cercano a la realidad [39].

2.6 Materiales y métodos

2.6.1 Purificación y preparación de muestras

Se obtuvo transferrina de suero humano (serotransferrina, Tf) libre (apo) y cargada con hierro (holo) de fuente comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Se manejaron las mismas exactas condiciones tanto para apo-Tf como para holo-Tf a lo largo de todo el procedimiento experimental. Para eliminar trazas de contaminantes, se purificaron mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando la técnica de intercambio aniónico con una columna HiTrap Q HP® de 5 ml como fase estacionaria y una solución amortiguadora de 50 mM TRIS-

HCl pH 8.0 con 20 mM NaHCO₃ como fase móvil, y se realizó un gradiente lineal de 0 a 100% de sal con la misma solución amortiguadora adicionada con 1.0 M NaCl. Posteriormente, se intercambió a diferentes soluciones amortiguadoras usando una columna HiTrap Desalting[®] de 5 ml, dependiendo de las condiciones de cristalización a probar:

- Para la cristalización a pH 7.4, 15 mM HEPES pH 7.4 con 50 mM NaCl y 20 mM NaHCO₃.
- Para la cristalización a pH 5.5, 15 mM cacodilato de sodio pH 5.5 con 50 mM NaCl y 20 mM NaHCO₃.

Las muestras se concentraron con concentradores Amicon[®] de corte de 10,000 MWCO con centrifugación a 3000 x g a 18 °C y se filtraron a través de un poro de 0.45 µm.

2.6.2 *Cristalización: métodos convencionales y no convencionales*

Para la obtención de cristales de transferrina, se emplearon métodos convencionales como el de difusión en fase vapor ilustrado en la Figura 2.3, manteniendo la temperatura constante a 18 °C y probando distintas composiciones de agente precipitante. Se partió de una condición previamente estandarizada [40], [41] que consistía de 0.2 M de citrato de amonio tribásico a pH 7.0 y 20% (p/v) de polietilenglicol 3,350. Con esta misma composición de agente precipitante, se crecieron cristales a pH de 5.5, de 7.0 y de 8.0 con la finalidad de encontrar diferencias estructurales en su estudio posterior; se eligieron estos valores de pH por su relevancia fisiológica, simulando el ambiente endosomal (pH 5.5) y acercándose al de la sangre (7.0 y 8.0).

Con la finalidad de mantener el hierro en la holo-transferrina, considerando que las condiciones con citrato secuestran el hierro al momento de mezclarse, se exploraron diferentes composiciones para el amortiguador del agente precipitante, manteniendo la misma concentración, pH y agente precipitante. Se utilizaron las condiciones indicadas en la Tabla 1 que reúnen características similares, en cuestión de geometría química y distribución de cargas, con el citrato de amonio.

Tabla 1. Condiciones alternativas al citrato para la cristalización de holo-transferrina.

0.2 M	cacodilato de sodio trihidratado	pH 7.4	20% (p/v) PEG 3,350
	acetato de sodio		
	bicarbonato de amonio		
	formiato de sodio		
	formiato de amonio		
	malonato de sodio dibásico		

Dado que las condiciones previamente estandarizadas fueron aquellas que resultaron en los mejores cristales, se probaron con el método no convencional de contradifusión en geles en medios capilares, utilizando dos tipos de configuración experimental. Por una parte, se emplearon capilares de cuarzo Lindemann, cuya forma similar a un embudo permite compartimentalizar la región en donde se coloca la mezcla de la proteína, y en donde se coloca el agente precipitante; la configuración experimental se ilustra en la Figura 2.4. Para estos experimentos, es necesario aumentar la concentración tanto de la proteína como del agente precipitante, ya que, al mezclarse con la agarosa, se disminuye la concentración disponible. Entonces, se mezclaron $40 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de transferrina con una solución inicial de 0.3 % (p/v) de agarosa LM y se utilizó el doble de concentración de agente precipitante, es decir, 0.4 M citrato de amonio tribásico a pH 7.0 y 40% (p/v) de polietilenglicol (PEG) 3,350, resultando en una concentración de 0.1% (p/v) de agarosa al estar en proporción 1:1:1 con el agente precipitante y la solución de proteína.

Por otra parte, se llevó a cabo el protocolo de contradifusión del C-Kit Ground Pro[®] (CRT-Confocal Science Inc, Japón), cuya configuración experimental es ligeramente diferente, como se ilustra en la Figura 2.6. La ventaja de esta configuración es que es más sencilla de preparar, pues se utiliza una pieza de gel pre-formado para crear la interface de contradifusión, además de requerir menos volumen de proteína que el protocolo de contradifusión descrito anteriormente. Por otro lado, se evita el riesgo de desestabilizar a la proteína por cambios en la temperatura, así como durante el mezclado con el gel de agarosa. Se colocaron aproximadamente $8 \mu\text{l}$ de transferrina a $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el capilar, mismo que fue sellado de la parte superior y en la parte inferior se colocó la pieza de gel previamente hidratado. El capilar se introdujo en un tubo de plástico donde se colocó el agente precipitante y se mantuvo cerrado durante todo el experimento a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

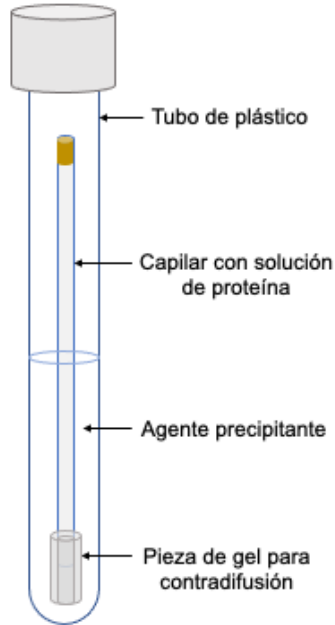


Figura 2.6. Configuración experimental para el experimento de contradifusión en gel en medios capilares utilizando el material provisto por el C-Kit Ground Pro®.

2.6.3 Difracción de rayos X y análisis cristalográfico

Se llevaron a cabo varias colectas de datos de difracción de rayos X de más de cien cristales obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales, mayoritariamente aquellos obtenidos por el método de gota sedente y algunos en medios capilares empleando el método de contradifusión, en cinco diferentes instalaciones de luz sincrotrón:

- Sincrotrón NSLS-II del Laboratorio Nacional de Brookhaven, BNL (Nueva York, Estados Unidos de América).
- Fuente de Radiación Sincrotrón de Stanford, SSRL (California, Estados Unidos de América).
- Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón, ESRF (Grenoble, Francia), *Beamline* ID23-2
- Sincrotrón ELETTRA (Trieste, Italia).
- Sincrotrón ALBA (Barcelona, España), *beamline* BL13-XALOX.

Si bien la radiación sincrotrón es una herramienta muy poderosa, los cristales no difractaron a resoluciones mayores que 3 Å. No obstante, hubo dos conjuntos de datos que permitieron obtener modelos estructurales; unos provenientes del método convencional de difusión en fase vapor y los otros del método no convencional de contradifusión en gel en medio capilar. Aquellos que permitieron resolver un modelo estructural para su depósito en el PDB se obtuvieron en la *beamline* BL-14-1 del

Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL) del SLAC National Accelerator Laboratory. El cristal fue crecido en 0.2 M citrato de amonio a pH 7.0 y 20% (p/v) PEG 3,350 a 18°C, protegido con 30% (v/v) glicerol y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido a 100 K para su irradiación con un haz de longitud de onda de 1.13 Å. Se empleó un detector Eiger 16M y una estrategia de colecta redundante, rotando la muestra en incrementos de 0.25°. El otro conjunto de datos se obtuvo en la *beamline* BL13-XALOX del sincrotrón ALBA (Barcelona, España), a partir de un cristal crecido en 0.2 M citrato de amonio a pH 7.4 y 20% (p/v) PEG 3,350 dentro de un capilar a 18 °C y protegido en las mismas condiciones. La longitud de onda del haz de rayos X fue de 0.98 Å y se empleó un detector Pilatus. El análisis cristalográfico de los datos crudos se realizó con los programas HKL3000 [42] y XDS [43], así como con autoProc [44] para los cristales de contradifusión, y posteriormente se integraron, escalaron y redujeron con el programa *Aimless* de la paquetería CCP4 [45]. El reemplazo molecular se realizó con el programa *Phaser-MR* de Phenix [46], el afinamiento automatizado con *Phenix.refine* y el afinamiento manual con Coot [47]. Los modelos fueron visualizados con el software UCSF Chimera [48].

2.6.4 Desglicosilación

Para la remoción de las glicosilaciones en la transferrina, se incubó a la transferrina con la enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F[®]) de *Elizabethkingia meningoseptica* (Sigma) de acuerdo con el manual de Bio-Rad (Cat. No. 170-6883). Se añadieron 2 µl de solución de PNGasa F a 500 µg de transferrina en 50 µl de una solución amortiguadora 50 mM fosfato de sodio, pH 7.5 (denominado *buffer* de reacción). Se probaron diferentes condiciones de incubación; a temperatura ambiente durante 72 h, a 37 °C durante 12 h y con el doble de cantidad de PNGasa F.

Para la purificación posterior, se siguió el protocolo de purificación mediante intercambio aniónico descrito en el apartado anterior.

Para la electroforesis desnaturizante en gel (SDS-PAGE), se emplearon los marcadores NZYTech *low molecular weight protein marker II* (NZYTech) y *Broad-Way Dual Prestained Protein Marker* (iNtRON Biotechnology).

2.7 Resultados y discusión

Se comprobó la pureza de apo-Tf y holo-Tf comerciales mediante SDS-PAGE, observándose el mismo perfil electroforético y pureza en ambos casos.

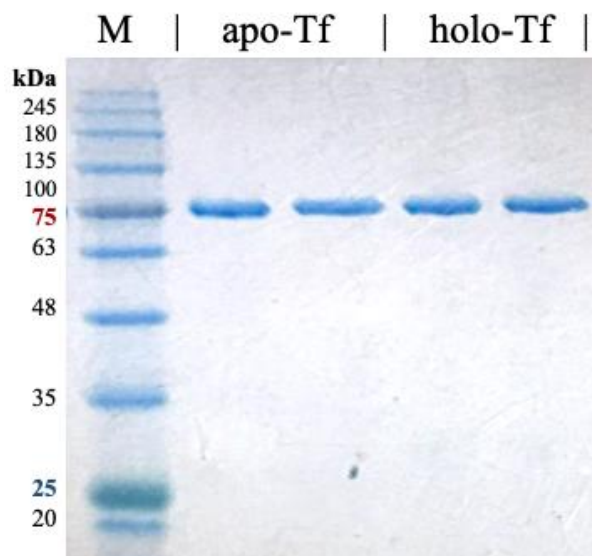


Figura 2.7. SDS-PAGE para comprobar la pureza de la transferrina de fuente comercial en su forma libre (apo-Tf) y unida a hierro (holo-Tf).

Se obtuvieron numerosos cristales con el método de difusión en fase vapor en gota sedente en la búsqueda de encontrar condiciones óptimas; además de modificar factores como la composición del agente precipitante, el pH de la solución y la temperatura. Posteriormente, se probó una serie de técnicas no convencionales de cristalización, con base en el conocimiento de que éstos han demostrado eficacia para mejorar la calidad de los cristales obtenidos con ellas en proteínas modelo [36], [37], [49], [50].

En primer lugar, se reprodujeron experimentos de cristalización de transferrina utilizando condiciones previamente reportadas [40] que consistían en una combinación de 0.2 M de citrato de amonio a pH de 7.0 y 20% (p/v) de polietilenglicol 3,350, las cuales permitieron el crecimiento de cristales con morfología uniforme, bien facetados y reproducibles bajo las mismas condiciones de temperatura y probando distintas concentraciones de proteína (Figura 2.8).

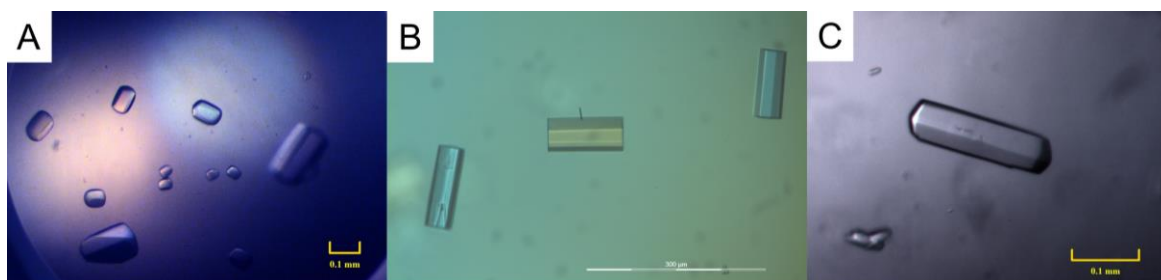


Figura 2.8. Cristales de transferrina obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 7.0 bajo condiciones previamente estandarizadas [40], [41]. En todos los casos (A, B y C), se emplearon las

mismas condiciones de 0.2 M citrato de amonio a pH 7.0 y 20 % (p/v) PEG 3,350 y se mantuvieron a 18 °C.

Sin embargo, el hecho de utilizar citrato en la solución de agente precipitante implicaba obtener cristales únicamente de apo-transferrina, dado que el hierro era secuestrado por el anión de citrato. Por lo tanto, se probaron diferentes soluciones amortiguadoras para el agente precipitante alternas al citrato. En la Figura 2.9 se observan los resultados de estos experimentos, que a pesar de no mostrar facetas bien definidas, muestran indicios de nucleación y, de particular interés, muestran una coloración característica de la presencia de hierro en su interior. Si bien se han reportado cristales de transferrina cargada con hierro (holo-transferrina) [6], las condiciones de temperatura resultan muy poco prácticas experimentalmente, especialmente si su difracción de rayos X no es algo accesible *in situ*, para no perjudicar la integridad de los cristales por cambios de temperatura. Por lo tanto, las condiciones probadas podrían en un futuro ser optimizadas para buscar la obtención de cristales de holo-transferrina bajo condiciones de temperatura de 18 °C, que hacen más manejable su manipulación para ser documentados y para ser trasladados hacia instalaciones de radiación sincrotrón para su análisis cristalográfico.

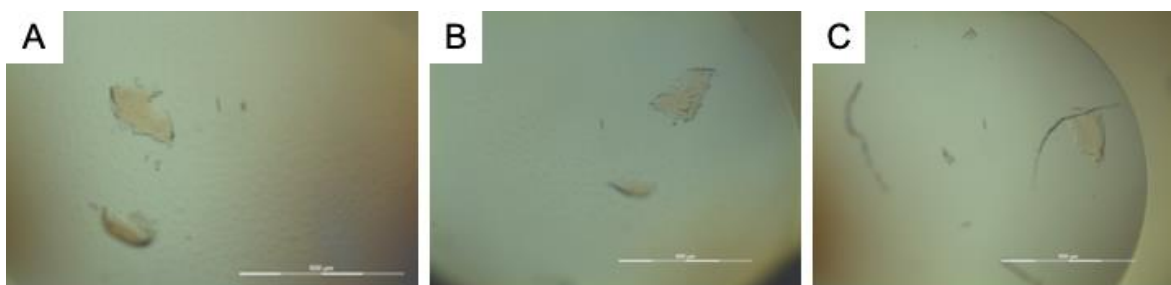


Figura 2.9. Cristales de holo-transferrina crecidos en difusión en fase vapor a 18 °C en condiciones libres de citratos para evitar la unión del hierro a los citratos del medio: A) 0.2 M cacodilato de sodio trihidratado, 20% (p/v) PEG 3,350, pH 7.4, B) 0.2 M acetato de sodio, 20% (p/v) PEG 3,350, pH 7.4, C) 0.2 M bicarbonato de amonio, 20% (p/v) PEG 3,350, pH 7.4. A pesar de mostrar una morfología irregular, es posible apreciar la coloración rojiza característica de la presencia de hierro.

Con base en el conocimiento de las condiciones fisiológicamente relevantes dentro del ciclo de la transferrina, se crecieron cristales bajo condiciones de pH alusivas a los diferentes compartimentos en los que se encuentra la transferrina a lo largo del mecanismo de transporte de hierro; particularmente, alrededor de 7.4, que corresponde al pH sanguíneo y 5.5, correspondiente a los endosomas. En la Figura 2.10 se ilustran los cristales crecidos bajo las mismas condiciones de temperatura y composición del agente precipitante pero variando su pH a valores de 5.5, 7.0 y 8.0.

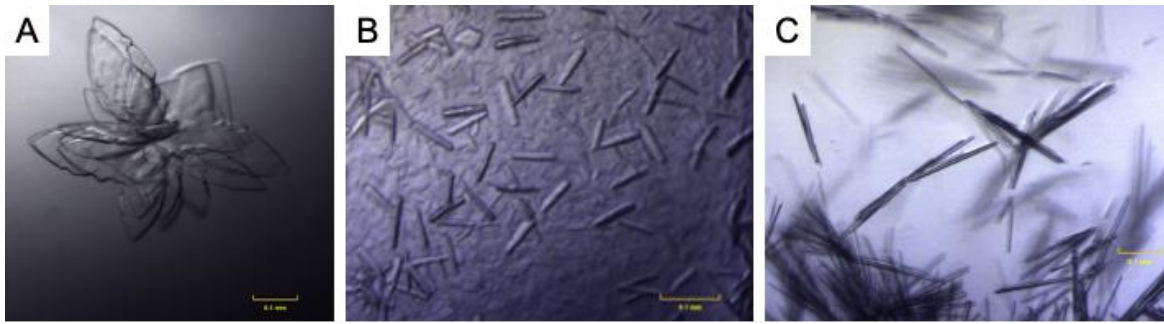


Figura 2.10. Cristales de apo-transferrina obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 5.5 (A), a pH 7.0 (B) y a pH 8.0 (C). Se observan morfologías cristalinas distintas en las tres condiciones de pH.

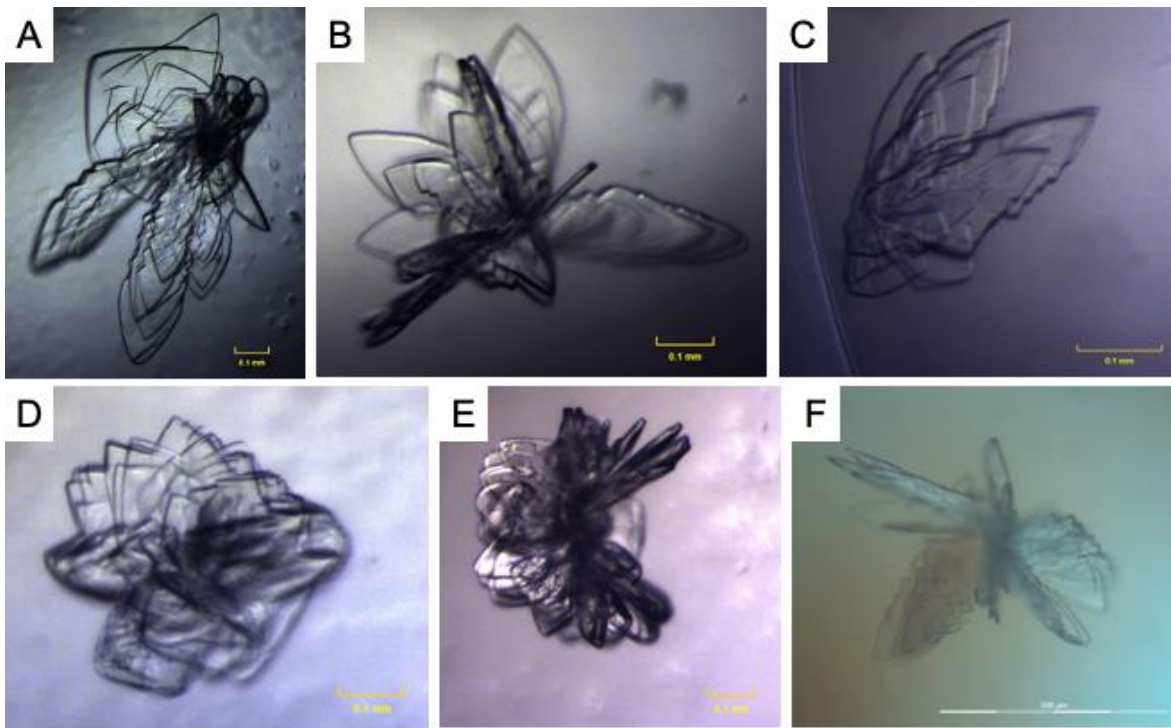


Figura 2.11. Cristales de apo-transferrina crecidos a pH 5.5. Se observa crecimiento policristalino en forma de láminas provenientes, aparentemente, de un núcleo central (A-E). Al ser visualizados a través de polarizadores, se confirma que se trata de cristales de proteína debido a su baja birrefringencia, observándose una sola tonalidad de color continua en sus facetas (F).

Los resultados (Figura 2.11) muestran que es posible crecer cristales de transferrina a pH 5.5 de manera reproducible bajo las condiciones probadas y se mantienen lo suficientemente estables durante su manipulación para caracterizar su grupo espacial; sin embargo, el interior del cristal carece de la suficiente integridad para resistir la radiación, haciendo imposible generar una estrategia para coleccionar datos de difracción de rayos X (Figura 2.12).

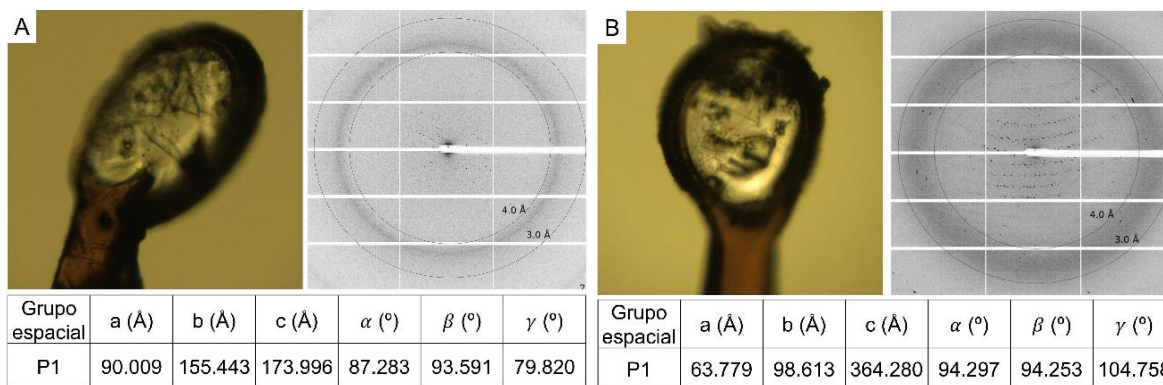


Figura 2.12. Cristales de apo-transferrina crecidos a pH 5.5 con sus respectivos patrones de difracción de rayos X y cálculos preliminares de las dimensiones de celda y grupo espacial. Se muestran dos diferentes cristales (A y B) obtenidos en las mismas condiciones, pero cuyas dimensiones de celda difieren, siendo el de B más grande. No se completó un análisis más detallado ya que la difracción solo alcanzó valores hasta 5-10 Å.

Una posible explicación a la menor estabilidad de los cristales crecidos en este valor de pH podría residir en las cargas de la transferrina y su impacto en la interacción proteína-proteína al momento de formar contactos en la red cristalina. Al estar en un medio con más protones, las cargas de la transferrina se modifican, causando la reorientación de algunas regiones de la molécula y en consecuencia, que los contactos que suelen hallarse en un pH neutro se pierdan o sean más débiles. Asimismo, sabiendo que la distribución de cargas es uno de los factores que influyen en la nucleación y en la existencia de polimorfismo durante el crecimiento de los cristales [36], [51], se explica la diversidad en la morfología observable de los cristales de transferrina crecidos a diferentes condiciones de pH. De igual manera, se explica el empaquetamiento de la transferrina en un diferente grupo espacial (P1) al que regularmente ocupa (P2₁2₁2₁) (ver Figura 2.12), pues el potencial electrostático en torno a la proteína en condiciones de pH distintas también determina la distribución de las moléculas de agente precipitante, y esto a su vez dirige el empaquetamiento [52].

Tomando en cuenta la necesidad de proveer un control para la nucleación, con el objetivo de optimizar las condiciones de cristalización para obtener cristales con mayor estabilidad y calidad cristalográfica, se realizaron experimentos de cristalización con métodos no convencionales, particularmente la contradifusión en geles en medios capilares, descrita en el apartado 2.4.2. La Figura 2.13 ilustra claramente lo descrito en cuanto a las etapas de nucleación y crecimiento de los cristales a lo largo del capilar, apreciándose una región de sobresaturación en la parte alta del capilar, transitando por una región de nucleación y, finalmente, observándose la presencia de monocristales bien facetados en la parte inferior del

capilar, esto es, la más lejana a la intercara entre el agente precipitante y el gel con la proteína.

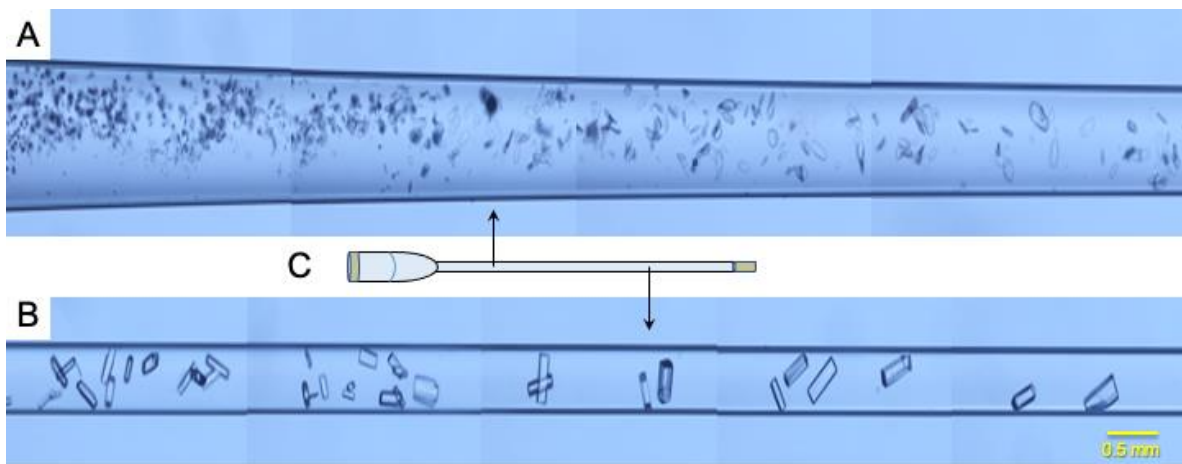


Figura 2.13. Evolución espaciotemporal de cristales de transferrina crecidos mediante contradifusión en agarosa en un capilar. Se aprecia el inicio de la nucleación en la parte superior del capilar (A) hasta el crecimiento de monocristales en la parte inferior del capilar (B). C) Referencia esquemática del capilar. Estos resultados fueron publicados en [33].

El hecho de llevar a cabo la cristalización dentro de capilares presenta la ventaja de poder apreciar la morfología de los cristales desde distintos ángulos, como puede verse en la Figura 2.14A. Por otro lado, es posible observar algunos fenómenos interesantes de la nucleación; por ejemplo, en las Figuras 2.14 B, C y D, los cristales posiblemente emergieron mediante nucleación heterogénea, siendo que crecen sobre una superficie y que su crecimiento siguió un comportamiento epitaxial, es decir, orientado en una dirección sobre alguna superficie de un material diferente al cristal [24], [53], como puede ser otro cristal (B), el capilar (C) o partículas contaminantes (D). En la Figura 2.14 E se muestra una macla de contacto con crecimiento perpendicular, que dio lugar a un cristal pequeño cuya difracción fue la mejor en la colecta de rayos X, quizás debido a un crecimiento tipo epitaxial. Dentro de la teoría clásica de la nucleación se proponen dos vías, la nucleación homogénea y la nucleación heterogénea. En la primera, se plantea que la nucleación ocurre en presencia de una superficie de referencia, que puede ser la proteína en sí, mientras que en la segunda, se plantea que el crecimiento ocurre a partir de una superficie cargada o hidrofóbica. La nucleación sobre una superficie, en ocasiones, ocurre con mayor facilidad ya que requiere menor energía libre para formar enlaces químicos entre el cristal y dicha superficie, que la energía necesaria para mantener los enlaces de solvatación y por lo tanto, favorecer la formación del cristal sobre la superficie. Entonces, lo observado podría implicar que la presencia de partículas

ajenas promueva el crecimiento, al actuar como agentes nucleantes, reduciendo el trabajo necesario para generar el núcleo crítico en esa región del capilar [30], [54].

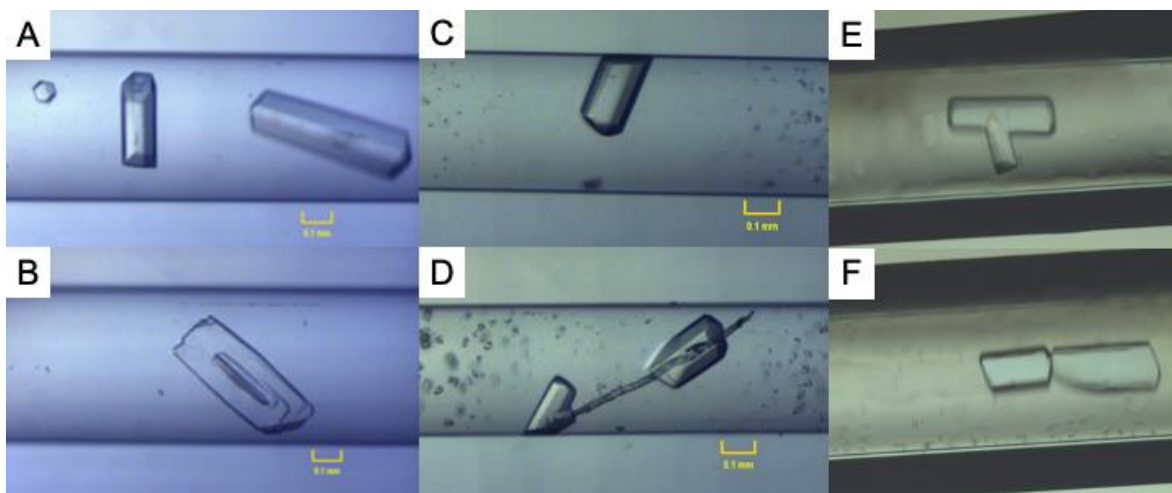


Figura 2.14. Cristales de transferrina crecidos mediante contradifusión en agarosa en medios capilares. Se observan distintas orientaciones en el crecimiento de los cristales dentro del capilar (A), crecimiento epitaxial sobre el mismo cristal (B), sobre la superficie del capilar (C) y a partir de partículas contaminantes presentes en la solución (D). Los cristales en (E) y (F) fueron obtenidos en capilares para contradifusión del C-Kit Ground Pro®; se observa en (E) el crecimiento de un cristal doble formando una macla de contacto casi perpendicular (crecimiento tipo epitaxial) y en (F) un cristal satelital cercano a otro de mayor tamaño.

Finalmente, en las Figuras 2.14 E y F se muestran cristales crecidos en una configuración experimental ligeramente diferente, ilustrada en la Figura 2.6, en la cual la proteína se encuentra en solución dentro del capilar y el gel se coloca en un extremo del capilar, quedando como barrera semipermeable para ralentizar la difusión del agente precipitante en el que está inmerso el capilar. En contraste, los experimentos anteriormente descritos se configuraron tal como se ilustra en la Figura 2.4, siendo que se mezcló la solución de proteína con el gel de agarosa líquido, quedando la proteína embebida en el gel de agarosa una vez polimerizado. Si bien se ha logrado crecer cristales de transferrina bajo esta última configuración, la crioprotección en la etapa previa a la difracción de rayos X y/o el daño por radiación han sido factores extrínsecos que han afectado la estabilidad de los cristales, complicando el análisis cristalográfico por rayos X de alta resolución. Esto no necesariamente significa que esta configuración experimental no haya mejorado la calidad cristalográfica, sino que la caracterización de dichos cristales para observar el efecto de estas estrategias en etapas posteriores a la cristalización ha sido más complicada. Ahora bien, la difracción de los cristales de las Figuras 2.14 E y F produjo un conjunto de datos que permitió el análisis cristalográfico, sugiriendo que probablemente la configuración experimental en este caso fue más adecuada

para mantener bajo control los factores extrínsecos mencionados, como se discutirá más adelante.

A pesar de los retos enfrentados en la búsqueda de condiciones óptimas para el estudio cristalográfico de la transferrina, se colectaron datos de difracción de rayos X de un cristal de apo-Tf obtenido a partir de condiciones previamente estandarizadas [40], [41] mediante difusión en fase vapor, con lo cual se pudo obtener un modelo estructural de la transferrina glicosilada nativa (Figura 2.15), con estadísticas cristalográficas satisfactorias que fueron validadas para su depósito en el PDB bajo el código de identificación (ID) 7Q1L, y publicado como producto de este trabajo [55].

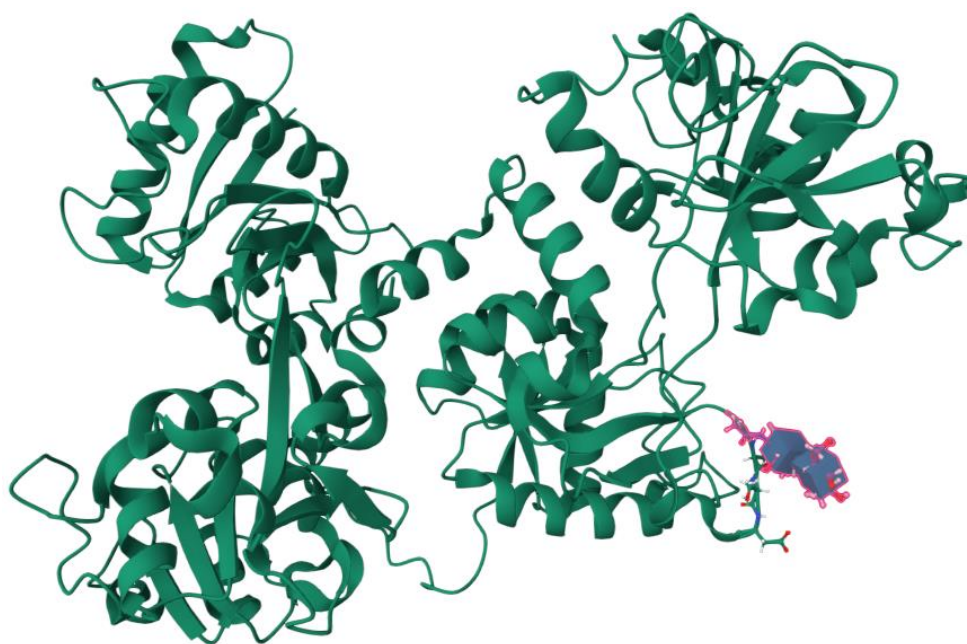


Figura 2.15. Modelo estructural tridimensional de la apo-transferrina humana glicosilada publicado y depositado en el PDB con el ID: 7Q1L. En rosa se resalta la glicosilación de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranos (NAG-NAG).

Por otra parte, se lograron obtener datos de difracción de rayos X de un cristal de apo-Tf crecido mediante contradifusión en gel en medios capilares, con los que se obtuvo un modelo estructural con una resolución de 2.7 Å (Figura 2.16B), cuyas estadísticas cristalográficas se comparan con aquellas del modelo reportado producto de este trabajo (Tabla 2).

Tabla 2. Colecta de datos y estadísticas de afinamiento para los cristales de apo-Tf obtenidos. Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución.

Proteína	apo-Transferrina	apo-Transferrina
Método	Difusión en fase vapor	Contradifusión en gel en medios capilares
Ligando	NAG	NAG
Identificador PDB	7Q1L	-
Colecta de datos		
<i>Beamline</i>	BL14-1	BL13-XALOX
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda		
a, b, c (Å)	87.63, 102.15, 199.97	87.945, 102.808, 199.499
Unidad asimétrica	2	2
Resolución (Å)*	37.24 - 3.0 (3.107 - 3.0)	99.75 - 2.7 (2.797 - 2.7)
R _{merge} (%)*	9.32 (116.0)	5.523 (118.5)
I/σ ₁ *	12.13 (1.16)	19.68 (1.48)
Completez (%)*	99.81 (99.82)	99.90 (99.90)
Reflexiones únicas*	36660 (3606)	50440 (4957)
Multiplicidad*	7.3 (8.0)	6.7 (6.6)
CC _(1/2)	0.999 (0.559)	0.999 (0.643)
Afinamiento		
Resolución (Å)	37.24 - 3.00	99.75 - 2.7 (2.797 - 2.7)
R _{work} /R _{free} (%)	22.03 / 25.01	21.22 / 28.66
No. átomos	10716	10826
Proteína	10592	10677
Ligandos	235	206
Agua	7	13
Factor B (Å ²)	120.52	100.64
Desviaciones cuadráticas medias (RMS)		
Longitudes de enlace (Å)	0.005	0.018
Ángulos de enlace (°)	0.85	1.60
Ramachandran (%)		
Favorecidos	92.95	88.7
Permitidos	6.75	10.27
Fuera	0.30	1.03

Entre los principales parámetros estructurales que definen la calidad de un modelo, la resolución indica qué tan lejos del centro del patrón de difracción se lograron coleccionar reflexiones del cristal. Tomando en cuenta que el valor de la resolución se encuentra en el espacio recíproco, lo que se está observando en realidad son datos obtenidos de planos paralelos espaciados, como en este caso, a 3 Å y 2.7 Å entre sí, dentro de la celda unitaria.

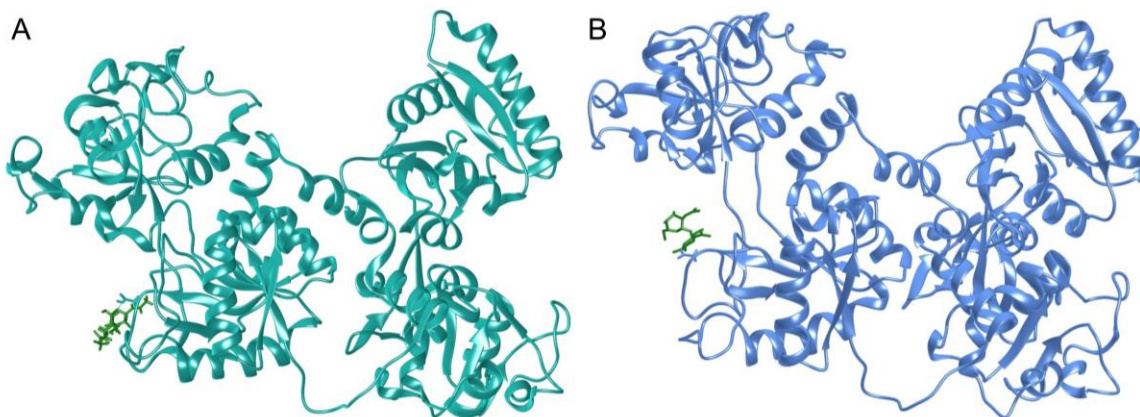


Figura 2.16. Modelos estructurales de la apo-Tf. A) apo-Tf reportada en el PDB con el ID 7Q1L; B) apo-Tf crecida en contradifusión en geles en medios capilares. Se ilustran en color verde las glicosilaciones en el residuo Asn413.

La resolución en el caso de la apo-Tf cristalizada por el método de contradifusión en gel en medios capilares es evidencia del fundamento y objetivo de utilizar dicho método, que es, en términos simples, ofrecer una vía de crecimiento que involucre menor desorden y mayor calidad. Este parámetro está directamente relacionado con el grado de orden interno, siendo que, a mayor resolución, las moléculas se encuentran dispuestas periódicamente de manera más uniforme, permitiendo observar más detalles. A diferencia de las estructuras cristalinas de moléculas pequeñas, cuyos contactos intermoleculares son directos y por ende más compactos, los cristales macromoleculares poseen canales y cavidades donde se distribuye el solvente (agua). Esto afecta directamente el valor de la resolución ya que se aumenta el espacio entre las moléculas, debilitando sus contactos y provocando irregularidad en sus orientaciones [24]. Si bien no pueden resolverse todas las moléculas de agua presentes en el modelo estructural, puede conocerse el porcentaje de solvente presente en el cristal tras analizar los datos o calcularse un estimado mediante el valor del coeficiente de Matthews, V_M , definido como el volumen de cristal por unidad de peso molecular de proteína. Generalmente, las estructuras con mayor resolución y mayor densidad de empaquetamiento poseen valores de V_M y contenido de solvente menores, y viceversa [56]. Como se indica en la Tabla 3, la transferrina tiene un contenido alto de solvente, congruente con su valor de resolución.

Tabla 3. Contenido de agua y coeficiente de Matthews de la transferrina.

Contenido de solvente (%)	58.94
Coficiente de Matthews, V_M ($\text{\AA}^3/Da$)	2.99

Por otra parte, el factor B es un parámetro que refleja el grado de movimiento térmico dentro del cristal, siendo que un valor más elevado implica mayor movilidad.

Como se muestra en la Tabla 2, los valores de factor B de la apo-Tf son muy altos, con una diferencia de veinte unidades menos en el modelo de la apo-Tf cristalizada por contradifusión, contra aquel de difusión en fase vapor. En principio, y como se ha evidenciado con otras proteínas [37], la técnica de contradifusión muestra una ventaja significativa al eliminar las corrientes de convección que contribuyen al movimiento térmico dentro del cristal. Si bien se observó una disminución en el factor B, que podría tener un efecto sobre la calidad de los datos, también se demostró la naturaleza dinámica de la transferrina. Existen otras propiedades intrínsecas de la transferrina que contribuyen a esto último, por ejemplo, la presencia de regiones flexibles, como asas y el péptido no estructurado que conecta a ambos lóbulos, que generan regiones de densidad electrónica muy poco definidas que afectan la calidad del mapa de densidad electrónica final y, por consiguiente, los parámetros de calidad del modelo [57]. Particularmente, las regiones alrededor del sitio de glicosilación contienen varias asas, como puede verse en las Figuras 2.15, 2.16 y 2.18. La alta movilidad de la transferrina representa un reto desde el punto de vista del análisis cristalográfico; sin embargo, es una propiedad sumamente importante para la función biológica de esta proteína.

Otro factor importante que debe tomarse en cuenta durante el análisis cristalográfico de la transferrina humana es que en su estado nativo posee glicosilaciones. Éstas representan 6% de la masa total de la transferrina y son glicanos bicatenarios [58] unidos covalentemente al nitrógeno de la cadena lateral de la asparagina (N-glicanos) en sitios de N-glicosilación caracterizados por la secuencia Asn-X-Ser/Thr [59]; en este caso, específicamente en las Asn413 y Asn611 [60], [61], aunque también se ha reportado en la Asn432 y Asn630 [62], [63]. Cabe considerar que la glicosilación de las proteínas depende de muchos factores que influyen en el proceso, por lo cual puede haber heterogeneidad en la misma población de glicoproteínas, dando lugar a glicofomas que se distinguen por poseer diferentes N-glicanos [59]. Por otra parte, la ocupación de los sitios de unión a N-glicanos no necesariamente ocurre en todos los casos, pues su unión depende de la accesibilidad que le confiera la misma estructura de la proteína [64]. En el modelo estructural publicado, producto de este trabajo (Figura 2.15), se hizo un ajuste aproximado de la glicosilación correspondiente a una cadena de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranososa-(1-4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (NAG1 y NAG2), pues se observó una región de densidad electrónica lo suficientemente grande para ubicarla en la Asn413. Una vez afinada la estructura, se observó que la glicosilación interactúa mediante un puente de hidrógeno con la Lys414 (Figura 2.17), misma que es seguida de Ser415, cumpliendo con la triada de reconocimiento para N-glicosilación Asn-X-Ser que se describió anteriormente.

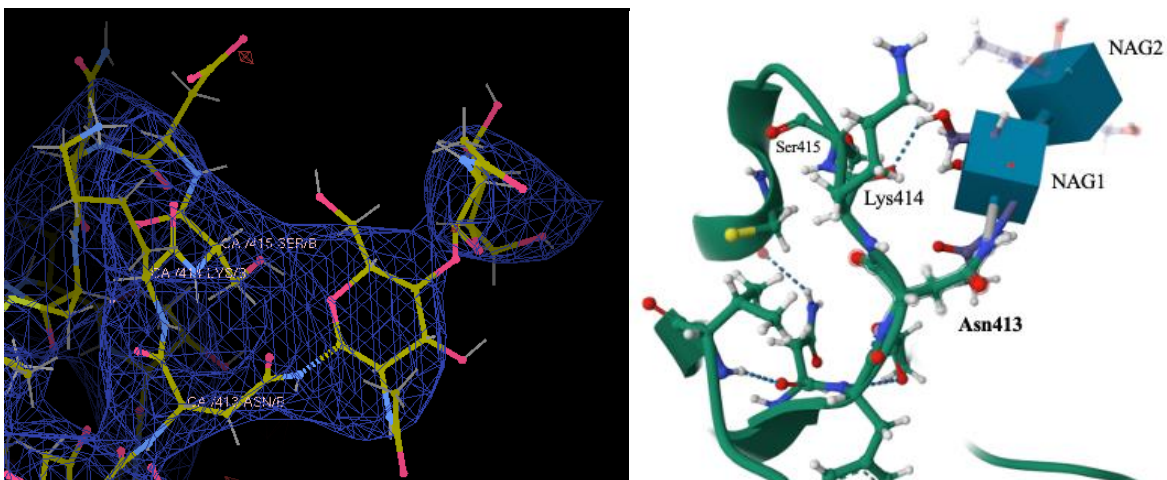


Figura 2.17. Sitio de glicosilación en el modelo estructural de la apo-Tf (PDB 7Q1L). Se ajustó el glicano NAG-NAG en la densidad electrónica visible a 1.02 rmsd, uniéndose a la Asn413.

Con frecuencia, las glicosilaciones en las proteínas pueden representar un obstáculo para la cristalización y el subsecuente análisis cristalográfico. Si bien, en ocasiones, pueden promover los contactos intermoleculares para formar la red cristalina, también pueden interferir en el empaquetamiento y morfología del cristal, dependiendo del tipo de glicano que se una [64]. Debido a que las glicosilaciones presentan mayor movilidad, ésta genera un efecto propagativo en la energía global de la proteína, aumentando la entropía de superficie en su microambiente. Esto, consecuentemente, genera ruido en las estadísticas del modelo estructural, por ejemplo, incrementando el valor del factor B [65], [66]. Alternativamente, las glicosilaciones no permiten el acceso del crioprotector de manera eficiente, formando una capa densa. Esto, a su vez, tiene coherencia con el valor de la resolución de los datos obtenidos, pues quiere decir que debido a la alta energía que posee la transferrina dentro del cristal, ya sea por el desplazamiento debido a la vibración de sus átomos y/o al desorden ocasionado por átomos que no ocupan la misma posición en cada celda unitaria o unidad asimétrica, la observación de reflexiones a mayor resolución se vio impedida [38].

La glicosilación en la transferrina es una modificación cotraduccional que participa en el plegamiento, colocándose cerca de cisteínas que formarán los puentes disulfuro que le confieren estabilidad a la estructura terciaria [67]. La N-glicosilación está situada en una región de giro de la cadena polipeptídica, sugiriendo que el azúcar podría estar estabilizando dicha región o incluso promoviendo el cambio de dirección en la cadena polipeptídica [68]. Como se explica en el pie de figura, la presencia o ausencia de la N-glicosilación en Asn413 no parece afectar la estructura significativamente. Dada la resolución de ambos modelos, la conformación exacta

del glicano puede variar, por lo cual se indica su ubicación de manera ilustrativa dentro de los límites experimentales.

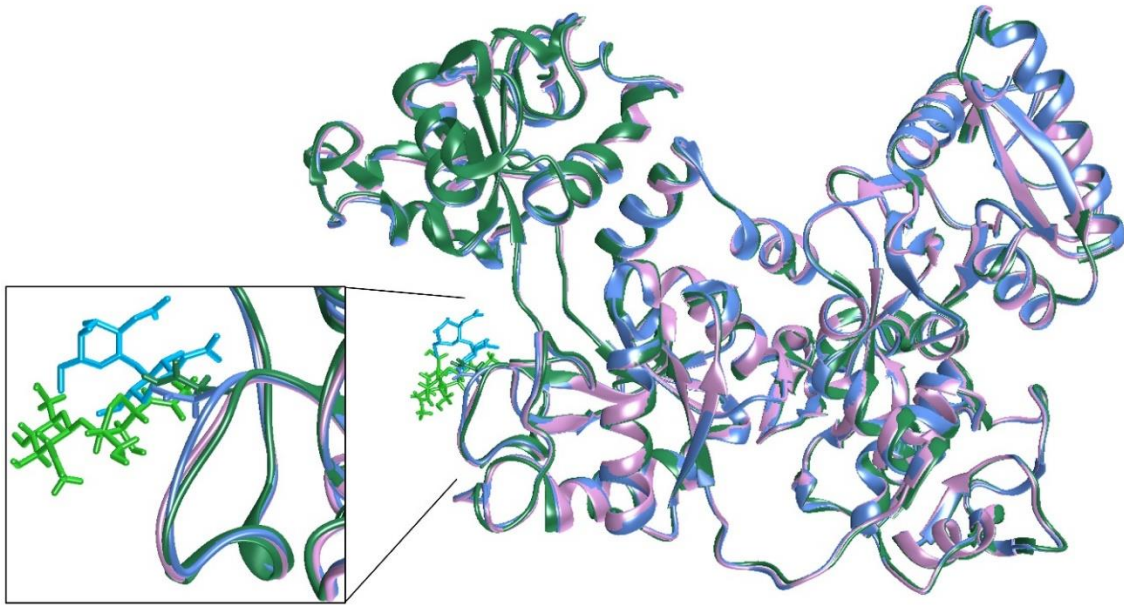


Figura 2.18. Superposición de los modelos de la apo-transferrina. Clave por color: verde, apo-Tf publicada en el PDB con el ID 7Q1L—la glicosilación está ilustrada en color verde brillante; azul, apo-Tf crecida en contradifusión en geles en medios capilares—la glicosilación está ilustrada con azul brillante; rosa, apo-Tf glicosilada crecida en contradifusión en geles en medios capilares, afinada sin glicosilaciones. Se observa una similitud casi idéntica entre los tres modelos, con un valor de RMSD de 0.415 Å entre la verde y la azul y un valor de RMSD de 0.377 Å entre la verde y la rosa. Estos valores fueron calculados con la herramienta *Matchmaker* del software UCSF Chimera [69], usando 676 pares atómicos de carbonos alfa y utilizando como límite 2 Å. En el recuadro se hace un acercamiento a la región donde se encuentra la glicosilación en Asn413 y puede observarse que la orientación es diferente entre el modelo verde y el azul, explicando el valor mayor de RMSD.

En particular, las N-glicosilaciones no tienden a afectar significativamente la estructura global de las proteínas, como puede apreciarse en la Figura 2.18, pero sí su comportamiento y estabilidad en solución, así como en su función biológica [70]. La glicosilación de la transferrina participa, mas no es determinante [71], [72], en la especificidad de unión a receptores, llámese el receptor de transferrina y el receptor de asialoglicoproteínas, pero el grado de glicosilación en la transferrina no implica una diferencia significativa en el transporte de hierro [73]. En su lugar, las glicosilaciones en la transferrina parecen tener un rol de marcadores fisiopatológicos y de diversidad de poblaciones [62], [73].

Como estrategia alterna a los métodos no convencionales de cristalización, se propuso hacer un análisis más detallado en el efecto de las glicosilaciones en la transferrina, para descartar que sea un factor clave que impacta la calidad

cristalográfica [65]. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la transferrina empleando la enzima péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) de *Elizabethkingia meningoseptica*, una proteína de 36 kDa cuya función consiste en escindir N-glicosilaciones específicamente unidas a Asn, desaminándola para dejarla como Asp después de que se eliminó el N-glicano. Algunos protocolos sugieren realizar un análisis de secuencia después de haber incubado con la glicosidasa para verificar este cambio [59]; no obstante, de acuerdo con el manual de uso de la PNGasa F (BioRad, No. de catálogo 170-6883), su efecto también puede observarse por medio de SDS-PAGE. En este último se esperaría observar mayor movilidad para las proteínas desglicosiladas, debido a la reducción de su masa molecular al perder las glicosilaciones. En la Figura 2.19 se muestran los resultados de la desglicosilación de la transferrina bajo distintas condiciones de incubación con la PNGasa. Se buscó incrementar la actividad de la glicosidasa incubando a 37 °C y, en otro experimento, el rendimiento de reacción de desglicosilación duplicando la cantidad de glicosidasa que reaccionó con la transferrina; no obstante, no se observó diferencia entre estas condiciones.

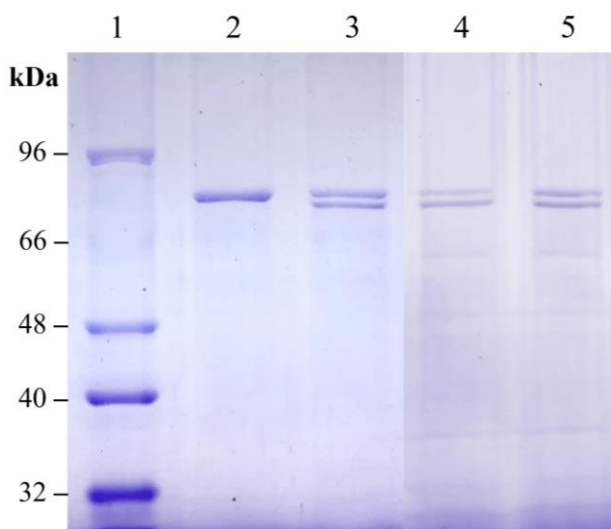


Figura 2.19. SDS-PAGE donde se evidencian las dos poblaciones resultantes de la desglicosilación de la transferrina. Se muestra el marcador de masa molecular (1), la transferrina antes de incubar (2), la transferrina incubada con PNGasa F durante 72 h a temperatura ambiente (3), durante 24 h a 37 °C (4) y con doble cantidad de PNGasa F (5); en los últimos tres casos, la banda superior corresponde a la transferrina glicosilada, mientras que la banda inferior corresponde a la transferrina desglicosilada, con una masa molecular ligeramente menor.

A partir de lo observado en el SDS-PAGE, se buscó separar las dos poblaciones observadas para obtener la transferrina desglicosilada, mediante cromatografía de intercambio aniónico. Ambas poblaciones aparecen en distintos volúmenes de elución; sin embargo, los picos cromatográficos están muy cercanos entre sí, como

puede verse en la Figura 2.20. Esto último se explicó tras colectar las fracciones correspondientes y analizarlas en un SDS-PAGE (Figura 2.21), al observar que las dos poblaciones están presentes en todas las fracciones colectadas.

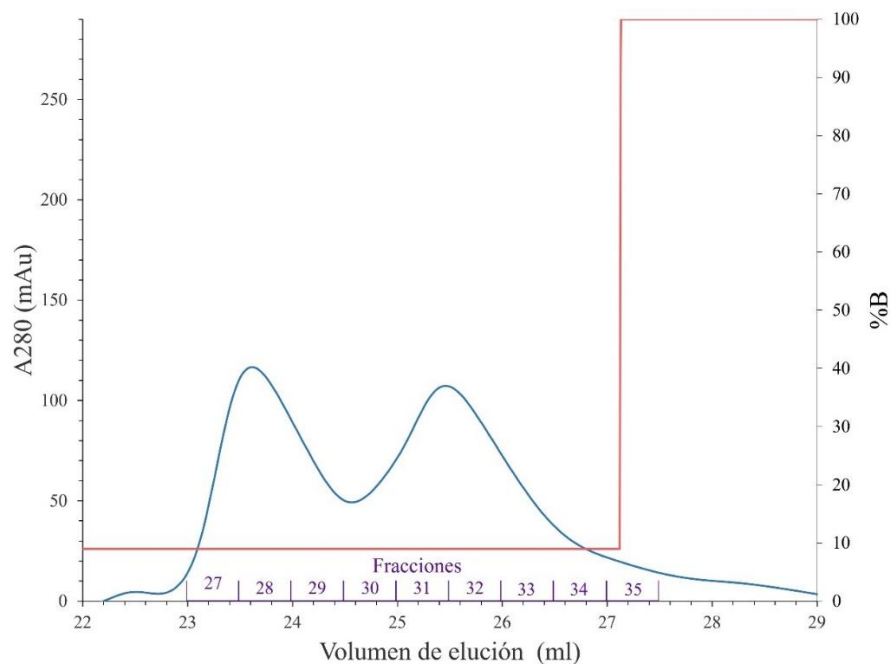


Figura 2.20. Cromatograma de intercambio aniónico donde se separaron las poblaciones de transferrina glicosilada de la desglicosilada, tras la incubación con PNGasa F, observadas como dos picos cercanos entre sí. Se muestran las fracciones correspondientes que fueron colectadas y en el eje vertical secundario se muestra el gradiente de sal representado como %B.

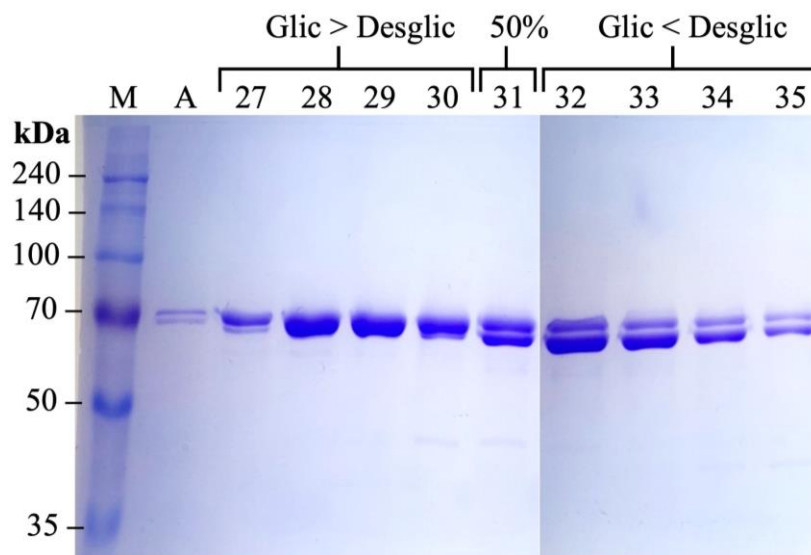


Figura 2.21. SDS-PAGE de las fracciones 27-35 colectadas de transferrina (ver cromatograma de la Figura 2.20). El carril M indica el marcador de masa molecular y el carril A la transferrina antes de la

separarla en la columna cromatográfica. Los carriles 27-30, correspondientes a las fracciones colectadas, muestran todas una banda superior más gruesa que corresponde a la transferrina glicosilada (Glic), los carriles 32-35 muestran una banda inferior más gruesa correspondiente a una mayor proporción de transferrina desglicosilada (Desglic) y el carril 31 muestra la fracción intermedia, en la cual se ve una proporción de 50% de cada una de las poblaciones.

La aparición de fracciones con ambas poblaciones de transferrina glicosilada y desglicosilada parece indicar que la remoción de los N-glicanos es incompleta, una desventaja conocida de esta estrategia [64]. Sin embargo, parece ser que sí hay una diferencia en la proporción de dichas poblaciones, ya que el patrón de elución en el cromatograma muestra que la transferrina aparentemente desglicosilada tiene mayor tiempo de retención en la columna, al aparecer a un volumen de elución mayor que la glicosilada. Esto puede interpretarse como que la ausencia de glicosilaciones tiene un efecto en la distribución de cargas en la superficie de la transferrina que interactúa con la columna de intercambio aniónico, haciéndola más negativa y por ende, promoviendo su retención más que cuando está glicosilada.

En vista de que la transferrina glicosilada permanece en las muestras purificadas, es evidente que se requiere seguir un protocolo más exhaustivo para, por un lado, aumentar el rendimiento de la desglicosilación y, por otro lado, lograr separarla. No obstante, este fue un primer alcance para obtener transferrina libre de glicosilaciones mediante técnicas convencionales. Para investigaciones futuras, si se parte de la misma muestra, se sugiere emplear un método de separación más específico en el que puedan separarse los N-glicanos liberados, como una cromatografía de afinidad en la que se empleen proteínas de unión a azúcares, como las lectinas, así como para retener a la transferrina glicosilada y separarla de la desglicosilada [59]. Adicionalmente, se propondría emplear las mismas condiciones que se usaron en este trabajo para la cristalizar a la proteína glicosilada (es decir, en su forma nativa), pero para cristalizar a la proteína desglicosilada, con el objetivo de compararlas y observar el impacto que tendría esta modificación sobre su estructura y calidad cristalográfica.

CAPÍTULO 3. ESTUDIO ESTRUCTURAL MEDIANTE DISPERSIÓN DE RAYOS X A ÁNGULO BAJO (SAXS)

3.1 Introducción

Si bien la cristalografía de rayos X es la técnica más frecuentemente empleada para la resolución estructural de moléculas biológicas, existen técnicas que permiten estudiarlas en un estado cuasi-nativo en solución, sin la necesidad de obtener cristales de proteína que, en ocasiones, implica una restricción espacial. Una de estas técnicas es la dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS), que consiste en la colecta de la radiación dispersada a ángulos menores de 10° por una muestra en solución. La señal resultante de esta dispersión es indicativa de la diferencia de densidad electrónica entre el campo eléctrico del rayo incidente y los electrones de la muestra en la escala macromolecular. Entonces, lo que se obtiene es una curva de dispersión que aporta información sobre la forma y tamaño de la partícula en estudio, así como su conformación y distribución en solución [74].

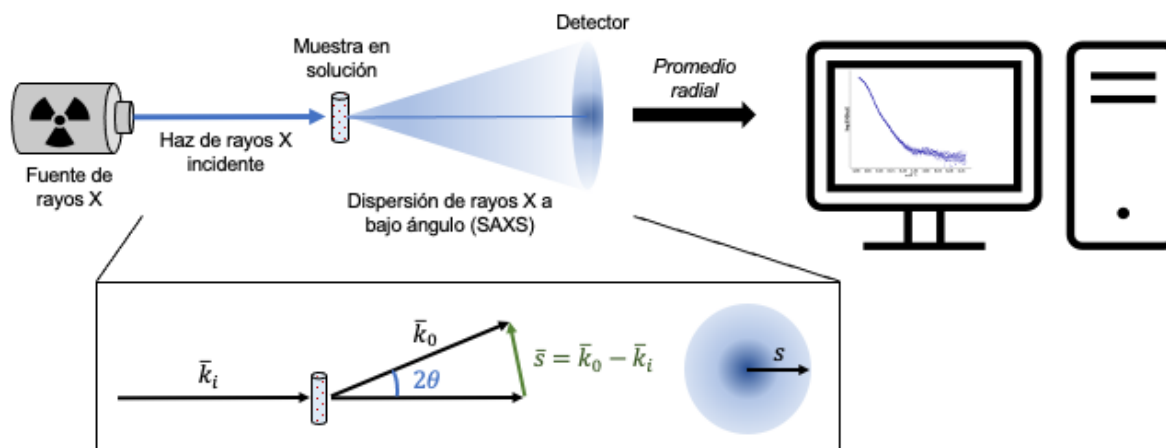


Figura 3.1. Experimento general de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) [74], [75].

El perfil de dispersión se define como $I(s)$ cuando la muestra es isotrópica; esto significa que se trata de una solución cuyo soluto tiene una orientación al azar, para lo cual es necesario promediar radialmente el patrón de dispersión bidimensional y así obtener una curva unidimensional que ilustre la intensidad de dispersión en función de una variable conocida como transferencia de momento o vector de dispersión (s). Este vector describe la interacción entre la radiación y la muestra, pues registra el cambio en el momento entre la radiación incidida sobre la muestra y la radiación dispersada por ésta. Para obtener información sobre la molécula bajo estudio, es necesario medir también la dispersión del resto de la solución y restarla del total. Entonces, la dispersión resultante únicamente de la molécula de interés puede describirse como:

$$I(s) \sim F(s) * S(s) \quad (3.1)$$

donde $F(s)$ es el factor de forma, que corresponde a la dispersión de la partícula, y $S(s)$ es el factor de estructura, que corresponde a la interferencia entre varias partículas. Este último factor es indicativo del tipo de interacciones en la solución, siendo que un valor mayor indicará interacciones atractivas (y potencial agregación no deseada en la solución), uno menor, interacciones repulsivas y, finalmente, un valor unitario representará la ausencia de interacciones o una muestra muy diluida. Para fines prácticos, se busca eliminar la influencia de este factor para dejar únicamente $F(s)$ y, para ello, se realiza una serie de diferentes concentraciones de la muestra. De acuerdo con la ecuación

$$d = 2\pi/s \quad (3.2)$$

un valor menor de s implica una distancia mayor en el espacio real y por lo tanto puede proveer información sobre el estado de oligomerización de la proteína; por el contrario, valores grandes de s permiten conocer detalles estructurales [75]. Cuando la muestra es incidida, ésta dispersa la radiación con una intensidad en función del vector de dispersión antes mencionado, de manera que al calcular el logaritmo natural de esta intensidad y graficarla en función del cuadrado del vector de dispersión, se obtiene un gráfico que ilustra el primer resultado de SAXS. A partir de éste, puede extraerse una región lineal cuya pendiente es directamente proporcional al radio de giro, R_g , uno de los principales parámetros que indican el tamaño aproximado de la proteína en solución [76].

3.2 Materiales y métodos

La preparación de la muestra es crucial para la obtención de datos de SAXS de calidad. Para ello, se purificaron apo-Tf y holo-Tf comerciales mediante la misma metodología descrita en el capítulo 2, empleando una solución amortiguadora 15 mM HEPES con 20 mM NaHCO_3 y 50 mM NaCl, en pH 8.0, 7.0 y 5.5. Para asegurar que la proteína se encontrara estable y monodispersa, se llevó a cabo una serie de diluciones de la muestra; esto permite disminuir la influencia del factor de estructura, correspondiente a la interferencia entre las partículas en solución, en la medición final de la dispersión de la proteína [75]. Entonces, se partió de una concentración de $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ para ambas proteínas y se diluyeron hasta 2.5 y $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, siendo esta última la concentración utilizada para los análisis ya que no se observó dependencia de concentración durante la dispersión.

La colecta de datos se llevó a cabo en la *beamline* BM29 del Sincrotrón Europeo (ESRF, Grenoble, Francia), utilizando un rayo con longitud de onda de 1 Å, un detector Pilatus3 2M en vacío a distancia de 2.867 m de la muestra para obtener un vector de dispersión en el intervalo de 0.025 a 6 nm⁻¹. Para monitorear la dosis de radiación depositada en la muestra, que podría ocasionar daño por radiación [77], se utilizó un muestreador robótico en modo de flujo continuo, colectando 10 imágenes con duración de 1 s cada una para cada muestra de 40 µl de volumen. Se utilizaron únicamente muestras sin indicios de daño por radiación y se promediaron. Se midió la dispersión de la solución amortiguadora antes y después de cada muestra y se restó de los datos medidos, mismos que fueron integrados y procesados con los programas PRIMUS [78] y Scatter [79]. Las curvas de dispersión teóricas fueron calculadas y comparadas con las experimentales utilizando CRY SOL [80]. Para el modelado se emplearon DAMMIN [81], SREFLEX [82] y MultiFoXS [83]. Finalmente, la producción del modelo final se realizó con Chimera [48].

3.3 Resultados y discusión

El análisis de la transferrina mediante SAXS permitió observar su comportamiento bajo tres diferentes condiciones de pH de relevancia fisiológica, en su condición libre y saturada con hierro. En la Tabla 4 se muestran los parámetros estructurales básicos obtenidos a partir de los resultados de SAXS, relacionados con el tamaño y forma de la transferrina. Por ejemplo, el tamaño máximo (D_{\max}) es obtenido a partir de la función de distribución de distancia entre pares $[P(r)]$, correspondiente a las distancias entre todos los electrones en la proteína, que proveen la distribución más homogénea y positiva; una diferencia en D_{\max} es indicativa de cambios conformacionales.

Como puede observarse en la Figura 3.2A, el perfil de dispersión de la apo-transferrina (líneas en tonos de azul) es diferente al perfil de dispersión de la holo-transferrina (líneas en tonos de rojo), particularmente en la región lineal de Guinier, de donde se calculan los valores de R_g mostrados en la Tabla 4. En primera instancia, este perfil provee una estimación de la masa molecular de la proteína y, a su vez, de su estado oligomérico. Particularmente en los perfiles observados para apo- y holo-Tf, además se observan los primeros indicios sobre la influencia que tiene la presencia del hierro en la conformación de la proteína.

Tabla 4. Datos experimentales y calculados de SAXS.

Parámetros de la colecta de datos						
Beamline	BM29, ESRF					
Detector	Pilatus3 2M en vacío					
Tamaño del rayo (mm)	0.2 x 0.2					
Energía (keV)	12.5					
Distancia entre la muestra y el detector (mm)	2.867					
Rango de s (\AA^{-1})	0.0025 - 0.6					
Tiempo de exposición (s)	1					
Temperatura (K)	293					
Modo de colecta	Por lotes, con cambiador de muestras automatizado					
	apo-Tf			holo-Tf		
Parámetros estructurales	pH 8.0	pH 7.0	pH 5.5	pH 8.0	pH 7.0	pH 5.5
Intervalo de concentración ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	5	5	5	5	5	5
Intervalo de s para inversión de Fourier (\AA^{-1})	0.014 - 0.258	0.015 - 0.258	0.017 - 0.258	0.018 - 0.247	0.021 - 0.249	0.015 - 0.248
R_g [de $P(r)$] (\AA)	31.2 \pm 0.02	31.2 \pm 0.02	31.2 \pm 0.02	33.0 \pm 0.05	33.2 \pm 0.05	34.2 \pm 0.06
R_g [de la aproximación de Guinier] (\AA)	31.1 \pm 0.00	31.1 \pm 0.00	31.1 \pm 0.01	32.4 \pm 0.01	33.4 \pm 0.01	33.7 \pm 0.01
Límites de sR_g [de la aproximación de Guinier]	0.44 - 1.29	0.44 - 1.28	0.21 - 1.30	0.56 - 1.28	0.66 - 1.30	0.48 - 1.30
D_{\max} (\AA)	94.2	96.4	98.4	131.0	135	146
Coefficiente de Porod	3.7	3.7	3.7	3.5	3.0	3.0
Estimado de volumen de Porod (nm^3)	104	106	106	106	103	105
Volumen excluido del modelo (nm^3)	119					
Masa molecular (kDa) de:						
Volumen de Porod	66.0					
Volumen excluido (x 0.5)	60.0					
De la secuencia	77.0					
Modelado						
Ambigüedad	2.1 (podría ser ambiguo)			2.4 (podría ser ambiguo)		
Software de SASBDB empleado						
Reducción de datos principal	Herramientas de software del ESRF en línea					
Procesamiento de datos	ScÅtter IV / ATSAS 3.0.4					
Computación de intensidades del modelo	CRY SOL (ATSAS)					
Modelado	GASBOR (ATSAS), MultiFoxy					

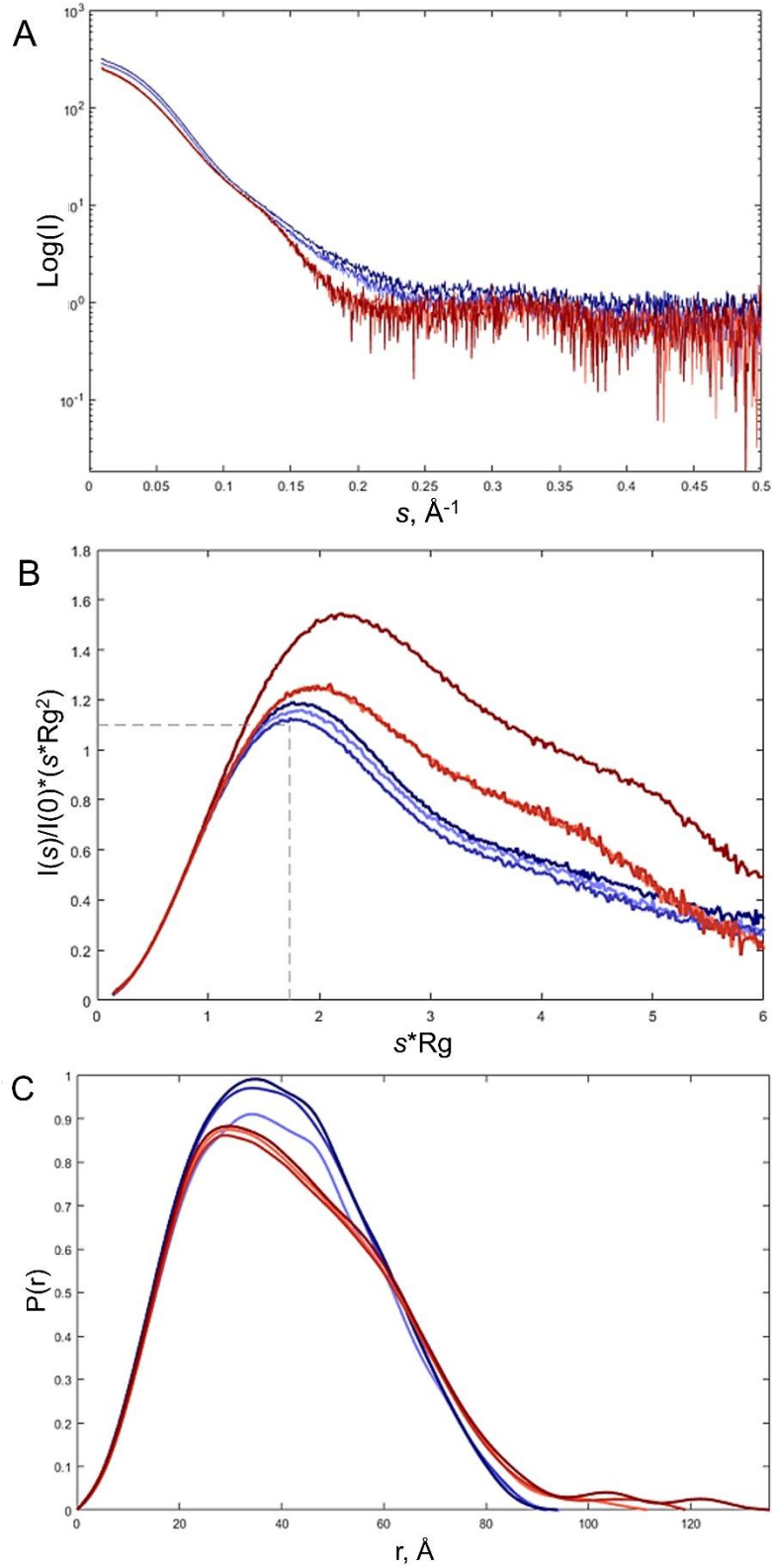


Figura 3.2. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de la apo- y holo-transferrina. (A) Gráfico de \log_{10} de la intensidad de SAXS en función del vector de dispersión, s . (B) Gráfico de Kratky adimensional. El valor máximo, mostrado en la intersección de las líneas punteadas, corresponde con el número de Guinier-Kratky (1.732, 1.1) característico para la principal posición del máximo para

partículas globulares. (C) Función de distribución de pares de distancia, $P(r)$. La dimensión máxima, D_{\max} , es el valor máximo positivo que permite una función de distribución continua. Las curvas se muestran sobrepuestas para contrastar las diferencias entre la transferrina libre (apo-Tf, ilustrada en tonos de azul) y la transferrina cargada con hierro (holo-Tf, ilustrada en tonos de rojo). El gradiente de colores, de más claro a más oscuro, representa el cambio de pH de mayor a menor (8.0, 7.0 y 5.5, respectivamente). Gráficos obtenidos de la publicación de este trabajo en [55].

Así mismo, el gráfico de Kratky adimensional (Figura 3.2B) muestra otra diferencia importante entre la apo- y la holo-transferrina bajo las tres diferentes condiciones de pH, que radica en la forma de la partícula y en la dependencia al pH. Como se describe en el pie de la Figura 3.2, la referencia para partículas globulares es el punto de Guinier-Kratky, y el hecho de que la holo-transferrina se aleje de este valor conforme aumenta la acidez del medio, indica que está ocurriendo un cambio conformacional importante bajo dichas condiciones; esto mismo también es evidenciado por la diferencia en los valores de R_g y D_{\max} (Tabla 4). En el estudio de proteínas con alto grado de flexibilidad y que se encuentran conformadas por múltiples dominios unidos mediante péptidos no estructurados, como es el caso de la transferrina, si se complementan los datos de SAXS con información obtenida mediante otras técnicas de resolución estructural, como aquellos descritos en el capítulo 2, es posible obtener modelos superficiales de la proteína [75], [84]. Entonces, para observar estructuralmente este fenómeno, se obtuvieron modelos *ab initio* mediante DAMMIN [81] de las condiciones en las que hubo mayor contraste; es decir, se modelaron los datos de la apo-transferrina a pH 8.0 (Figura 3.3A) y de la holo-transferrina a pH 5.5 (Figura 3.3B) ajustando la cadena A del modelo estructural de apo-Tf reportado con PDB ID 2HAV (reportada a pH 7.0), observándose la elongación de la holo-Tf respecto a la apo-Tf en dichas condiciones. Posteriormente, mediante el programa SREFLEX [82] se realizó una estimación de la flexibilidad del modelo de holo-Tf a pH 5.5, ajustando y afinando el modelo de 2HAV con los datos experimentales de SAXS para disminuir el valor de χ^2 desde 33.5 hasta 1.74 (Figura 3.3C).

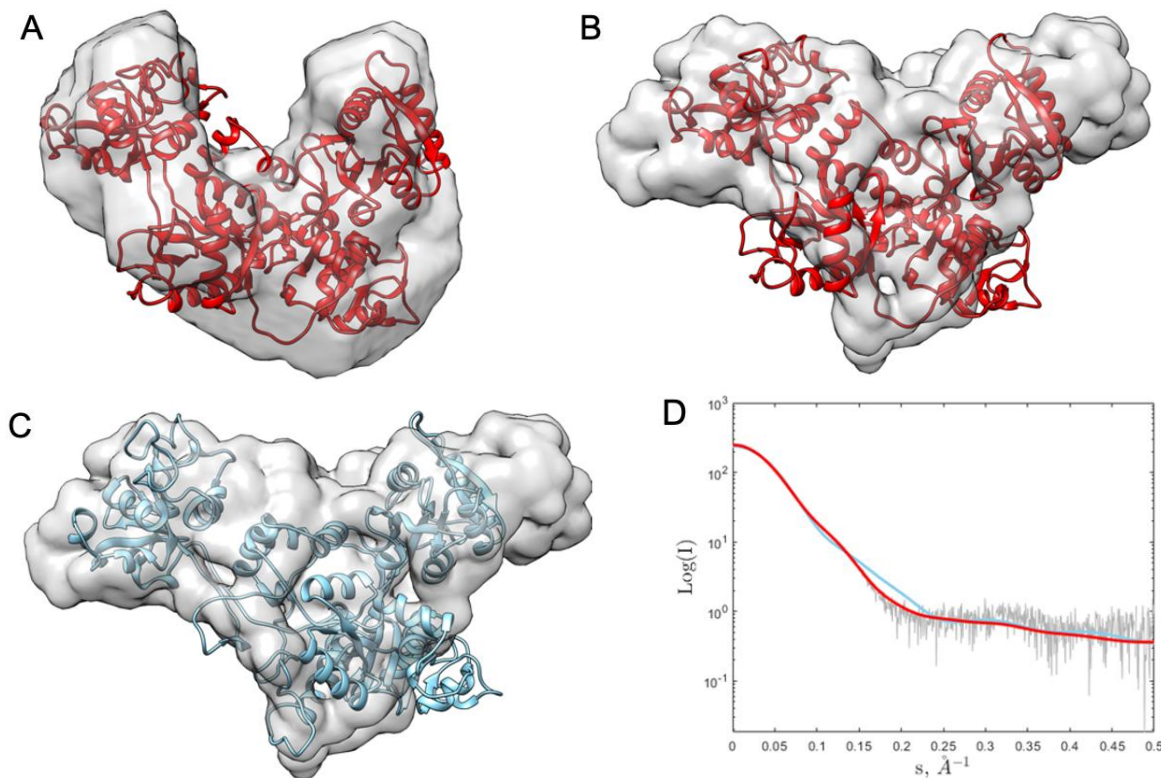


Figura 3.3. Modelos *ab initio* resultantes del ajuste de la cadena A del modelo 2HAV con los datos experimentales de SAXS mediante DAMMIN [81]. (A) apo-Tf a pH 8.0. (B) holo-Tf a pH 5.5. (C) Modelo de 2HAV afinado con SREFLEX [82] ajustado al modelo *ab initio* para holo-Tf a pH 5.5. (D) Ajuste del patrón de dispersión de SAXS para el modelo 2HAV (cadena A) (curva azul claro) y el resultado tras su afinamiento (curva roja) comparado contra la dispersión experimental (gris). Resultados publicados en [55]

Para evidenciar de manera más clara la influencia del pH en variabilidad conformacional de la transferrina, se utilizó el mismo modelo, 2HAV (Figura 3.4), como referencia para muestrear una serie de conformaciones al azar a través del servidor MultiFoXS [83], una herramienta de modelado pseudo atómico que consiste en utilizar un modelo reportado de la proteína para hacer un ajuste de cuerpo rígido a baja resolución de los datos experimentales de SAXS, incluyendo las regiones flexibles entre los dominios de la proteína, identificadas con el servidor HingeProt [85]. Con ello, tras un muestreo de más de 10,000 conformaciones, se obtuvo una colección de modelos multi-estado con diferentes calificaciones de acuerdo con su ajuste al perfil experimental, mediante la comparación del valor de χ^2 (Tabla 5). El número de estado corresponde al número de posibles conformaciones, siendo que el estado 0 es el estado inicial; del estado 1 al 2 se logra un mejor ajuste para dos conformaciones y, finalmente, del estado 2 al 3, donde se obtiene una mayor flexibilidad del modelo. Entonces, los resultados muestran la presencia simultánea de diferentes conformaciones en distinta

proporción en la solución. La Figura 3.5 muestra las variaciones conformacionales más representativas, correspondientes a holo-Tf a pH 5.5.

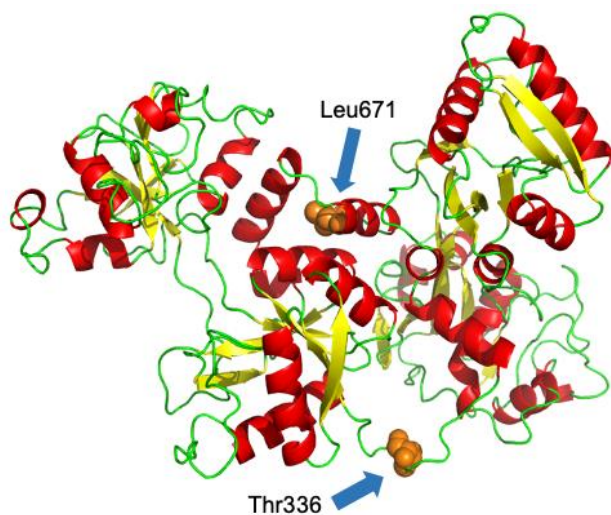


Figura 3.4. Modelo estructural de apo-Tf (PDB ID: 2HAV) utilizado como referencia. Se señalan los residuos Thr336 y Leu671 como puntos de bisagra de acuerdo con el servidor HingeProt [85].

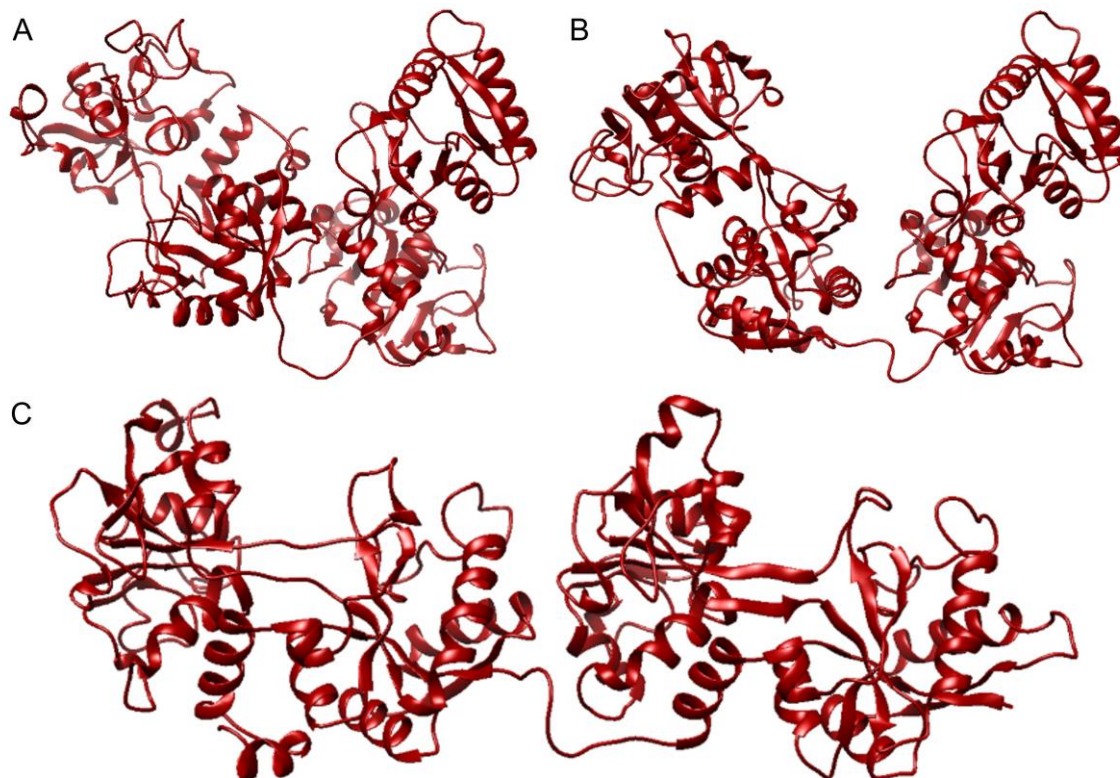


Figura 3.5. Modelado pseudo-atómico basado en datos de SAXS realizado con MultiFoXS para holo-Tf a pH 5.5. Se obtuvieron modelos multi-estado a diferentes valores de pH después de muestrear más de 10,000 conformaciones empleando como modelo inicial la estructura 2HAV (cadena A) del PDB. Para el estado 3, se observaron tres conformaciones en las siguientes proporciones: cerrada, 13% (A), parcialmente abierta, 57% (B), abierta, 30% (C).

Tabla 5. Conformaciones de apo- y holo-transferrina en tres diferentes condiciones de pH, observadas con el modelado realizado a partir de SAXS con el servidor MultiFoXS. El estado 0 corresponde al modelo inicial tomado de una estructura de apo-Tf reportada en el PDB (código 2HAV).

apo-Tf					
pH 8.0					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	6.5
1	1	1	30.4	103.4	3.6
2	1	0.9	29.9	103.2	1.6
	2	0.1	36.7	127.1	
pH 7.0					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	5.8
1	1	1	30.2	103.2	3.2
2	1	0.88	29.9	103.4	1.2
	2	0.12	33.8	119.6	
pH 5.5					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	8.5
1	1	1	30.1	103.1	6.3
2	1	0.91	30.1	103.1	1.4
	2	0.09	33.8	119.9	
holo-Tf					
pH 8.0					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	28.6
1	1	1	31.7	106.4	7.3
3	1	0.5	31.6	103.0	4.1
	2	0.26	29.8	102.5	
pH 7.0					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	45.6
1	1	1	31.9	109.6	13.2
3	1	0.44	31.9	104.0	6.43
	2	0.35	30.4	103.9	
	3	0.21	37.5	132.9	
pH 5.5					
Estado	Conformación	Fracción	R _g	D _{max}	χ^2
0	0	1	29.5	102.4	33.6
1	1	1	31.9	109.9	4.59
3	1	0.57	31.4	102.4	2.4
	2	0.13	29.5	101.9	
	3	0.30	37.4	132.6	

En el caso de apo-Tf se observó una conformación globular cerrada, caracterizada por un valor de radio de giro (R_g) de 29.9 Å, de manera predominante (~90%) y una conformación abierta en muy baja proporción (~10%), sin cambios significativos en ambos casos en las tres diferentes condiciones de pH. Los valores de χ^2 muestran la discrepancia entre los datos de SAXS y el modelo inicial, siendo que un valor menor de χ^2 indica mayor precisión; por lo tanto, en el caso de apo-Tf, este valor es menor en el estado 0, que corresponde al modelo de referencia, un modelo de transferrina libre de hierro. Por otro lado, en el caso de holo-Tf, estos valores son mayores para el estado 0 ya que la transferrina se encuentra cargada con hierro y no coinciden exactamente con el modelo de apo-Tf. Sin embargo, al explorar diferentes estados en los que se encuentra más de una conformación, el valor de χ^2 mejora significativamente, obteniendo una aproximación más precisa. En el estado 3 de holo-Tf se encuentra una conformación parcialmente abierta, además de las conformaciones cerrada y abierta. Esta conformación parcialmente abierta se había reportado en estudios previos bajo condiciones diferentes; mediante análisis cristalográfico, descrita como una conformación intermedia durante el mecanismo de liberación de metales [6], y mediante SAXS y dinámica molecular como una conformación en la cual se favorece la interacción con proteínas de microorganismos patogénicos [86]. No obstante, una observación particular en los resultados obtenidos en este trabajo es que esta conformación intermedia se encontró en mayor proporción en las tres diferentes condiciones de pH, siendo máxima en la condición de mayor acidez; esta última condición es de gran relevancia porque representa el pH de los endosomas donde la transferrina libera al hierro. A partir de estos resultados, considerando que la transferrina tiene dos sitios de unión, pero que no siempre se encuentran saturados ambos [18], la conformación parcialmente abierta observada podría corresponder a transferrina monoférrica, en la cual solo uno de los sitios de unión a metales se encuentra ocupado. Esto último ofrece la posibilidad de introducir moléculas de interés biomédico al sitio disponible en la transferrina, pues se ha observado que posee cierta flexibilidad para unir moléculas más grandes [15]. En resumen, el análisis realizado mediante SAXS en este capítulo aporta detalles cruciales sobre la capacidad intrínseca de la transferrina para existir en diferentes estados conformacionales a lo largo de su mecanismo de liberación de hierro, simulados mediante la recolección de datos en diferentes valores de pH representativos del mismo. Más aún, los resultados de este análisis explican por qué la transferrina es tan flexible y difícil de mejorar su calidad cristalográfica: la naturaleza de esta proteína es dinámica y gracias a ello ejerce su función.

CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD E INTERACCIÓN QUÍMICA EN SOLUCIÓN

4.1 Introducción

Las proteínas son macromoléculas dinámicas que presentan diferencias en su comportamiento dependiendo de las condiciones del medio. En el mejor de los casos, una proteína puede adaptarse al medio sin desnaturalizarse; sin embargo, los factores que impactan en la integridad molecular y funcional son diversos y, en ocasiones, críticos. Cuando se propone estudiar experimentalmente el comportamiento de una proteína, se debe tener presente que ésta no se encuentra aislada, sino que está en una constante interacción con otras moléculas, lo cual a su vez puede influir en la interacción de dicha proteína con otras moléculas como otras proteínas, ligandos, o moléculas de la misma proteína. Dichas interacciones pueden medirse experimentalmente de muchas maneras, existiendo estrategias basadas en propiedades intrínsecas de las proteínas. Estas propiedades pueden ser espectroscópicas, como la absorción de la radiación UV-visible, el dicroísmo circular o la fluorescencia; energéticas, químicas y estructurales [87]. Cabe recordar que cuando un método para detectar interacciones está enfocado a un sitio específico con características particulares, la posibilidad de detectar una unión inespecífica se ve limitada y, por lo tanto, es pertinente realizar pruebas con diferentes métodos cuyo fundamento no depende de una misma propiedad.

En este capítulo se presenta la caracterización de la transferrina en solución explorando una serie de condiciones del medio para determinar aquellas que permitieran estudios *a posteriori* de su potencial interacción con ligandos, y se comparan las observaciones realizadas mediante técnicas de caracterización estructural, como la cristalografía de rayos X (capítulo 2) y la dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS, capítulo 3). En el capítulo siguiente se presentarán los avances realizados en este objetivo como perspectivas hacia futuras investigaciones.

4.2 Espectroscopía

4.2.1 Introducción

La espectrometría UV-Visible es una de las principales técnicas espectroscópicas utilizadas para caracterizar proteínas; generalmente, se utiliza para determinar su concentración, aunque en ocasiones puede servir para elucidar alteraciones estructurales asociadas a la interacción con otras moléculas [7], [88], [89]. En esta técnica, la muestra es irradiada con luz en la región UV (200-400 nm) y visible (400-

800) del espectro electromagnético, dado que en la región comprendida entre 250-300 nm hay absorción de la luz por parte de aminoácidos aromáticos, mientras que en valores menores que 250 nm, absorbe la cadena formada por los enlaces peptídicos [87]. La cantidad de luz absorbida corresponde a una excitación electrónica en la muestra y el resto de la luz es transmitida (es decir, atraviesa la muestra). Dependiendo de la longitud de onda a la cual esta radiación es absorbida, puede determinarse su naturaleza gracias a la existencia de longitudes de onda características. En el caso de las proteínas, los residuos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y, principalmente, el triptófano (Trp) presentan un máximo de absorción en 280 nm [90].

Por su parte, el dicroísmo circular (CD) es una técnica que provee información sobre la asimetría de las moléculas, pues mide la diferencia en absorbancia de la luz polarizada circularmente en dos direcciones (de ahí el nombre de dicroísmo), hacia la derecha y hacia la izquierda, en función de la longitud de onda. Cuando en la proteína hay residuos con cadenas laterales diferentes al hidrógeno, el carbono al que están unidos es un centro quiral y esta propiedad entonces hace que se emita una señal de CD. Con esta técnica se puede estudiar el plegamiento de las proteínas porque es posible identificar elementos de estructura que presentan señales en valores de longitud de onda específicos. Esto mismo también permite monitorear, de manera indirecta, cambios conformacionales causados por la interacción de la proteína con otras moléculas en solución [91].

La espectroscopía de fluorescencia (FS) es otra técnica importante en la caracterización de proteínas y sus interacciones. El principio de la FS se basa en la emisión de radiación por una molécula cuando ésta absorbe energía a una longitud de onda de excitación y por ende experimenta una transición de momento dipolar. La energía de excitación promueve a los fotones a un estado de singulete excitado, donde después decaen al nivel vibracional más bajo de ese estado. Cuando la energía se relaja al estado basal se emiten fotones, lo cual es medido como la energía de emisión de fluorescencia. Las proteínas, a diferencia de otras biomacromoléculas, tienen la característica de emitir fluorescencia intrínseca; esto es debido principalmente a la presencia de residuos aromáticos, de manera similar a la absorción UV-Vis, aunque en este caso la longitud máxima de emisión de fluorescencia para el Trp es alrededor de 350 nm [92].

La transferrina es una proteína que por sí sola emite fluorescencia gracias a su contenido de residuos de triptófano, principalmente, y ésta es muy sensible a los cambios en su microambiente; por lo tanto, un cambio conformacional en la proteína podría causar una modificación en la señal emitida. Por esto mismo, la espectroscopía de fluorescencia es una técnica útil para estudiar la interacción de

sustancias con las proteínas, evidenciada generalmente por un desplazamiento y/o apagamiento de la señal. En ocasiones, la interacción puede medirse únicamente con el cambio de señal de la proteína, cuando el ligando no presenta fluorescencia. En otros casos, tanto la proteína como el ligando, o incluso el producto de la unión de ambos, emiten señal de fluorescencia y es necesario realizar una corrección de los datos para tratarlos de manera cuantitativa. En cualquier caso, cuando existe una interacción, ocurre una modificación en la intensidad de la señal porque ésta es una suma de las contribuciones de todos los componentes en la solución. En ocasiones, esta interacción puede caracterizarse mediante el apagamiento (*quenching*) de la señal de fluorescencia, donde el ligando, al unirse a la proteína, provoca que la señal que ésta emitía, disminuya o se apague porque las regiones fluorescentes quedan cubiertas por el ligando e impedidas de contribuir a la señal. Ahora bien, esto no debe confundirse con otro fenómeno conocido como efecto del filtro interno (*inner-filter effect*), en el cual, de manera similar, disminuye la señal, pero debido a que el ligando está absorbiendo radiación en la misma longitud de onda en la cual la proteína emite señal de fluorescencia [87].

4.2.2 Materiales y métodos

Para obtener los espectros de absorción UV-Visible, se prepararon las muestras de apo- y holo-Tf a $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en solución amortiguadora 15 mM HEPES, 20 mM NaHCO_3 y 50 mM NaCl a pH 7.4; éstas fueron filtradas y colocadas en una celda de cuarzo para medirse en un espectrofotómetro Cary® a 25 °C.

Para el estudio de CD en el UV lejano, las muestras de apo- y holo-Tf se prepararon a $0.2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en solución amortiguadora 10 mM fosfatos con 20 mM NaHCO_3 a pH 7.4. Se realizó el experimento con un espectrómetro Jasco®, colocando la muestra en una celda de cuarzo de 0.1 cm a 20 °C y midiendo en modo continuo con velocidad de escaneo de $20 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ en un intervalo de 190 a 250 nm.

Para el estudio de FS, las muestras de apo- y holo-Tf se prepararon a 1 μM en solución amortiguadora 15 mM HEPES, 20 mM NaHCO_3 y 50 mM NaCl a pH 7.4 y también a pH 5.5, 7.0 y 8.0. Se realizó el experimento en un espectrofotómetro Cary Eclipse® trabajando con una longitud de onda de excitación de 280 nm, con aberturas de excitación y emisión de 10 nm y se midió la emisión entre 300 y 400 nm, a un voltaje del detector de 600 V y a 25°C.

4.3 Ensayo de desplazamiento térmico (*Thermal shift assay, TSA*)

4.3.1 Introducción

Esta técnica se describe en un apartado diferente a las técnicas espectroscópicas anteriores ya que ésta involucra el estudio a lo largo de un intervalo de temperatura. El ensayo de desplazamiento térmico (TSA, por sus siglas en inglés), también conocido como fluorimetría de barrido diferencial, es una técnica de caracterización biofísica que permite medir la estabilidad de una proteína y medir el punto medio de transición térmica o temperatura media de desnaturalización (*melting temperature*, T_m) cuando la proteína es sometida a un aumento de temperatura. Para ello, se mide la fluorescencia emitida por un colorante fluorescente de bajo rendimiento cuántico, que al interactuar con las regiones hidrofóbicas de la proteína bajo estudio emite una señal fluorescente; conforme se aumenta gradualmente la temperatura y la proteína comienza a desplegarse, dichas regiones quedan expuestas y es posible detectar la interacción con el colorante, misma que emite la fluorescencia. El valor de T_m, entonces, corresponde a la temperatura a la cual la mitad de la población de proteína en la muestra ha quedado desplegada y por ende ha expuesto las regiones hidrofóbicas que interactúan con el colorante fluorescente [93]. Mediante esta técnica, es posible evaluar la influencia de la composición del medio en la estabilidad de la proteína y, así mismo, identificar interacciones con otras sustancias de manera indirecta [94], [95]. Una de las ventajas que presenta esta técnica es la rapidez y facilidad para llevar a cabo experimentos ya que utiliza un equipo termociclador como aquel empleado para realizar estudios cuantitativos de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR); sin embargo, generalmente se utilizan los resultados de TSA de manera cualitativa [96].

4.3.2 Materiales y métodos

Para la caracterización de la holo-transferrina en solución, se probaron 25 condiciones variando pH, presencia de anión bicarbonato, de anión cloruro y de anión citrato, como se describe en la Tabla 6 a continuación, para analizar a su vez la influencia del pH y de los componentes de la solución en su estabilidad. Las muestras de dicha proteína fueron preparadas a una concentración inicial de 1 mg·ml⁻¹ en un volumen de 50 µl y se mezclaron con tinción fluorescente Sypro Orange® inmediatamente antes de realizar las mediciones.

Tabla 6. Esquema de preparación de soluciones amortiguadoras en 15 mM cacodilato de sodio para evaluar la estabilidad de la transferrina en diferentes valores de pH y en presencia de aniones bioquímicamente relevantes.

Condición	pH	20 mM NaHCO ₃	50 mM NaCl	40 mM Citrato de sodio
1	7.4	✓	✓	
2	7.0	✓	✓	

3	6.5	✓	✓	
4	6.0	✓	✓	
5	5.5	✓	✓	
6	7.4	✓	✓	✓
7	7.0	✓	✓	✓
8	6.5	✓	✓	✓
9	6.0	✓	✓	✓
10	5.5	✓	✓	✓
11	7.4	✓		✓
12	7.0	✓		✓
13	6.5	✓		✓
14	6.0	✓		✓
15	5.5	✓		✓
16	7.4		✓	✓
17	7.0		✓	✓
18	6.5		✓	✓
19	6.0		✓	✓
20	5.5		✓	✓
21	7.4			✓
22	7.0			✓
23	6.5			✓
24	6.0			✓
25	5.5			✓

Las muestras fueron analizadas en un equipo termociclador QuantStudio®, usualmente usado para estudios de RT-qPCR y los datos resultantes fueron analizados y exportados desde el software QuantStudio Design & Analysis Software® v1.5.2. se analizaron en un intervalo de temperaturas desde 25 °C hasta 99 °C, midiendo a una velocidad de barrido de 3 °C·min⁻¹.

4.4 Resultados y discusión

La transferrina contiene 8 residuos de Trp en su secuencia, lo cual le confiere un máximo de absorción en 280 nm, como puede verse en la Figura 4.1, independientemente de estar libre (apo-Tf) o unida a hierro (holo-Tf). Sin embargo, en el caso de la holo-Tf se observa mayor intensidad en la absorbancia debido a que el sitio de unión a metales involucra compuestos aromáticos (Figura 1.2) que quedan más expuestos al coordinar al hierro, contribuyendo más a la señal [97]. Está reportado que la holo-Tf posee además un máximo de absorción en 465 nm [9] por la presencia del hierro, lo cual se alcanza a ver en el espectro de la Figura

4.1; sin embargo, esta señal es mucho menos fuerte por la proporción en la que se encuentra el metal respecto a los Trp que le confieren la señal característica a la transferrina.

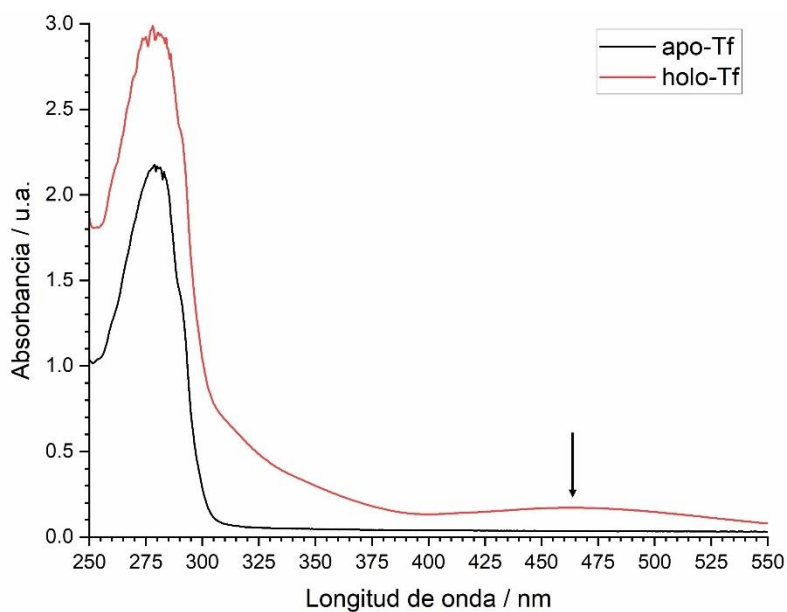


Figura 4.1. Espectro de absorción UV-Visible de la apo-Tf (línea negra) y la holo-Tf (línea roja). La flecha señala la longitud de onda de 465 nm correspondiente a la presencia de hierro en la holo-Tf.

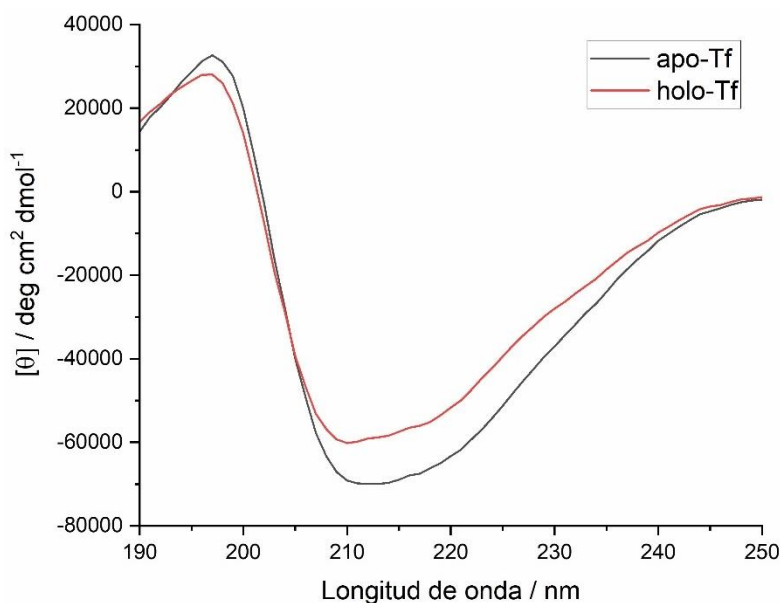


Figura 4.2. Espectro de elipticidad molar media de residuos de apo-Tf (línea negra) y holo-Tf (línea roja).

En cuanto a los resultados de dicroísmo circular, en la Figura 4.2 se observa, tanto en apo-Tf como en holo-Tf, la forma característica de la presencia de hélices α , con un máximo alrededor de 195 nm y dos mínimos, uno más claro alrededor de 210 nm y otro menos pronunciado alrededor de 222 nm. La transferrina presenta además un alto contenido de hebras β antiparalelas en su estructura [40], cuyo espectro de CD en el UV lejano corresponde a un máximo por debajo de 200 nm, así como un mínimo alrededor de 215 nm [98]. De manera similar a lo observado en los espectros de UV, la diferencia conformacional entre la apo-Tf y la holo-Tf produce la diferencia vista en la intensidad de la señal de CD que permitió identificar los elementos de estructura secundaria descritos.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas con alto contenido de Trp en su secuencia son muy sensibles a cambios en su microambiente, en relación con su fluorescencia. Uno de los factores que afectan la emisión del Trp es la polaridad de la solución, debido a la unión del hidrógeno al grupo imino [92]. La presencia del hierro en la transferrina modifica la vecindad química del Trp, que podría estar asociado a un cambio conformacional y, por lo tanto, explicar la diferencia entre el espectro de holo-Tf respecto al de apo-Tf. Este factor no solo afecta la absorción en el espectro UV-Vis y en su quiralidad caracterizada mediante CD, sino que también impacta la señal de fluorescencia de la proteína, como puede verse en la Figura 4.3, donde la apo-Tf y la holo-Tf fueron medidas en las tres diferentes condiciones de pH estudiadas a lo largo de este trabajo.

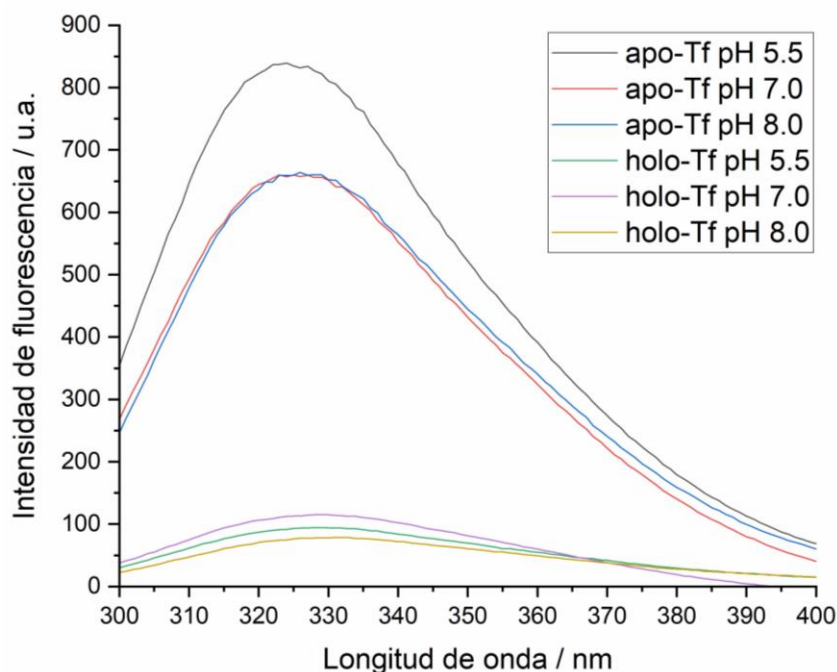
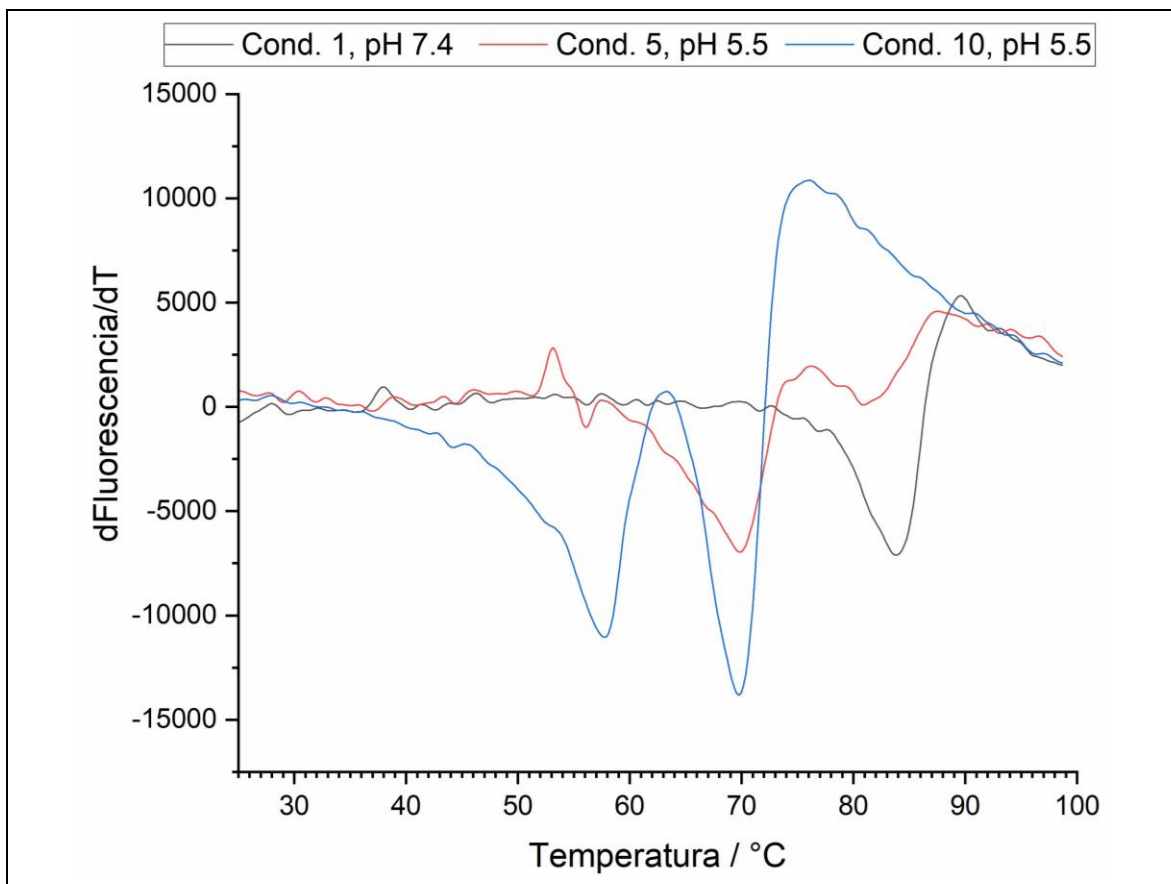


Figura 4.3. Intensidad de fluorescencia para la apo-Tf y la holo-Tf en los valores de pH de 5.5, 7.0 y 8.0. Se observa una diferencia en los máximos entre la apo- y la holo-Tf, así como diferencia entre

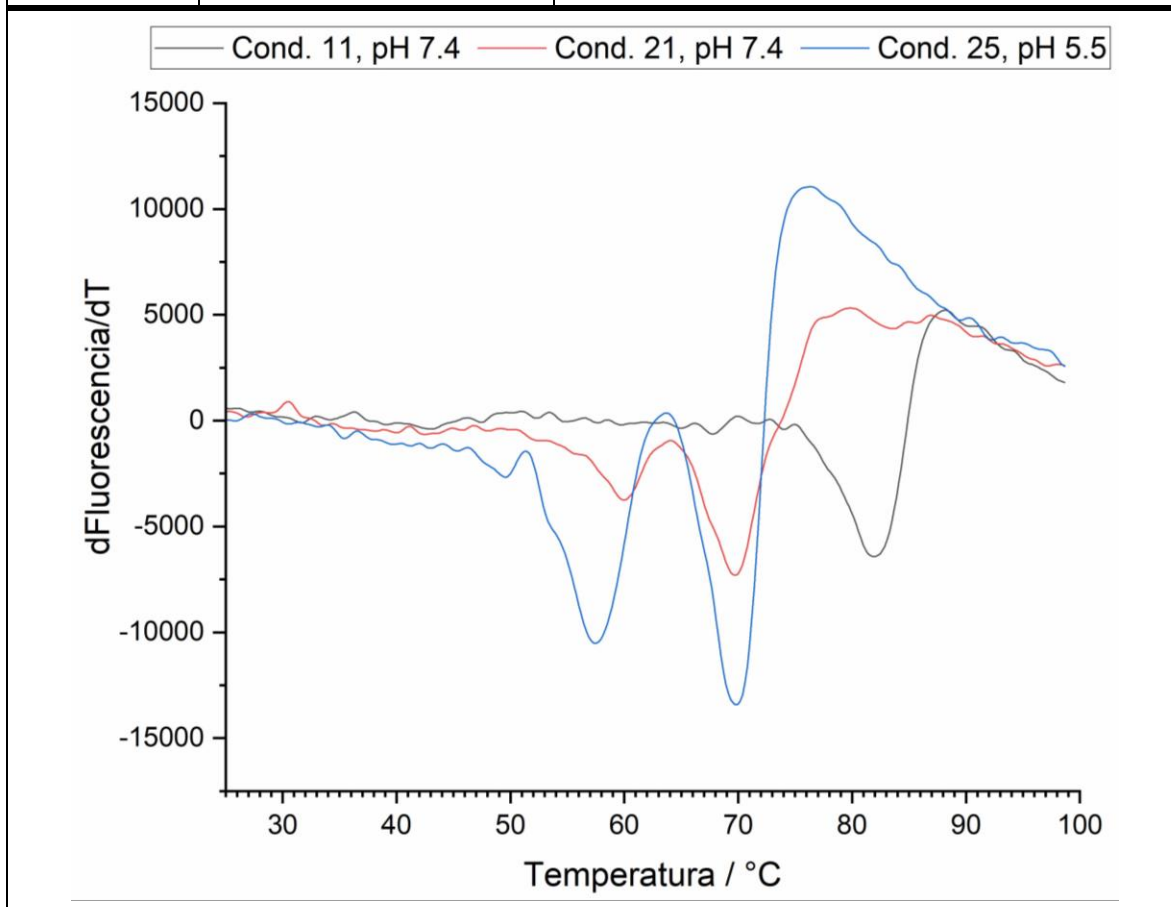
los máximos de los espectros en los tres valores de pH, siendo mayor el máximo a pH 5.5 para la apo-Tf y a pH 7.0 para la holo-Tf.

La estrategia experimental que aportó los resultados más interesantes fue la de TSA, pues permitió observar el comportamiento de la holo-transferrina en solución a lo largo de cada etapa de la desnaturalización térmica en términos de la fluorescencia que emite el colorante que interactúa con las regiones hidrofóbicas que van quedando expuestas. Se probaron 25 condiciones en total, divididas en conjuntos de 5 combinaciones en las cuales se evaluaron 5 valores de pH cada una. En la Tabla 7 se comparan las condiciones que mostraron los efectos más representativos sobre el comportamiento de la transferrina. Estos resultados son cualitativos, por lo cual se referirá al valor de T_m , correspondiente al mínimo de señal, como T_m aparente. Cabe mencionar que—aunque no se cuenta con el gráfico correspondiente—se realizó el regreso hacia la temperatura inicial para ver si el desplegamiento era reversible, pero no fue el caso.

Tabla 7. Comparación entre las principales condiciones en las que se observaron efectos en el comportamiento de la transferrina en TSA. La señal de TSA se presenta como la derivada de la fluorescencia normalizada en función del aumento de temperatura. Se resaltan en negritas los parámetros clave que contribuyeron a los efectos en la transferrina dentro de las condiciones descritas.



Condición	Composición	Efecto observado
1	15 mM cacodilato-HCl 20 mM NaHCO ₃ 50 mM NaCl pH 7.4	Condiciones en las que la holo-transferrina se mantiene en su máximo de estabilidad con una T _m alrededor de 83 °C.
5	15 mM cacodilato-HCl 20 mM NaHCO ₃ 50 mM NaCl pH 5.5	La disminución del pH desestabiliza a la transferrina, comenzando a observarse un cambio en su comportamiento en solución, desplazando y disminuyendo la intensidad de la señal de la T _m aparente, además de observarse la aparición de otro mínimo a menor temperatura.
10	15 mM cacodilato-HCl 20 mM NaHCO ₃ 50 mM NaCl 40 mM citrato pH 5.5	La presencia del citrato, en conjunto con el descenso de pH, provocan el cambio de holo-Tf hacia apo-Tf, evidenciado por el desplazamiento de la T _m aparente en 70 °C y por la aparición de otro valor de T _m aparente en 58 °C.



11	15 mM cacodilato-HCl 20 mM NaHCO₃ 40 mM citrato pH 7.4	A pesar de haber citrato en la solución, la presencia del bicarbonato, en conjunto con el valor de pH, logran retener al hierro unido, observándose el perfil característico de la holo-Tf como en la condición 1.
----	---	--

21	15 mM cacodilato-HCl 40 mM citrato pH 7.4	Se observa la transición hacia apo-Tf al aparecer dos mínimos correspondientes a dos valores de T _m aparente, de manera similar a la condición 5; sin embargo, la transición es más clara, confirmando la importancia del bicarbonato para retener al hierro unido a la transferrina.
25	15 mM cacodilato-HCl 40 mM citrato pH 5.5	La disminución de pH hace definitiva la liberación del hierro, existiendo entonces como apo-Tf. El efecto es similar al de la condición 10.

En el primer conjunto de condiciones (1-5)—que incluyó bicarbonato y cloruro de sodio—se evaluó la influencia del pH en la estabilidad de la transferrina. Recordemos que, como se discutió en el capítulo 3, este es un factor determinante para la movilidad de la proteína en solución, pues el cambio en su estado de protonación provoca el movimiento de los residuos hacia diferentes conformaciones que, a su vez, pueden interactuar con el medio de manera diferente. Como se ve en el primer panel de la Tabla 7, la mayor estabilidad de la holo-transferrina se observó a pH 7.4 y el cambio significativo ocurrió a pH 5.5, donde se observó un desplazamiento de la T_m desde un valor alrededor de 83 °C hacia 70 °C, además de la aparición de dos mínimos en lugar de uno; con ello se dedujo la transición hacia su forma libre de hierro (apo-Tf), aparentemente menos estable. Esto podría estar relacionado con el orden de desplegamiento de la transferrina, ya que dependiendo del medio en el que se encuentre, los lóbulos pueden tener comportamientos independientes. Tal como se mostró en la Figura 1.3, se sabe que la transferrina posee un sitio de unión a metales por cada lóbulo (uniendo en total dos iones férricos por molécula). En el caso de la holo-Tf, el hecho de presentar una sola T_m aparente podría explicarse como que ambos lóbulos se estabilizan por la presencia del hierro y se despliegan al mismo tiempo, siendo que entonces la apo-Tf, al encontrarse libre de hierro, muestra mayor flexibilidad en un lóbulo que en el otro, resultando en dos valores de T_m. Esto podría respaldar, a su vez, lo que sugieren algunos autores sobre la diferencia que presentan los lóbulos de la transferrina en cuanto a su afinidad por el hierro al estar bajo diferentes condiciones, siendo que, en el suero sanguíneo (bajo condiciones fisiológicas), el lóbulo N-terminal posee mayor afinidad de unión por el hierro, mientras que lo contrario ocurre (siendo el lóbulo C terminal más afín) cuando la proteína se encuentra en solución amortiguadora, como ocurriría experimentalmente [99].

Por otra parte, los experimentos con el citrato sugieren la posibilidad de regulación alostérica por otras sustancias presentes en el medio, posiblemente otros iones o moléculas pequeñas [99]. Algunos autores han explorado el papel que juega el citrato en la interacción de la transferrina con el hierro, descartándolo como anión

sinérgico y por el contrario, considerándolo un anión que compite por el hierro [100]. Esto se confirmó cuando se añadió citrato de sodio en las demás condiciones (Tabla 6, condiciones 6-25), pues ocurrió la transición hacia apo-Tf, tal como se había visto al disminuir el pH a 5.5, pero en este caso la liberación del hierro fue ocasionada por el secuestro del hierro debido a la gran afinidad de unión del citrato con el ion férrico.

Como se ha descrito con anterioridad, uno de los factores más importantes para la retención del hierro en la holo-transferrina es la presencia del anión sinérgico, el carbonato o, en este caso, el bicarbonato. Esto se vio claramente al comparar las condiciones 11 y 21 en el segundo panel de la Tabla 7, donde la única diferencia fue la presencia o ausencia, respectivamente, de dicho anión. En contraste con las primeras condiciones, en las que este anión estaba presente y la pérdida del hierro ocurría hasta alcanzar determinada acidez, la pérdida del hierro por efecto del citrato en este caso ocurrió independientemente del pH, observándose la señal característica de la apo-Tf, aún estando a pH 7.4. Entonces, los resultados de este experimento confirman y destacan la importancia del anión bicarbonato como anión sinérgico para mantener al hierro unido a la transferrina.

Finalmente, la presencia de sal (NaCl), dependiendo de su concentración, suele contribuir a la fuerza iónica del medio para facilitar algunos contactos que pueden estabilizar a la proteína durante las transiciones entre un estado conformacional y otro, ya sea interactuando directamente con las cargas expuestas de la proteína o manteniéndose en el bulto de la solución, y alterando la superficie electrostática en las regiones interdominio [101]. En relación con la función fisiológica de la transferrina, se ha observado que en las condiciones del medio extracelular, la presencia de iones de cloruro retarda la liberación del hierro, caso contrario cuando se acidifica el medio [10]. No obstante, en las condiciones que se probaron en este trabajo, la concentración de sal utilizada es muy baja para apreciar una diferencia significativa.

CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS SOBRE POSIBLES SITIOS DE INTERACCIÓN PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS

5.1 Introducción

En condiciones patológicas como el cáncer, donde hay un requerimiento exacerbado de hierro por las células cancerígenas, éstas expresan una mayor cantidad de receptores de transferrina en su superficie. Este conocimiento ha permitido sugerir entonces la posibilidad de dirigir la administración de agentes anticancerígenos mediante el mecanismo de transporte de la transferrina [2], [102].

Entre las recientes estrategias exploradas para desarrollar nuevos tratamientos contra cáncer, están los compuestos de coordinación a base de rutenio, gracias a su variedad de estados de oxidación y a su capacidad para intercambiar ligandos y de imitar a otros metales, como el hierro, al unirse a moléculas biológicas, como la transferrina [102], [103], [104]. Una propuesta en este respecto involucra la coordinación del grupo 1,3,4-triaza-7-fosfadamantano (PTA) al rutenio para conferirle actividad antiproliferativa [105]. Este grupo es una fosfina soluble en agua con posibilidad de sustitución en los átomos de P o N y sensible a cambios de pH [106]. Esto último es de particular interés en la interacción con la transferrina, ya que, como se ha discutido anteriormente, esta proteína presenta variedad conformacional en distintos valores de pH de relevancia fisiológica, debido a su mecanismo de unión y liberación de hierro [55].

Para llevar a cabo el estudio de la interacción proteína-ligando, se propuso el uso de técnicas estructurales, como la cristalografía de rayos X descrita en el capítulo 2; espectroscópicas, como TSA descrita en el capítulo 4, y calorimétricas, como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y calorimetría de barrido diferencial (DSC), que se describirán en la discusión. Cabe mencionar que los resultados descritos a continuación se limitan a una evaluación cualitativa, pues a raíz de las observaciones preliminares, la interacción mostró ser demasiado débil como para medir parámetros de manera cuantitativa. No obstante, plantean una vista general para tomar en cuenta en futuras evaluaciones con compuestos de este tipo.

5.2 Materiales y métodos

Se utilizaron compuestos de rutenio sintetizados por el grupo del Dr. Antonio Romerosa de la Universidad de Almería, España, presentados como profármacos con potencial actividad anticancerígena [107].

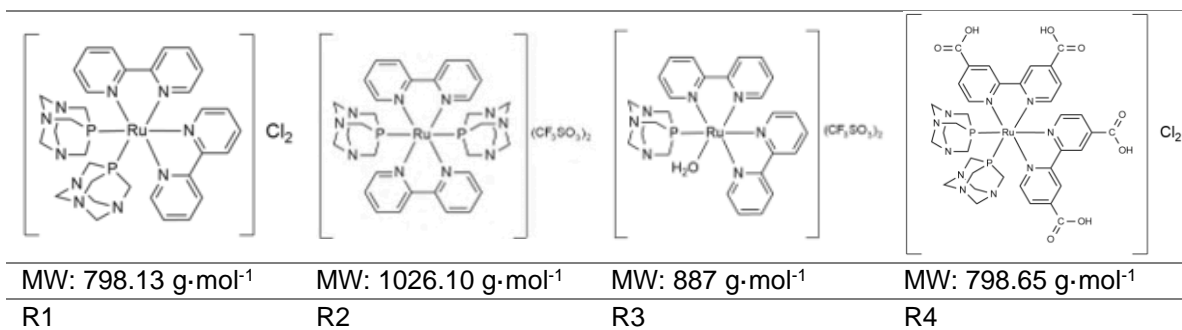


Figura 5.1. Estructuras moleculares de los ligandos cis-[Ru(bpy)₂(PTA)₂]Cl₂ (**R1**), trans-[Ru(bpy)₂(PTA)₂](CF₃SO₃)₂ (**R2**), cis-[Ru(bpy)₂(H₂O)(PTA)](CF₃SO₃)₂ (**R3**), cis-[Ru(dcbpy)₂(PTA)₂]Cl₂ (**R4**)

5.2.1 Cristalización en presencia de ligandos

Se realizaron experimentos de cristalización por difusión en fase vapor de la transferrina en presencia de los ligandos disueltos en agua (referidos como co-cristalización), los cuales mostraron una coloración característica por tratarse de compuestos de coordinación (ver Figura 5.2A). Por otra parte, se difundieron estos mismos ligandos en experimentos de cristalización por contradifusión en geles en medios capilares una vez crecidos cristales dentro de ellos (procedimiento conocido como *soaking*). Las condiciones iniciales de los experimentos de cristalización consistieron en lo siguiente: 20 mg·ml⁻¹ apo-/holo-transferrina en solución amortiguadora 15 mM HEPES, 20 mM NaHCO₃, 50 mM NaCl, pH 7.4, para difusión en fase vapor y 40 mg·ml⁻¹ para contradifusión en gel de agarosa LM 0.3% (p/v) en capilares; agente precipitante 0.2 M citrato de amonio tribásico pH 7.0, 20% (p/v) PEG 3,350, para difusión en fase vapor y al doble para contradifusión; 5 mM ligandos R1-R4.

5.2.2 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y de barrido diferencial (DSC)

Con la finalidad de observar si existe alguna interacción entre la transferrina con los ligandos en solución, se utilizó como punto de partida la técnica de calorimetría de titulación isotérmica, una de las técnicas universalmente utilizadas para evaluar interacciones proteína-ligando [87]. La técnica de ITC permite determinar la constante de afinidad de unión, así como los parámetros energéticos asociados, tales como las diferencias de entalpía, entropía y energía libre de Gibbs. Esto se logra realizando adiciones graduales de determinada cantidad de ligando hacia la solución de proteína y midiendo la cantidad de calor transferido en solución, que representa un conjunto de fenómenos que contribuyen al mismo. Al cociente de la diferencia en la entalpía entre la diferencia de temperatura se le conoce como la capacidad calorífica (C_p), cuyo cambio suele medirse en función del tiempo en el que transcurre la interacción proteína-ligando [108].

Para realizar este experimento, las muestras de transferrina libre de hierro (apo-Tf) y unida a hierro (holo-Tf) se prepararon en solución amortiguadora 15 mM HEPES pH 7.4, 20 mM NaHCO₃ y 50 mM NaCl. Los compuestos se prepararon en la misma solución amortiguadora a partir de un *stock* 5 mM de éstos en agua.

Por otra parte, la técnica de DSC permite conocer, entre otros parámetros, la temperatura de máxima estabilidad (T_m), en la cual existe un equilibrio entre la proporción de proteína plegada y desplegada. Generalmente se utiliza esta técnica para caracterizar energéticamente a la proteína ya que permite estudiar su desnaturalización térmica—es decir, ocasionada por el aumento en la temperatura [109]. No obstante, en un escenario de interacción proteína-ligando, puede emplearse DSC para observar si existe alguna interacción al comparar el termograma resultante de la proteína por sí sola contra aquel de la proteína en presencia del ligando en cuestión.

Para este experimento, se preparó 10 µM holo-Tf en solución amortiguadora 10 mM fosfatos y 20 mM NaHCO₃ a pH 7.4 y se preparó otra muestra igual pero en presencia de 100 µM ligando R2. Se midieron ciclos de 25 - 100 °C a velocidad de 1.5 °C/min.

5.2.3 Ensayo de desplazamiento térmico (TSA)

Se preparó una serie de muestras de apo- y holo-transferrina en solución amortiguadora 15 mM cacodilato-HCl, 20 mM NaHCO₃ y 50 mM NaCl en los dos valores de pH más significativos, siguiendo el esquema de preparación descrito en la Tabla 8. Las muestras de transferrina fueron preparadas a una concentración inicial de 1 mg·ml⁻¹ en un volumen de 45 µl, se mezclaron con 5 µl de solución 10 mM de cada respectivo ligando, que quedaron a una concentración de en un volumen total de 50 µl y se mezclaron con tinción fluorescente Sypro Orange[®] inmediatamente antes de realizar las mediciones. Las muestras fueron analizadas en un equipo termociclador QuantStudio[®] para RT-qPCR y los datos resultantes fueron analizados y exportados desde el software QuantStudio Design & Analysis Software[®] v1.5.2. se analizaron en un intervalo de temperaturas desde 25 °C hasta 99 °C.

Tabla 8. Esquema de preparación de muestras para evaluar la interacción de la transferrina con los ligandos descritos en la Figura 5.2.1, incluyendo blancos y controles, correspondientemente.

Muestra	Amortiguador pH 5.5	Amortiguador pH 7.4	apo-Tf	holo-Tf	R1	R2	R3	R4
1		✓						
2		✓	✓					
3		✓	✓		✓			
4		✓	✓			✓		
5		✓	✓				✓	
6		✓	✓					✓
7		✓		✓				
8		✓		✓	✓			
9		✓		✓		✓		
10		✓		✓			✓	
11		✓		✓				✓
12		✓			✓			
13		✓				✓		
14		✓					✓	
15		✓						✓
16	✓							
17	✓		✓					
18	✓		✓		✓			
19	✓		✓			✓		
20	✓		✓				✓	
21	✓		✓					✓
22	✓			✓				
23	✓			✓	✓			
24	✓			✓		✓		
25	✓			✓			✓	
26	✓			✓				✓
27	✓				✓			
28	✓					✓		
29	✓						✓	
30	✓							✓

5.3 Resultados y discusión

Uno de los métodos más utilizados para estudiar interacciones proteína-ligando mediante cristalografía de rayos X es la co-cristalización, en la que se incubaba a la proteína con un exceso de ligando para que éstos interactúen antes de formarse el

crystal. Alternativamente, el *soaking* consiste en remojar cristales previamente crecidos en la solución del ligando para promover la difusión de éste a través de los canales de agua que conforman al cristal—recordando que los cristales de proteína contienen un alto porcentaje de solvente (agua) [87], [110]. En este trabajo, se probaron ambos métodos.

Transcurrido suficiente tiempo para observar el crecimiento de cristales por difusión en fase vapor, se observó que el compuesto R2 fue el único con el cual crecieron cristales de apo-transferrina, por lo cual los experimentos subsecuentes se realizaron únicamente con este ligando. En la Figura 5.2C se observa cómo el ligando R2 parece difundir y mantenerse dentro de los cristales, dando un indicio de una posible interacción con la proteína en el cristal.

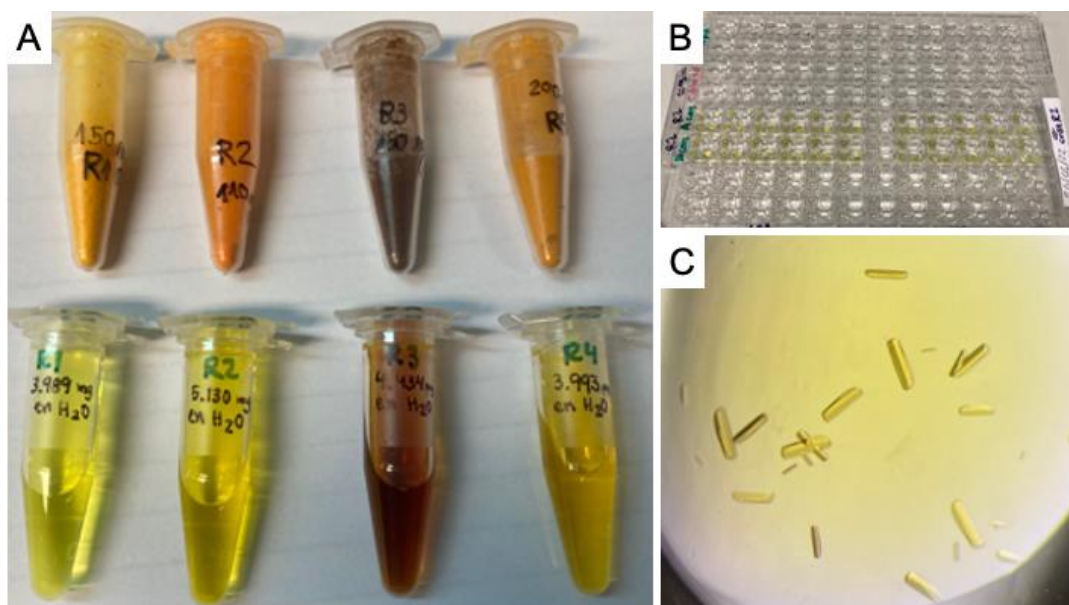


Figura 5.2. Ligandos de rutenio preparados para su difusión en los experimentos de cristalización. A) Ligandos R1-R4 disueltos en agua a concentración stock de 5 mM. B) Configuración del experimento de co-cristalización en difusión en fase vapor, gota sedente. C) Cristales de apo-Tf resultantes de la co-cristalización con el ligando R2.

En cuanto a los experimentos de contradifusión en geles en medios capilares, se partió de cristales crecidos con 3 meses de antelación por este método y se les aplicó la solución de ligando R2 en la parte superior del capilar, permitiendo que ésta difundiese gradualmente a lo largo del capilar hasta incorporarse dentro de los cristales, como puede observarse que ocurrió en la Figura 5.3.

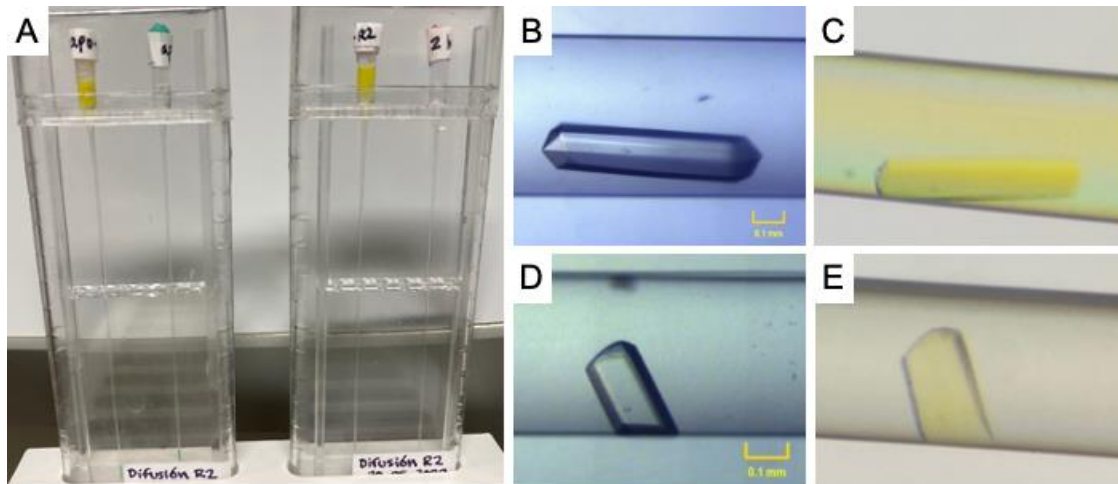


Figura 5.3. Difusión de ligando R2 en experimentos de cristalización de apo-Tf mediante contradifusión. A) Configuración del experimento de contradifusión. B y D) apo-transferrina antes de la difusión de la solución del ligando R2 dentro del capilar. C y E) apo-transferrina después de la difusión de la solución del ligando R2 dentro del capilar. Los cristales se estabilizaron durante 3 meses previo a la difusión del ligando.

Por otra parte, se exploró la cristalización de la apo-Tf en presencia del ligando R2 en las condiciones de pH 5.5, 7.0 y 8.0 estudiadas a lo largo de este trabajo. Los cristales obtenidos mostraron morfologías diferentes en cada condición, de manera similar a los experimentos descritos en el Capítulo 2; sin embargo, la presencia del ligando los modificó ligeramente, en particular en el caso del pH 5.5 y del pH 8.0 (Figura 5.4). En la Figura 5.5 se muestra un cristal de apo-Tf en condiciones de pH 5.5 mediante contradifusión en geles en medios capilares.

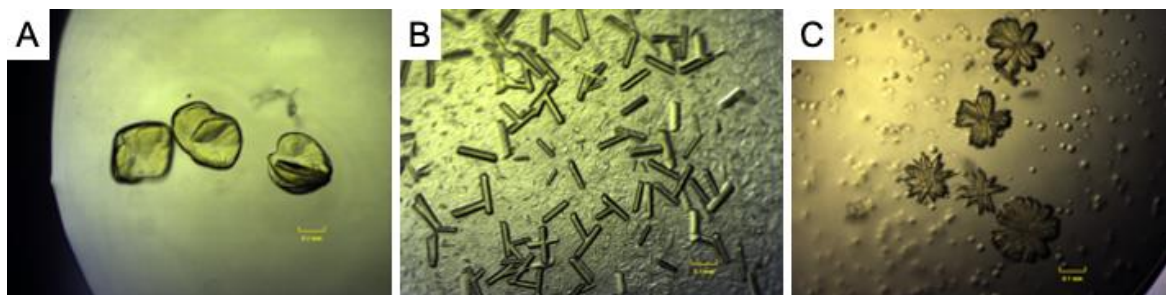


Figura 5.4. Cristales de apo-Tf obtenidos mediante difusión en fase vapor a pH 5.5 (A), pH 7.0 (B) y pH 8.0 (C) en presencia del ligando R2.

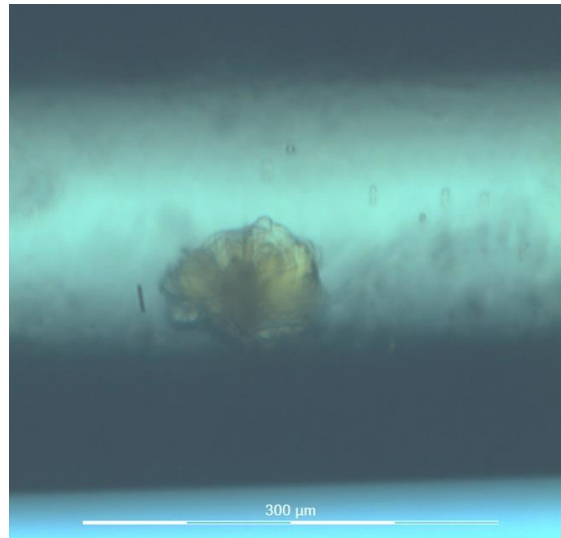


Figura 5.5. Cristal de apo-Tf crecido en contradifusión en capilares a pH 5.5. Se difundió el ligando R2 una vez que el cristal se mantuvo estable durante 3 meses y se observó la incorporación aparente del ligando dentro del cristal, al adquirir el color amarillo característico de R2.

Si bien se obtuvieron experimentos de cristalización exitosos que sugirieron la posibilidad tanto de cristalizar a la apo-Tf en presencia del ligando, como de difundir este último en cristales preformados, los pasos subsecuentes representaron un reto mayor, pues la estabilidad de los cristales se vio afectada para el estudio posterior por cristalografía de rayos X.

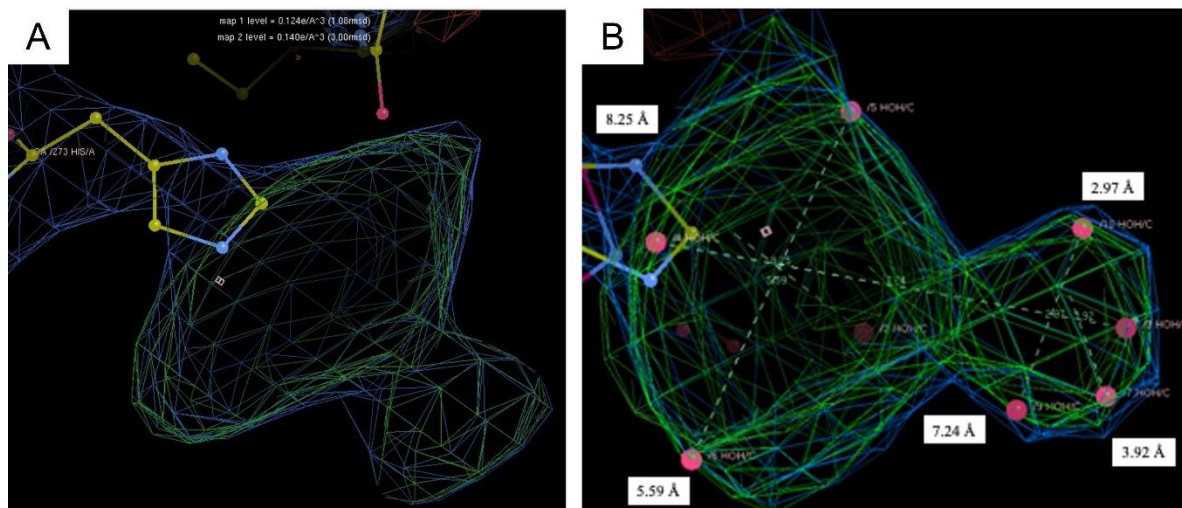


Figura 5.6. Porción del mapa de densidad electrónica con el mapa de diferencia, $F_o - F_c$, donde se observó una nube de densidad positiva. A) Localización de la nube en el residuo His273 y los valores de sigma correspondientes a cada mapa. B) Dimensiones aproximadas de la nube tomando algunos puntos de referencia.

La densidad electrónica positiva observada en el mapa Fo-Fc (Figura 5.6), que implica la densidad electrónica que no se ha asignado en el modelo—en ocasiones debido a que no corresponde con la secuencia del modelo— alrededor del residuo His273, de los cristales que crecieron en presencia del ligando R2 podría explicarse como correspondiente a este compuesto o a algún fragmento de éste. En ocasiones, los ligandos que se encuentran solo en una fracción de la celda unitaria del cristal de proteína presentan una densidad electrónica baja [57]. Para saber si esta densidad electrónica corresponde a un fragmento de la molécula de ligando, se requeriría calcular diferentes fragmentos y probar su ajuste en la densidad. De momento, se destaca el residuo His273, encontrado en una región superficial de la estructura de la transferrina, como potencial sitio de unión.

Por otra parte, se realizaron experimentos de TSA para evaluar la interacción de apo-Tf y holo-Tf con los ligandos mostrados en la Figura 5.1 en las dos condiciones de pH más representativas en cuanto a sus cambios conformacionales.

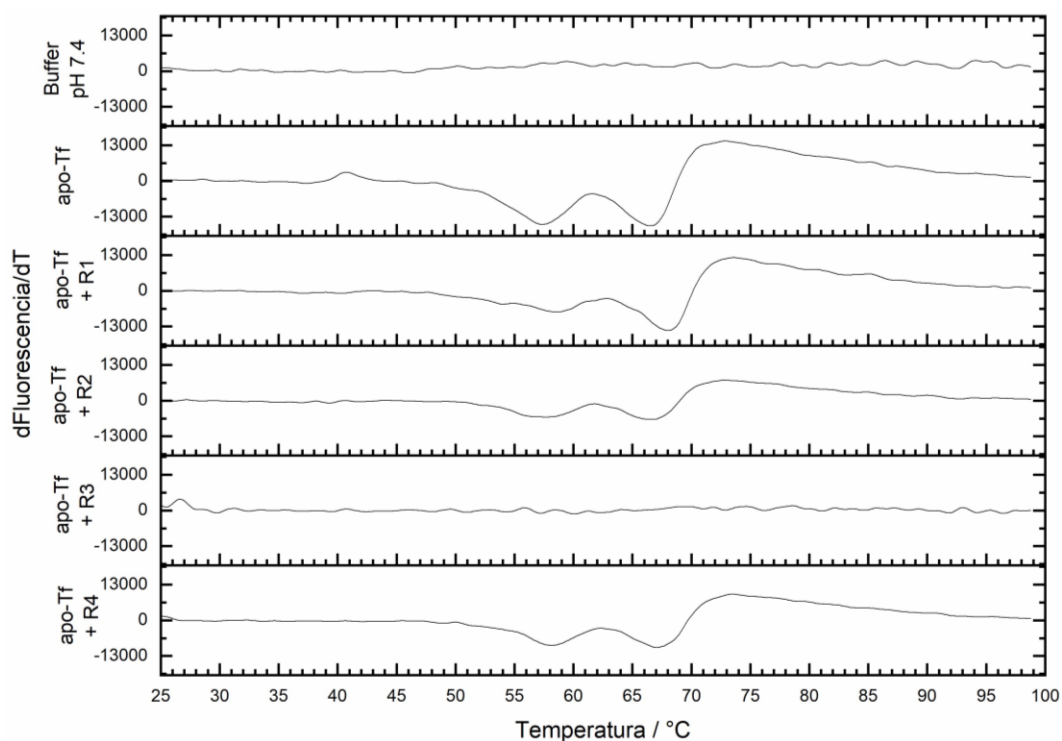


Figura 5.7. Comparación de los espectros de TSA de la apo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 7.4.

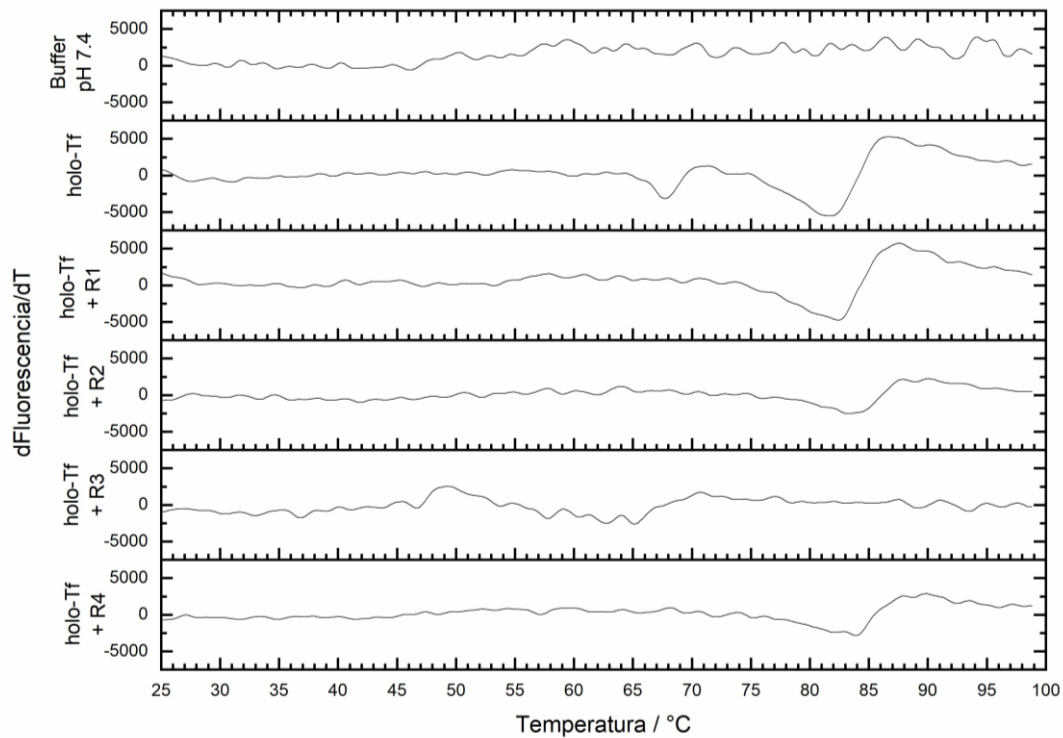


Figura 5.8. Comparación de los espectros de TSA de la holo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 7.4.

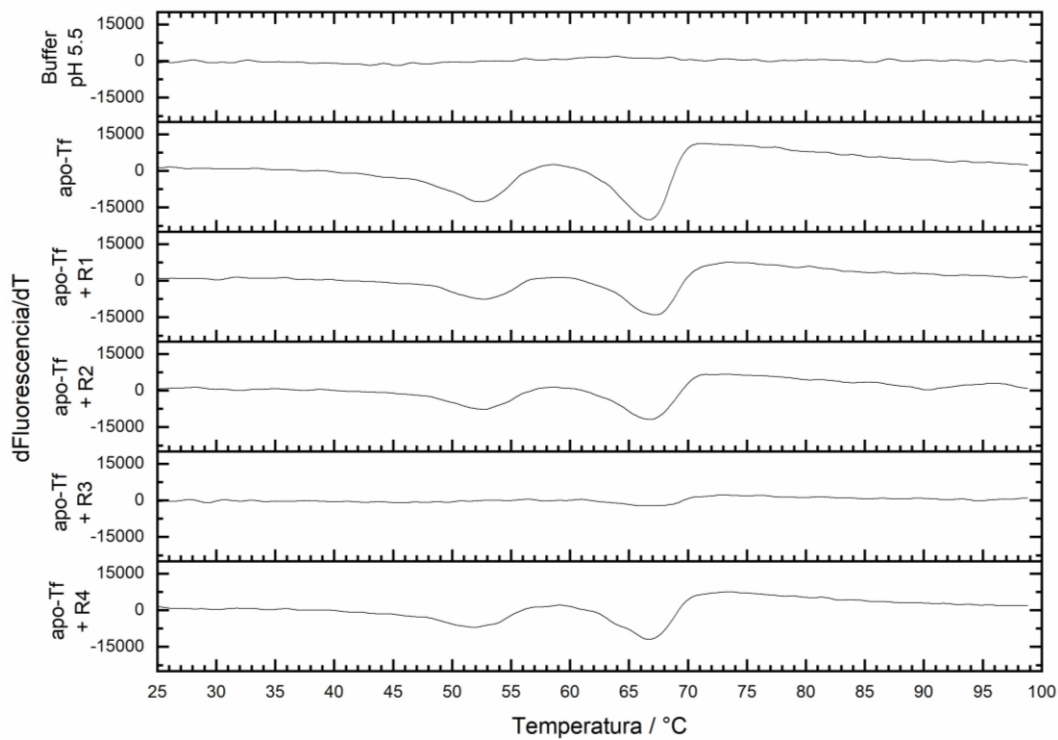


Figura 5.9. Comparación de los espectros de TSA de la apo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 5.5.

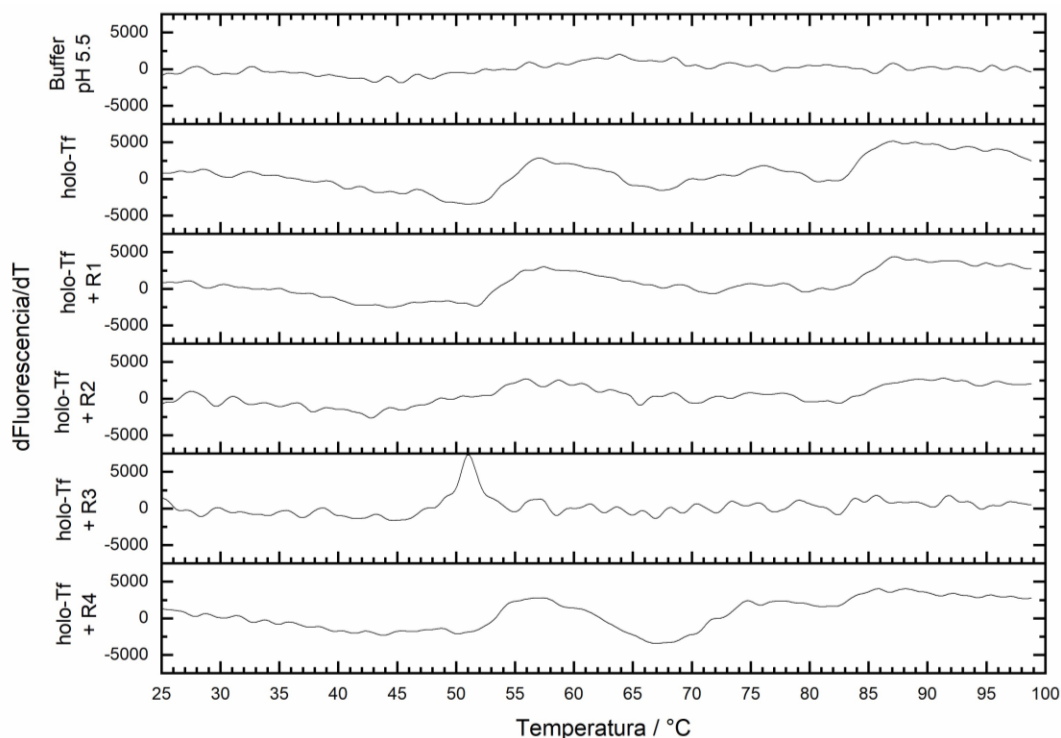


Figura 5.10. Comparación de los espectros de TSA de la holo-Tf en presencia de los cuatro ligandos en condiciones de pH 5.5.

Los espectros de TSA resultantes muestran la T_m aparente como el punto más bajo, es decir, el mínimo de señal. Como puede verse en la Figura 5.8, la holo-Tf presenta un solo mínimo alrededor de los 83 °C, mientras que en la Figura 5.7 la apo-Tf muestra dos mínimos alrededor de 57 °C y 67°, de los cuales el primero sufre un desplazamiento hacia 53 °C cuando se somete a pH 5.5. Estos dos mínimos se observaron en los experimentos de la sección 4.4 cuando la holo-Tf pierde el hierro y se convierte en apo-Tf. En este experimento, la presencia de los ligandos podría ocasionar una ligera alteración en la estabilidad en solución, evidenciada por una debilitación de la señal observada; sin embargo, esto no necesariamente implica una interacción. Por otro lado, se observó en general que la presencia del ligando R3 en la solución con la transferrina provoca su desnaturalización, pues cualquier espectro característico de la proteína fue eliminado. Estos resultados no son concluyentes bajo las condiciones que fueron probadas.

Se llevaron a cabo varias pruebas de ITC para medir la interacción del ligando R2 con la transferrina; sin embargo, la señal fue demasiado débil para ser cuantificada. Las observaciones preliminares (Figura 5.11) se limitan a sugerir que podría existir una interacción débil e inespecífica, que a su vez no es favorecida energéticamente debido a la dirección de las señales hacia arriba, que suelen indicar procesos endotérmicos.

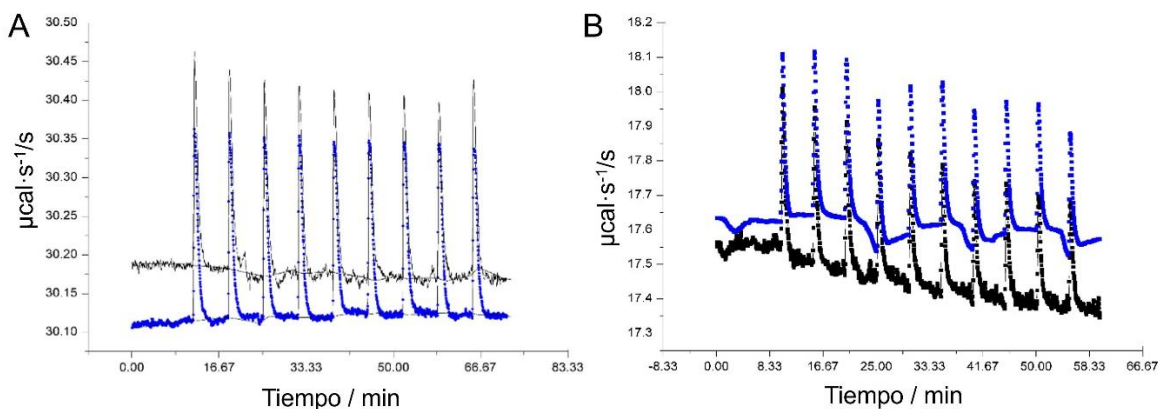


Figura 5.11. Termograma de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Se hicieron 10 inyecciones de 20 μl de 5 mM ligando R2 a la solución 0.005 mM de holo-Tf (línea negra) y se comparó contra el experimento de dilución (línea azul).

En los experimentos de calorimetría de barrido diferencial (Figura 5.12), se observó un desplazamiento de la T_m , correspondiente máximo, de 86.5 $^{\circ}\text{C}$ (línea negra) hacia 85.6 $^{\circ}\text{C}$ (línea roja), cuando la holo-Tf se encuentra en presencia del ligando R2. Este desplazamiento, de aproximadamente 1 $^{\circ}\text{C}$, podría ser poco significativo, pero también podría implicar una interacción débil, respaldando lo observado en los experimentos de ITC. Sin embargo, estos resultados se limitan a proveer información cualitativa ya que aún no se cuenta con suficiente información sobre los ligandos para hacer un análisis cuantitativo.

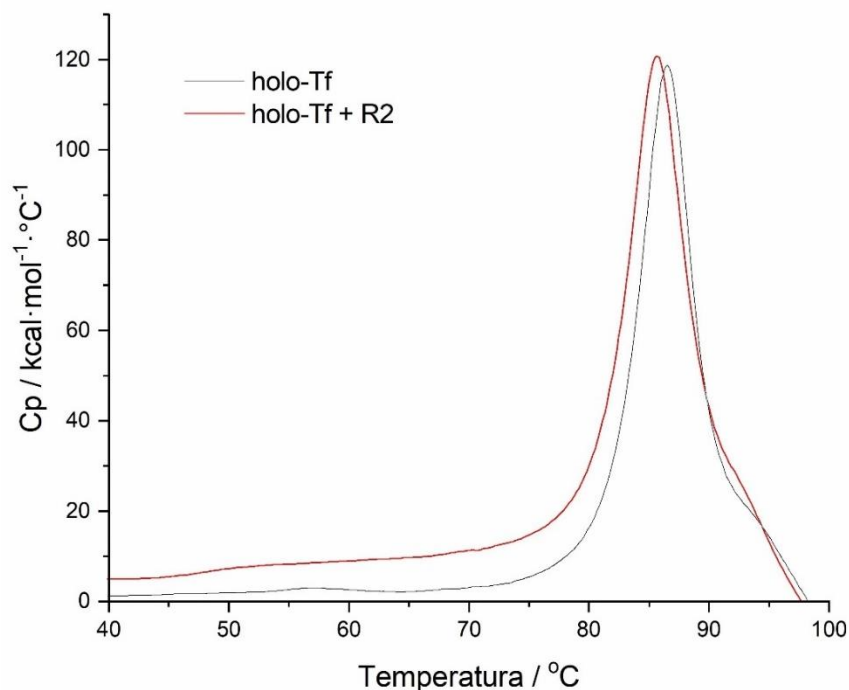


Figura 5.12. Termograma obtenido por calorimetría de barrido diferencial (DSC) para la holo-Tf en presencia del ligando R2 con respecto a la holo-Tf sola. Se observa un desplazamiento de la T_m en presencia del ligando.

En resumen, se exploraron diferentes técnicas para evaluar la interacción de la transferrina con los ligandos propuestos, como un primer alcance en este objetivo a largo plazo de emplear a esta proteína como un transportador de fármacos. Si bien no se observó una interacción clara, se reafirmó la importancia de controlar ciertas condiciones para favorecer, en primer lugar, la estabilidad de la proteína. Finalmente, es importante retomar consideración de la presencia de glicosilaciones en la transferrina, ya que también puede afectar su afinidad de unión a ligandos, o incluso llegar a impedirla. Esto no necesariamente implica un impedimento estérico, sino que los cambios conformacionales que ejercen los glicanos en la estructura global, así sean sutiles, pueden generar modificaciones en elementos de estructura secundaria de la proteína, enmascarando parcialmente potenciales sitios de unión, o modificar su superficie electrostática [91]. Esto suma importancia especialmente cuando se puede tratar de una interacción no específica, como sugieren los experimentos de calorimetría, pues se ve cada vez menos favorecida. Ahora bien, las interacciones débiles e inespecíficas no suelen dejar una marca energética significativa, siendo que su entalpía y entropía tienden a disminuir [91].

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

6.1 Conclusiones generales

La transferrina es una proteína que prevalece como una gran propuesta como sistema de transporte de fármacos, pero cuya complejidad en sus propiedades estructurales continúa representando un reto para dar el siguiente paso hacia este objetivo a largo plazo. Tomando en cuenta que la calidad de un modelo estructural está sujeta a los objetivos de obtener dicho modelo, en el caso de la transferrina humana en su estado nativo el análisis cristalográfico permitió caracterizar las propiedades intrínsecas de la molécula que restringen la resolución del modelo estructural. Esto, lejos de implicar una limitación, representó una oportunidad para mover el enfoque hacia las propiedades que le confieren flexibilidad a la transferrina, algo esencial para su mecanismo de transporte. El análisis estructural en solución, entonces, aportó conocimiento sobre la diversidad conformacional que posee esta proteína dependiendo de las condiciones de pH relevantes en las distintas etapas de dicho mecanismo. Así mismo, se evidenció la importancia de ciertas interacciones de la transferrina con otras moléculas de su entorno para procurar su estabilidad y, eventualmente, proponer condiciones para favorecer la interacción con ligandos de interés biomédico. Por último, se realizó una aproximación a este último objetivo, que quedó planteado como perspectiva dada la complejidad de la tarea y de los detalles que deben atenderse antes de ejecutarla, reafirmando la relevancia de este trabajo de tesis doctoral como aportación al largo pero prometedor camino que queda por delante en esta línea de investigación.

6.2 Perspectivas generales

Este trabajo ha dejado un panorama de posibilidades para explorar aún más el comportamiento de la transferrina humana por sí sola. Por una parte, el estudio de la transferrina humana sin glicosilaciones bajo las condiciones probadas en este trabajo podría aportar información valiosa sobre el papel de dichas glicosilaciones en su estabilidad. Desde el punto de vista cristalográfico, las estadísticas de calidad podrían mejorar en cuanto a resolución, permitiendo observar una estructura más detallada para proceder con estudios más específicos. Sin embargo, desde el punto de vista de la interacción química con ligandos, la ausencia de dichas glicosilaciones podría complicar los análisis en solución para su eventual uso como molécula de transporte de fármacos. Sobre esta línea, existe además el factor de comunicación interlobular en el comportamiento global de la proteína, por lo cual debe considerarse el uso de modelos estructurales fieles a la estructura nativa, por ejemplo, si se quisiese explorar una aproximación de dinámica molecular [60]. Ahora bien, aproximándonos a la posibilidad de desarrollar modelos *in vivo*, es importante

recordar que la transferrina debe conservar cierta identidad estructural para poder ser reconocida por su receptor, por lo que cualquier experimento que involucre la modificación estructural de la transferrina debe realizarse con cuidado de mantener la afinidad por su receptor. Entonces, la búsqueda de un punto intermedio entre condiciones experimentales óptimas y condiciones proyectadas a la aplicación biomédica es algo que merece la pena continuar y visitar tanto como sea necesario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y.-Z. Chang, Ed., *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases*, vol. 1173. en *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1173. Singapore: Springer Singapore, 2019. doi: 10.1007/978-981-13-9589-5.
- [2] H. Kawabata, "Transferrin and transferrin receptors update", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 133, pp. 46–54, mar. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037.
- [3] A. M. N. Silva, T. Moniz, B. de Castro, y M. Rangel, "Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective", *Coord. Chem. Rev.*, vol. 449, p. 214186, dic. 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214186.
- [4] M. Lampe, S. Vassilopoulos, y C. Merrifield, "Clathrin coated pits, plaques and adhesion", *J. Struct. Biol.*, vol. 196, núm. 1, pp. 48–56, oct. 2016, doi: 10.1016/j.jsb.2016.07.009.
- [5] K. Mizutani, M. Toyoda, y B. Mikami, "X-ray structures of transferrins and related proteins", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1820, núm. 3, pp. 203–211, mar. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.003.
- [6] N. Yang, H. Zhang, M. Wang, Q. Hao, y H. Sun, "Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe", *Sci. Rep.*, vol. 2, núm. 1, p. 999, dic. 2012, doi: 10.1038/srep00999.
- [7] M. A. Fernandes *et al.*, "A Review of Properties, Delivery Systems and Analytical Methods for the Characterization of Monomeric Glycoprotein Transferrin", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, pp. 1–12, mar. 2020, doi: 10.1080/10408347.2020.1743639.
- [8] R. Pratt, G. J. Handelman, T. E. Edwards, y A. Gupta, "Ferric pyrophosphate citrate: interactions with transferrin", *BioMetals*, vol. 31, núm. 6, pp. 1081–1089, dic. 2018, doi: 10.1007/s10534-018-0142-2.
- [9] R. T. A. MacGillivray *et al.*, "Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release \dagger · \ddagger ", *Biochemistry*, vol. 37, núm. 22, pp. 7919–7928, jun. 1998, doi: 10.1021/bi980355j.
- [10] A. Kulakova *et al.*, "Structural-stability studies on recombinant human transferrin", *Biophysics*, preprint, ago. 2019. doi: 10.1101/742957.
- [11] R. G. R. Pinheiro *et al.*, "Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease", *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 148, p. 105314, may 2020, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105314.
- [12] S. Ruan *et al.*, "Acid-Responsive Transferrin Dissociation and GLUT Mediated Exocytosis for Increased Blood-Brain Barrier Transcytosis and Programmed Glioma Targeting Delivery", *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, núm. 30, p. 1802227, jul. 2018, doi: 10.1002/adfm.201802227.
- [13] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, y L. Messori, "The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin.", *J. Biol. Chem.*, vol. 269, núm. 4, pp. 2581–2588, ene. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41984-3.
- [14] G. Hao, Z. P. Xu, y L. Li, "Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy", *RSC Adv.*, vol. 8, núm. 39, pp. 22182–22192, 2018, doi: 10.1039/C8RA02095G.
- [15] M. Wang *et al.*, "'Anion clamp' allows flexible protein to impose coordination geometry on metal ions", *Chem. Commun.*, vol. 51, núm. 37, pp. 7867–7870, 2015, doi: 10.1039/C4CC09642H.
- [16] K. C. Edwards, H. Kim, R. Ferguson, M. M. Lockart, y J. B. Vincent, "Significance of conformation changes during the binding and release of chromium(III) from human

- serum transferrin”, *J. Inorg. Biochem.*, vol. 206, p. 111040, may 2020, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111040.
- [17] G. Mathies, P. Gast, N. D. Chasteen, A. N. Luck, A. B. Mason, y E. J. J. Groenen, “Exploring the Fe(III) binding sites of human serum transferrin with EPR at 275 GHz”, *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 20, núm. 3, pp. 487–496, abr. 2015, doi: 10.1007/s00775-014-1229-z.
- [18] J. M. Aramini, J. A. Saponja, y H. J. Vogel, “Spectroscopic studies of the interaction of aluminum(III) with transferrins”, *Coord. Chem. Rev.*, vol. 149, pp. 193–229, ene. 1996, doi: 10.1016/S0010-8545(96)90026-0.
- [19] R. Troisi, F. Galardo, G. Ferraro, F. Sica, y A. Merlino, “Cisplatin Binding to Human Serum Transferrin: A Crystallographic Study”, *Inorg. Chem.*, vol. 62, núm. 2, pp. 675–678, ene. 2023, doi: 10.1021/acs.inorgchem.2c04206.
- [20] A. Shamsi, M. Al Shahwan, S. Ahamad, Md. I. Hassan, F. Ahmad, y A. Islam, “Spectroscopic, calorimetric and molecular docking insight into the interaction of Alzheimer’s drug donepezil with human transferrin: implications of Alzheimer’s drug”, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 38, núm. 4, pp. 1094–1102, mar. 2020, doi: 10.1080/07391102.2019.1595728.
- [21] A. Shamsi *et al.*, “Unraveling Binding Mechanism of Alzheimer’s Drug Rivastigmine Tartrate with Human Transferrin: Molecular Docking and Multi-Spectroscopic Approach towards Neurodegenerative Diseases”, *Biomolecules*, vol. 9, núm. 9, p. 495, sep. 2019, doi: 10.3390/biom9090495.
- [22] N. Sandu, C. G. Chilom, y A. I. Popescu, “Structural and molecular aspects of flavonoids as ligands for serum transferrin”, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 254, p. 119600, jun. 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119600.
- [23] H. Berman, K. Henrick, y H. Nakamura, “Announcing the worldwide Protein Data Bank”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 10, núm. 12, pp. 980–980, dic. 2003, doi: 10.1038/nsb1203-980.
- [24] A. McPherson y J. A. Gavira, “Introduction to protein crystallization”, *Acta Crystallogr. Sect. F*, vol. 70, núm. 1, pp. 2–20, 2014, doi: 10.1107/S2053230X13033141.
- [25] L. Govada y N. Chayen, “Choosing the Method of Crystallization to Obtain Optimal Results”, *Crystals*, vol. 9, núm. 2, p. 106, feb. 2019, doi: 10.3390/cryst9020106.
- [26] N. Asherie, “Protein crystallization and phase diagrams”, *Methods*, vol. 34, núm. 3, pp. 266–272, nov. 2004, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028.
- [27] P. G. Vekilov, “Nucleation of protein crystals”, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 62, núm. 2, pp. 136–154, jun. 2016, doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2016.04.007.
- [28] N. E. Chayen y E. Saridakis, “Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal”, *Nat. Methods*, vol. 5, núm. 2, pp. 147–153, 01 2008, doi: 10.1038/nmeth.f.203.
- [29] N. E. Chayen, “Turning protein crystallisation from an art into a science”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, núm. 5, pp. 577–583, oct. 2004, doi: 10.1016/j.sbi.2004.08.002.
- [30] J. J. D. Yoreo, “3 Principles of Crystal Nucleation and Growth”.
- [31] C. N. Nanev, “Advancements (and challenges) in the study of protein crystal nucleation and growth; thermodynamic and kinetic explanations and comparison with small-molecule crystallization”, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 66, núm. 2, p. 100484, may 2020, doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2020.100484.
- [32] C. N. Nanev, “Recent experimental and theoretical studies on protein crystallization: Recent experimental and theoretical studies”, *Cryst. Res. Technol.*, vol. 52, núm. 1, p. 1600210, ene. 2017, doi: 10.1002/crat.201600210.
- [33] C. Campos-Escamilla, L. A. Gonzalez-Rámirez, F. Otálora, J. A. Gavira, y A. Moreno, “A short overview on practical techniques for protein crystallization and a new

- approach using low intensity electromagnetic fields”, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 68, núm. 1, p. 100559, feb. 2022, doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2022.100559.
- [34] J. M. García-Ruiz, F. Otálora, y A. García-Caballero, “The role of mass transport in protein crystallization”, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, vol. 72, núm. 2, pp. 96–104, feb. 2016, doi: 10.1107/S2053230X16000030.
- [35] F. Artusio, A. Castellví, R. Pisano, y J. A. Gavira, “Tuning Transport Phenomena in Agarose Gels for the Control of Protein Nucleation Density and Crystal Form”, *Crystals*, vol. 11, núm. 5, Art. núm. 5, may 2021, doi: 10.3390/cryst11050466.
- [36] O. Velásquez-González *et al.*, “Crystal Growth in Gels from the Mechanisms of Crystal Growth to Control of Polymorphism: New Trends on Theoretical and Experimental Aspects”, *Crystals*, vol. 9, núm. 9, p. 443, ago. 2019, doi: 10.3390/cryst9090443.
- [37] F. Otálora, J. A. Gavira, J. D. Ng, y J. M. García-Ruiz, “Counterdiffusion methods applied to protein crystallization”, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 101, núm. 1–3, pp. 26–37, nov. 2009, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.004.
- [38] G. Rhodes, *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models*, 3rd ed. en Complementary science series. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press, 2006.
- [39] A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, y M. Jaskolski, “Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures: Protein crystallography for non-crystallographers”, *FEBS J.*, vol. 275, núm. 1, pp. 1–21, ene. 2008, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x.
- [40] J. Wally *et al.*, “The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding”, *J. Biol. Chem.*, vol. 281, núm. 34, pp. 24934–24944, ago. 2006, doi: 10.1074/jbc.M604592200.
- [41] A. Flores-Ibarra *et al.*, “Novel Devices for Transporting Protein Crystals to the Synchrotron Facilities and Thermal Protection of Protein Crystals”, *Crystals*, vol. 8, núm. 9, p. 340, ago. 2018, doi: 10.3390/cryst8090340.
- [42] W. Minor, M. Cymborowski, Z. Otwinowski, y M. Chruszcz, “HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution – from diffraction images to an initial model in minutes”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 62, núm. 8, Art. núm. 8, ago. 2006, doi: 10.1107/S0907444906019949.
- [43] W. Kabsch, “XDS”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, núm. 2, pp. 125–132, feb. 2010, doi: 10.1107/S0907444909047337.
- [44] C. Vonrhein *et al.*, “Data processing and analysis with the *autoPROC* toolbox”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, núm. 4, pp. 293–302, abr. 2011, doi: 10.1107/S0907444911007773.
- [45] M. D. Winn *et al.*, “Overview of the *CCP 4* suite and current developments”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, núm. 4, pp. 235–242, abr. 2011, doi: 10.1107/S0907444910045749.
- [46] D. Liebschner *et al.*, “Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*”, *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.*, vol. 75, núm. 10, pp. 861–877, oct. 2019, doi: 10.1107/S2059798319011471.
- [47] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, y K. Cowtan, “Features and development of *Cool*”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, núm. 4, pp. 486–501, abr. 2010, doi: 10.1107/S0907444910007493.
- [48] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis”, *J. Comput. Chem.*, vol. 25, núm. 13, pp. 1605–1612, 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
- [49] J. A. Gavira, “Current trends in protein crystallization”, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 602, pp. 3–11, jul. 2016, doi: 10.1016/j.abb.2015.12.010.

- [50] J. A. Gavira, F. Otálora, L. A. González-Ramírez, E. Melero, A. E. S. van Driessche, y J. M. García-Ruiz, “On the Quality of Protein Crystals Grown under Diffusion Mass-transport Controlled Regime (I)”, *Crystals*, vol. 10, núm. 2, p. 68, ene. 2020, doi: 10.3390/cryst10020068.
- [51] C. Nanev, “Peculiarities of Protein Crystal Nucleation and Growth”, *Crystals*, vol. 8, núm. 11, p. 422, nov. 2018, doi: 10.3390/cryst8110422.
- [52] S. Fudo, F. Qi, M. Nukaga, y T. Hoshino, “Influence of Precipitants on Molecular Arrangements and Space Groups of Protein Crystals”, *Cryst. Growth Des.*, vol. 17, núm. 2, pp. 534–542, feb. 2017, doi: 10.1021/acs.cgd.6b01385.
- [53] I. V. Markov, *Crystal growth for beginners: fundamentals of nucleation, crystal growth and epitaxy*, 3rd edition. New Jersey: World Scientific, 2016.
- [54] G. Tosi, S. Fermani, G. Falini, J. A. Gavira, y J. M. Garcia Ruiz, “Hetero- vs Homogeneous Nucleation of Protein Crystals Discriminated by Supersaturation”, *Cryst. Growth Des.*, vol. 11, núm. 5, pp. 1542–1548, may 2011, doi: 10.1021/cg101460z.
- [55] C. Campos-Escamilla, D. Siliqi, L. A. Gonzalez-Ramirez, C. Lopez-Sanchez, J. A. Gavira, y A. Moreno, “X-ray Characterization of Conformational Changes of Human Apo- and Holo-Transferrin”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, núm. 24, Art. núm. 24, ene. 2021, doi: 10.3390/ijms222413392.
- [56] K. A. Kantardjieff y B. Rupp, “Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals”, *Protein Sci.*, vol. 12, núm. 9, pp. 1865–1871, sep. 2003, doi: 10.1110/ps.0350503.
- [57] L. Maveyraud y L. Mourey, “Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery”, *Molecules*, vol. 25, núm. 5, p. 1030, feb. 2020, doi: 10.3390/molecules25051030.
- [58] Z. Klamer, P. Hsueh, D. Ayala-Talavera, y B. Haab, “Deciphering Protein Glycosylation by Computational Integration of On-chip Profiling, Glycan-array Data, and Mass Spectrometry”, *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 18, núm. 1, pp. 28–40, ene. 2019, doi: 10.1074/mcp.RA118.000906.
- [59] P. Stanley, K. W. Moremen, N. E. Lewis, N. Taniguchi, y M. Aebi, “N-Glycans”, en *Essentials of Glycobiology*, 4th ed., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, y P. H. Seeberger, Eds., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Consultado: el 8 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
- [60] Z. Ghanbari, M. R. Housaindokht, M. R. Bozorgmehr, y M. Izadyar, “The effect of glycosylation on the transferrin structure: A molecular dynamic simulation analysis”, *J. Theor. Biol.*, vol. 404, pp. 73–81, sep. 2016, doi: 10.1016/j.jtbi.2016.05.024.
- [61] A. B. Mason *et al.*, “Expression of glycosylated and nonglycosylated human transferrin in mammalian cells. Characterization of the recombinant proteins with comparison to three commercially available transferrins”, *Biochemistry*, vol. 32, núm. 20, pp. 5472–5479, may 1993, doi: 10.1021/bi00071a025.
- [62] F. Clerc, K. R. Reiding, B. C. Jansen, G. S. M. Kammeijer, A. Bondt, y M. Wuhler, “Human plasma protein N-glycosylation”, *Glycoconj. J.*, vol. 33, núm. 3, pp. 309–343, jun. 2016, doi: 10.1007/s10719-015-9626-2.
- [63] Y. Wada, “Mass spectrometry of transferrin glycoforms to detect congenital disorders of glycosylation: Site-specific profiles and pitfalls”, *PROTEOMICS*, vol. 16, núm. 24, pp. 3105–3110, dic. 2016, doi: 10.1002/pmic.201500551.
- [64] J. E., “Structural Biology of Glycoproteins”, en *Glycosylation*, S. Petrescu, Ed., InTech, 2012. doi: 10.5772/48154.
- [65] J. R. Mesters y R. Hilgenfeld, “Protein Glycosylation, Sweet to Crystal Growth?”, *Cryst. Growth Des.*, vol. 7, núm. 11, pp. 2251–2253, nov. 2007, doi: 10.1021/cg7006843.

- [66] A. Bohne y C.-W. Von Der Lieth, "GLYCOSYLATION OF PROTEINS: A COMPUTER BASED METHOD FOR THE RAPID EXPLORATION OF CONFORMATIONAL SPACE OF N -GLYCANS", en *Biocomputing 2002*, Kauai, Hawaii, USA: WORLD SCIENTIFIC, dic. 2001, pp. 285–296. doi: 10.1142/9789812799623_0027.
- [67] S. Shrimal, N. A. Cherepanova, y R. Gilmore, "Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum", *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 41, pp. 71–78, may 2015, doi: 10.1016/j.semcd.2014.11.005.
- [68] A.-J. Petrescu, "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding", *Glycobiology*, vol. 14, núm. 2, pp. 103–114, sep. 2003, doi: 10.1093/glycob/cwh008.
- [69] E. C. Meng, E. F. Pettersen, G. S. Couch, C. C. Huang, y T. E. Ferrin, "Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera", *BMC Bioinformatics*, vol. 7, núm. 1, p. 339, dic. 2006, doi: 10.1186/1471-2105-7-339.
- [70] H. S. Lee, Y. Qi, y W. Im, "Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study", *Sci. Rep.*, vol. 5, núm. 1, p. 8926, mar. 2015, doi: 10.1038/srep08926.
- [71] W.-L. Hu, P. A. Chindemi, y E. Regoeczi, "Reduced hepatic iron uptake from rat aglycotransferrin", *Biol. Met.*, vol. 4, núm. 2, pp. 90–94, 1991, doi: 10.1007/BF01135384.
- [72] P. Hoefkens y M. I. E. Huijskes-Heins, "Influence of transferrin glycans on receptor binding and iron-donation".
- [73] I. Trbojević-Akmačić *et al.*, "Comparative analysis of transferrin and IgG N-glycosylation in two human populations", *Commun. Biol.*, vol. 6, núm. 1, p. 312, mar. 2023, doi: 10.1038/s42003-023-04685-6.
- [74] M. Gräwert y D. Svergun, "A beginner's guide to solution small-angle X-ray scattering (SAXS)", *The Biochemist*, vol. 42, núm. 1, pp. 36–42, ene. 2020, doi: 10.1042/BIO04201036.
- [75] T. W. Gräwert y D. I. Svergun, "Structural Modeling Using Solution Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)", *J. Mol. Biol.*, vol. 432, núm. 9, pp. 3078–3092, abr. 2020, doi: 10.1016/j.jmb.2020.01.030.
- [76] A. T. Tuukkanen y D. I. Svergun, "Weak protein-ligand interactions studied by small-angle X-ray scattering", *FEBS J.*, vol. 281, núm. 8, pp. 1974–1987, abr. 2014, doi: 10.1111/febs.12772.
- [77] R. L. Owen, E. Rudiño-Piñera, y E. F. Garman, "Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, núm. 13, pp. 4912–4917, mar. 2006, doi: 10.1073/pnas.0600973103.
- [78] P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch, y D. I. Svergun, "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis", *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 36, pp. 1277–1282, ene. 2003.
- [79] F. S. A. L. y B. W., "Scatter: software for the analysis of nano- and mesoscale small-angle scattering", *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 43, núm. 3, pp. 639–646, 2010, doi: 10.1107/S0021889810008289.
- [80] D. Svergun, C. Barberato, y M. H. J. Koch, "CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates", *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 28, núm. 6, pp. 768–773, 1995, doi: 10.1107/S0021889895007047.
- [81] D. I. Svergun, "Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing", *Biophys. J.*, vol. 76, núm. 6, pp. 2879–2886, jun. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
- [82] A. Panjkovich y D. I. Svergun, "Deciphering conformational transitions of proteins by small angle X-ray scattering and normal mode analysis", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, núm. 8, pp. 5707–5719, feb. 2016, doi: 10.1039/C5CP04540A.

- [83] D. (1) Schneidman-Duhovny, A. (1) Sali, M. (2) Hammel, y J. a. Tainer, “FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, núm. W1, pp. W424–W429, 08 2016, doi: 10.1093/nar/gkw389.
- [84] D. Siliqi, J. Foadi, M. Mazzorana, D. Altamura, A. Méndez-Godoy, y N. Sánchez-Puig, “Conformational Flexibility of Proteins Involved in Ribosome Biogenesis: Investigations via Small Angle X-ray Scattering (SAXS)”, *Crystals*, vol. 8, núm. 3, p. 109, feb. 2018, doi: 10.3390/cryst8030109.
- [85] U. Emekli, D. Schneidman-Duhovny, H. J. Wolfson, R. Nussinov, y T. Haliloglu, “HingeProt: Automated prediction of hinges in protein structures”, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 70, núm. 4, pp. 1219–1227, 2008, doi: 10.1002/prot.21613.
- [86] N. Noinaj *et al.*, “Structural basis for iron piracy by pathogenic *Neisseria*”, *Nature*, vol. 483, núm. 7387, pp. 53–58, mar. 2012, doi: 10.1038/nature10823.
- [87] T. Daviter, C. M. Johnson, S. H. McLaughlin, y M. A. Williams, Eds., *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*, vol. 2263. en *Methods in Molecular Biology*, vol. 2263. New York, NY: Springer US, 2021. doi: 10.1007/978-1-0716-1197-5.
- [88] U. Śliwińska-Hill, “Spectroscopic studies of simultaneous binding of cyclophosphamide and imatinib mesylate to human holo-transferrin”, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 252, p. 119538, may 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119538.
- [89] M. Karimian Amroabadi, A. Taheri-Kafrani, L. Heidarpoor Saremi, y A. A. Rastegari, “Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and apo-human serum transferrin as a drug carrier protein”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 108, pp. 263–271, mar. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.179.
- [90] A. B. Biter, J. Pollet, W.-H. Chen, U. Strych, P. J. Hotez, y M. E. Bottazzi, “A method to probe protein structure from UV absorbance spectra”, *Anal. Biochem.*, vol. 587, p. 113450, dic. 2019, doi: 10.1016/j.ab.2019.113450.
- [91] R. Barbir *et al.*, “Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 13, núm. 23, pp. 27533–27547, jun. 2021, doi: 10.1021/acscami.1c04063.
- [92] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third edition, Corrected at 4. printing. New York, NY: Springer, 2010.
- [93] M. K. Grøftehaug, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, y E. Pohl, “Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI)”, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 71, núm. 1, pp. 36–44, ene. 2015, doi: 10.1107/S1399004714016617.
- [94] C. Elgert, A. Rühle, P. Sandner, y S. Behrends, “Thermal shift assay: Strengths and weaknesses of the method to investigate the ligand-induced thermostabilization of soluble guanylyl cyclase”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 181, p. 113065, mar. 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.113065.
- [95] N. Rosa, M. Ristic, S. A. Seabrook, D. Lovell, D. Lucent, y J. Newman, “Meltdown: A Tool to Help in the Interpretation of Thermal Melt Curves Acquired by Differential Scanning Fluorimetry”, *SLAS Discov.*, vol. 20, núm. 7, pp. 898–905, ago. 2015, doi: 10.1177/1087057115584059.
- [96] M. Redhead, R. Satchell, C. McCarthy, S. Pollack, y J. Unitt, “Thermal Shift as an Entropy-Driven Effect”, *Biochemistry*, vol. 56, núm. 47, pp. 6187–6199, nov. 2017, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00860.
- [97] D. M. Martin, N. D. Chasteen, y J. K. Grady, “Fluorescence and kinetic properties of Ru(III) (NH₃)₅ modified transferrin”, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol.*

- Enzymol.*, vol. 1076, núm. 2, pp. 252–258, ene. 1991, doi: 10.1016/0167-4838(91)90275-5.
- [98] S. M. Kelly, T. J. Jess, y N. C. Price, “How to study proteins by circular dichroism”, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1751, núm. 2, pp. 119–139, ago. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [99] J. Williams y K. Moreton, “The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum”, *Biochem. J.*, vol. 185, núm. 2, pp. 483–488, feb. 1980, doi: 10.1042/bj1850483.
- [100] A. D. Tinoco *et al.*, “Unusual Synergism of Transferrin and Citrate in the Regulation of Ti(IV) Speciation, Transport, and Toxicity”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, núm. 17, pp. 5659–5665, may 2016, doi: 10.1021/jacs.6b01966.
- [101] S. Indrakumar, A. Kulakova, P. Harris, y G. H. J. Peters, “Dynamics of Human Serum Transferrin in Varying Physicochemical Conditions Explored by Using Molecular Dynamics Simulations”, *Mol. Pharm.*, vol. 19, núm. 8, pp. 2795–2806, ago. 2022, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00158.
- [102] C. S. Allardyce y P. J. Dyson, “Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects”, p. 8.
- [103] M. Wang *et al.*, “Binding of ruthenium and osmium at non-iron sites of transferrin accounts for their iron-independent cellular uptake”, *J. Inorg. Biochem.*, vol. 234, p. 111885, sep. 2022, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111885.
- [104] F. C. Santos, P. J. Costa, M. H. Garcia, y T. S. Morais, “Binding of RuCp complexes with human apo-transferrin: fluorescence spectroscopy and molecular docking methods”, *BioMetals*, vol. 34, núm. 5, pp. 1029–1042, oct. 2021, doi: 10.1007/s10534-021-00325-w.
- [105] J. M. V. Del Pino, F. Scalambra, C. Bermejo-Casadesús, A. Massaguer, F. García-Maroto, y A. Romerosa, “Study of the biological activity of photoactive bipyridyl-Ru(II) complexes containing 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA)”, *J. Inorg. Biochem.*, vol. 246, p. 112291, sep. 2023, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112291.
- [106] J. Bravo, S. Bolaño, L. Gonsalvi, y M. Peruzzini, “Coordination chemistry of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) and derivatives. Part II. The quest for tailored ligands, complexes and related applications”, *Coord. Chem. Rev.*, vol. 254, núm. 5–6, pp. 555–607, mar. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.08.006.
- [107] F. Scalambra, M. Serrano-Ruiz, S. Nahim-Granados, y A. Romerosa, “Ruthenium Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane”, *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2016, núm. 10, pp. 1528–1540, abr. 2016, doi: 10.1002/ejic.201501357.
- [108] J. P. Emerson, V. H. Le, y E. A. Lewis, “Calorimetry”, en *Encyclopedia of Life Sciences*, 1a ed., Wiley, 2012. doi: 10.1002/9780470015902.a0003010.pub3.
- [109] B. Ibarra-Molero, A. N. Naganathan, J. M. Sanchez-Ruiz, y V. Muñoz, “Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry”, en *Methods in Enzymology*, vol. 567, Elsevier, 2016, pp. 281–318. doi: 10.1016/bs.mie.2015.08.027.
- [110] A. P. Turnbull y P. Emsley, “Studying Protein–Ligand Interactions Using X-Ray Crystallography”, en *Protein-Ligand Interactions*, vol. 1008, M. A. Williams y T. Daviter, Eds., en *Methods in Molecular Biology*, vol. 1008., Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 457–477. doi: 10.1007/978-1-62703-398-5_17.
- [111] S. Y. Ryu, I. H. Oh, S. J. Cho, S. A. Kim, y H. K. Song, “Enhancing Protein Crystallization under a Magnetic Field”, *Crystals*, vol. 10, núm. 9, Art. núm. 9, sep. 2020, doi: 10.3390/cryst10090821.
- [112] C. Pareja-Rivera *et al.*, “Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth”, *Cryst. Growth Des.*, vol. 17, núm. 1, pp. 135–145, ene. 2017, doi: 10.1021/acs.cgd.6b01362.

APÉNDICE 1. Perspectivas experimentales de cristalización accesorias: método *all-inclusive*

Más allá del alcance de este trabajo, con base en estudios que han demostrado que ciertos estímulos físicos externos, como los campos eléctricos y/o magnéticos pueden promover la nucleación y favorecer el crecimiento de los cristales bajo condiciones finamente controladas, como el método de contradifusión en geles en medios capilares [31], [33], se puso a prueba la estrategia de crecer cristales de transferrina con el método *all-inclusive* [36] que implica colocar el experimento de cristalización en un campo magnético aplicando pulsos en un patrón *breathing-like* (ver Figura A1B). En principio, la fuerza de magnetización del campo reduce la aceleración vertical, simulando un ambiente de microgravedad que disminuye la convección en la solución de cristalización; como se ha discutido anteriormente, eliminar las corrientes convectivas promueve que el proceso de nucleación se rija meramente por difusión, lo cual se ve reflejado en una disminución en su mosaicidad y un aumento en su resolución. No obstante, cabe recordar que cada proteína responde de manera diferente a un campo magnético y que entran en juego otros factores, como la preparación del experimento y el grupo espacial en el cual cristalizan [111], [112].

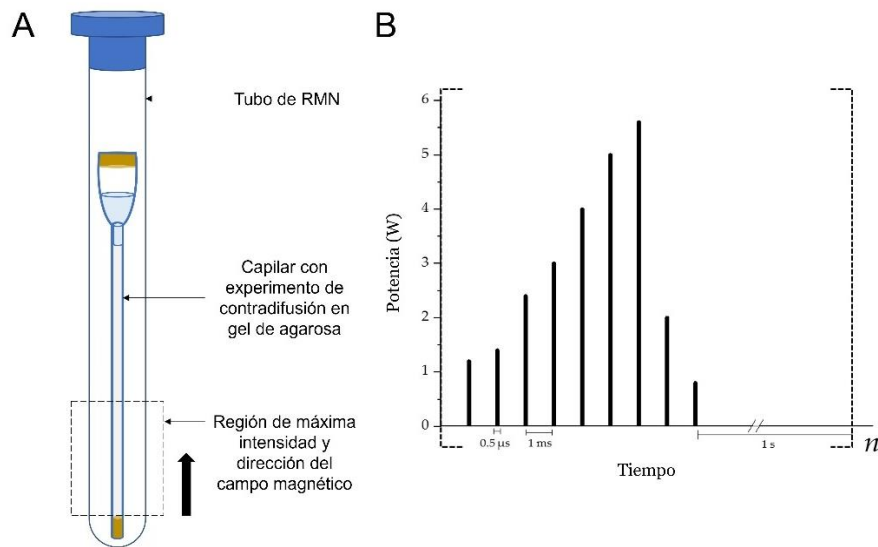


Figura A1. Experimento de cristalización con el método *all-inclusive*, que conjunta un experimento de contradifusión en geles en medios capilares (A) bajo la influencia de un campo magnético aplicando pulsos continuos con un patrón *breathing-like* (B) reportado en [36].

Para llevar a cabo el experimento con el método *all-inclusive*, se aplicó un campo magnético empleando un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker Avance III® de 400 MHz como fuente. Para ello, se colocó un capilar Lindemann de cuarzo dentro de un tubo para muestra de RMN. La muestra dentro del capilar consiste en holo-transferrina disuelta en solución a concentración inicial de 40 mg·ml⁻¹, a pH 5.5, dispersa en proporción 1:1 en gel de agarosa LM a concentración inicial de 0.3% (p/v), en contradifusión con un agente precipitante que consiste en 0.4 M citrato de amonio tribásico, 40% (p/v) PEG 3,350 ajustado a pH 5.5. La configuración del experimento se ilustra en la Figura A1A. El experimento se realizó a 18 °C, condiciones bajo las cuales es propicia la cristalización de la transferrina, aplicando pulsos continuos en un patrón *breathing-like* [36] ilustrado en la Figura A1B, durante aproximadamente 12 días y posteriormente dejando al campo magnético constante durante 12 días más. En paralelo, se mantuvo otro capilar como control a 18 °C. Los resultados se muestran y discuten a continuación.

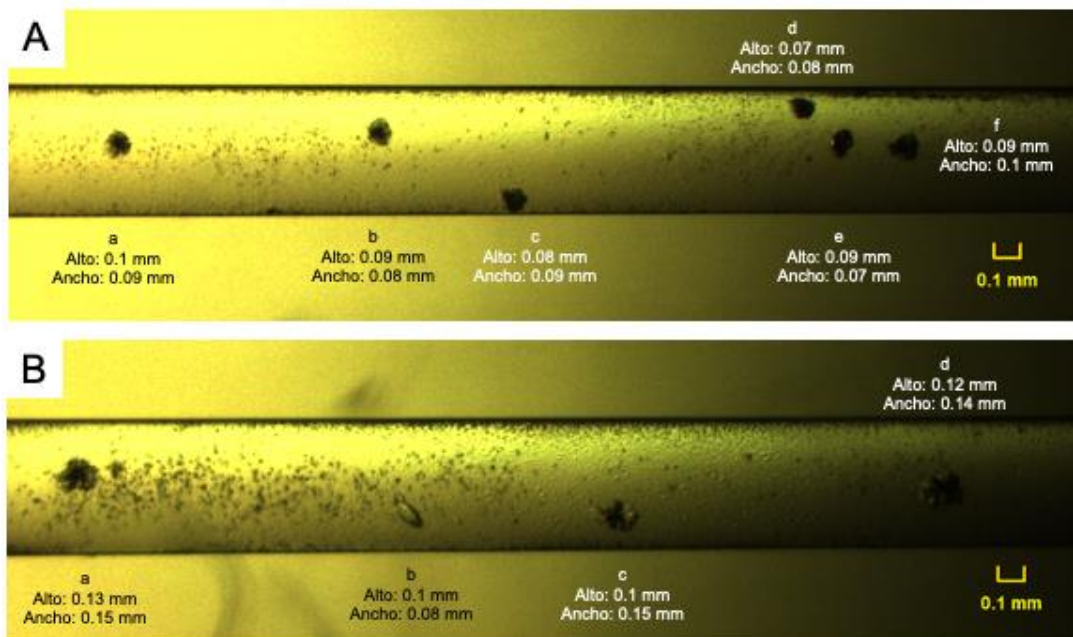


Figura A2. Cristales de holo-transferrina a pH 5.5 obtenidos mediante cristalización en contradifusión en gel de agarosa en capilares, en el transcurso de 3 semanas. Su morfología es similar a la observada en los cristales obtenidos mediante difusión en fase vapor. Aparentemente, la presencia del campo magnético (B) produce cristales de mayor magnitud con mejor definición en sus facetas, en comparación con el control (A).

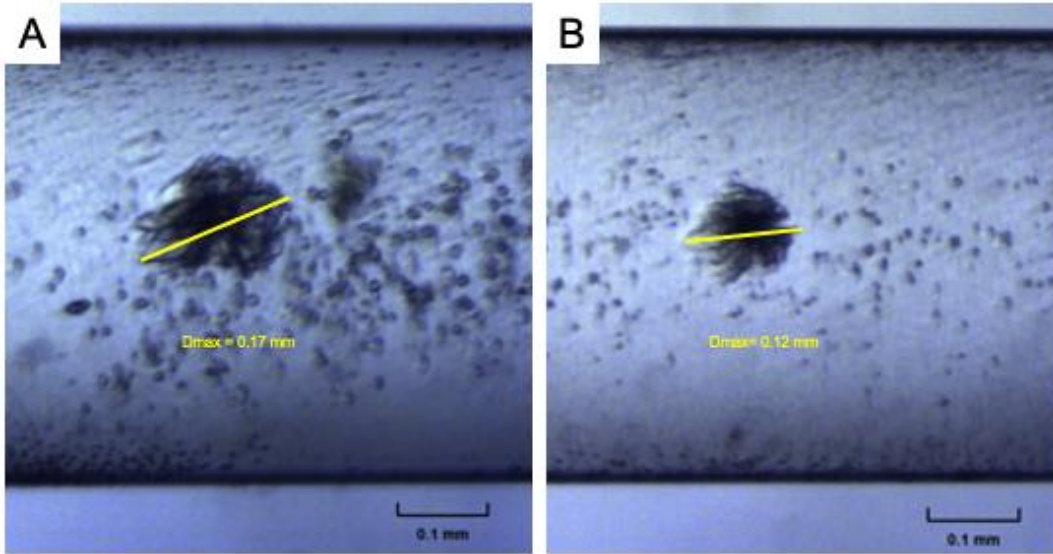


Figura A3. Comparación del tamaño, tomando como referencia el diámetro máximo, de un cristal de transferrina crecido a pH 5.5 en contradifusión bajo la influencia de un campo magnético (A) *versus* control (B).

Midiendo los cristales obtenidos como si fuesen partículas circulares en 2D, puede hacerse una comparación entre las circunferencias de éstos para observar la diferencia en el tamaño cuando los cristales crecieron dentro del campo magnético. El cristal de transferrina crecido en el campo magnético (Figura A3A) posee un diámetro—tomado como la distancia más larga entre los extremos y usando la escala como medida—de 0.17 mm y una circunferencia de 0.53 mm, mientras que aquellos del control (Figura A3B) son de 0.12 mm y 0.38 mm, respectivamente. Estas magnitudes permiten comparar el crecimiento relativo cuando los cristales se obtienen en presencia de un campo magnético (RMN), como se indica en la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Circunferencia}_{RMN} - \text{Circunferencia}_{Control}}{\text{Circunferencia}_{Control}} \times 100 = \text{Crecimiento relativo} \quad (\text{A1})$$

El crecimiento relativo entonces es de ~40%, tomando como ejemplo los cristales antes mencionados. Estos resultados son meramente ilustrativos del potencial que tiene esta estrategia para optimizar el crecimiento de los cristales de transferrina, ya que en la práctica, es poco accesible considerando el costo y el tiempo requerido para reproducir el experimento.

APÉNDICE 2. Glosario de términos

Afinamiento: proceso iterativo en el que se busca obtener la mayor concordancia entre los factores estructurales calculados y las amplitudes observadas.

Apagamiento (quenching): disminución de la intensidad de fluorescencia.

$CC_{1/2}$: coeficiente de correlación al comparar dos medios conjuntos de intensidades seleccionadas al azar.

Celda unitaria: elemento de volumen más simple y pequeño representativo del contenido de un cristal.

Completez: medida que indica la cobertura de todas las posibles reflexiones únicas teóricas dentro del conjunto de datos

Conformación: arreglo espacial de los átomos que constituyen a una proteína y que determina su forma general.

Convección: transferencia de calor en un líquido o gas como consecuencia del movimiento de las partículas que lo conforman

Cristal: arreglo tridimensional en el cual se ordenan muchas moléculas idénticas unidas mediante interacciones no covalentes.

Cristalización: fenómeno de transición de fase desde un estado líquido hacia un estado sólido, en el cual las moléculas se disponen en una red ordenada; proceso que parte de la nucleación.

Difracción: fenómeno de dispersión de un haz de radiación que atraviesa una estructura cristalina, que resulta en la división del haz originario en varios haces discretos que producen reflexiones sobre un detector.

Difusión: flujo de partículas de una región de alta concentración a otra de baja concentración de manera gradual, sin movimiento neto de materia

Dispersión: fenómeno físico que ocurre cuando un haz de radiación electromagnética atraviesa un material y se separa emitiéndose en diferente dirección, fase o longitud de onda.

Escalamiento: etapa del análisis cristalográfico en la que se comparan todas las reflexiones que fueron medidas del mismo índice de un cristal, provenientes de más de un bloque de datos, para ajustarlos a una misma escala, de manera que aquellas reflexiones que resulten idénticas tengan intensidades idénticas.

Factor B: también conocido como factor de temperatura o de desplazamiento térmico, describe qué tanto se mueve un átomo dentro de la posición definida en el modelo estructural.

Factor R: parámetro residual que evalúa la discrepancia entre los datos observados y los calculados, con valor entre 0 y 1 también representado como porcentaje. Combina el error inherente de los datos experimentales y la desviación del modelo de la realidad. Se espera un valor $< 20\%$ para un modelo bien afinado.

Factor R_{free} : parámetro residual calculado utilizando solo una porción de las reflexiones (usualmente 5%), empleado para validar el modelo. Si éste excede el factor R más de $\sim 7\%$, los datos podrían haber sido sobre interpretados.

Fluorescencia: fenómeno de luminiscencia (emisión de luz a partir de una sustancia) que se manifiesta cuando ocurre una transición entre estados de excitación electrónica

I/σ_I : indicador de calidad de datos cristalográficos que indica la proporción de señal *versus*

ruido, siendo I la intensidad de la reflexión y σ_I su error estimado. Un valor < 2.0 indica que la resolución real no es tan buena, mientras que un valor > 2.0 (pero no demasiado mayor) indica un corte de resolución adecuado.

Índices: valores numéricos que indican puntos para definir una posición en el espacio. En cristalografía de proteínas, se manejan como h, k, l .

Mosaicidad: propiedad del empaquetamiento cristalino que se manifiesta como un arreglo no uniforme de las celdas unitarias que conforman al cristal, las cuales se alinean de manera irregular, provocando huecos entre las uniones que disminuyen el orden del cristal.

Multiplicidad: también conocido como redundancia; parámetro que indica el número promedio de mediciones por reflexión única que poseen una misma intensidad, gracias a que la simetría del cristal produce reflexiones en posiciones e

intensidades equivalentes. Mientras mayor sea este valor, hay mayor precisión en la estimación de las intensidades de las reflexiones.

Nucleación: asociación inicial de cúmulos de moléculas de un soluto debido a regiones de alta concentración.

Ocupancia: parámetro incluido en el afinamiento que mide la fracción de moléculas en la cual un átomo ocupa una posición específica en el modelo. En el caso de conformaciones alternas, es posible observar diferentes valores de ocupancia de una misma cadena lateral en distintas regiones.

Reemplazo molecular: técnica que consiste en emplear una estructura conocida con determinada homología con la molécula bajo estudio, como modelo para obtener las fases necesarias para construir un modelo estructural a partir de reflexiones obtenidas experimentalmente.

Reflexión: producto de la difracción de un haz de radiación. En cristalografía de proteínas, se refiere a una onda que posee una longitud de onda, amplitud y fase características.

Reflexión única: conjunto de intensidades individuales de reflexiones equivalentes en simetría que contribuyen a una misma reflexión.

Resolución: en cristalografía de proteínas, se refiere al espaciamiento mínimo entre los planos de la red cristalina, medido como la distancia en la red recíproca entre una reflexión y el centro del patrón de difracción.

Unidad asimétrica: conjunto de moléculas más grande que no posee elementos de simetría, pero que puede ser yuxtapuesto en otras entidades idénticas empleando operaciones de simetría. En el caso de proteínas, la unidad asimétrica más simple consta de una sola molécula de proteína.

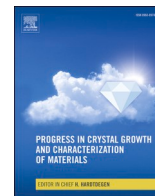
APÉNDICE 3. Artículos publicados

- Campos-Escamilla, C.; González-Ramírez, L.A.; Otálora, F.; Gavira, J.A.; Moreno, A. A short overview on practical techniques for protein crystallization and a new approach using low intensity electromagnetic fields. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* **2022**, 68, 1, 100559
- Campos-Escamilla, C.; Siliqi, D.; González-Ramírez, L.A.; López-Sánchez, C.; Gavira, J.A.; Moreno, A. X-ray characterization of conformational changes of human apo- and holo-transferrin. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 13392.
- Campos-Escamilla, C. Chapter seven – The role of transferrins and iron-related proteins in brain iron transport: applications to neurological diseases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **2021**, 123, 133-162.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pcrysgrow

Review

A short overview on practical techniques for protein crystallization and a new approach using low intensity electromagnetic fields

Camila Campos-Escamilla^a, Luis A. Gonzalez-Rámirez^b, Fermín Otálora^b, José Antonio Gavira^b, Abel Moreno^{a,b,*}

^a Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 5, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Laboratorio de Estudios Cristalográficos, C.S.I.C. Universidad de Granada, Armilla, Granada, España



ARTICLE INFO

Keywords:

Conventional methods of protein crystallization
Microseeding
Molecularly imprinted polymers (MIPs)
Counter-diffusion
Low intensity electric field
Low intensity magnetic field

ABSTRACT

This contribution deals with a practical overview of some popular and sophisticated crystallization methods that help increase the success rate of a crystallization project and introduces a newly developed method involving low intensity electromagnetic fields. Aiming to suggest a methodology to follow, the present contribution is divided into two main parts in a logical order to get the best crystals for high resolution X-ray crystallographic analysis. The first part starts with a short review of the chemical and physical fundamentals of each crystallization method through different strategies based on physicochemical approaches. Then, practical non-conventional techniques for protein crystallization are presented, not only for growing protein crystals, but also for controlling the size and number of crystals. These include crystal growth in gels, counter-diffusion, seeding, and macromolecular imprinted polymers (MIPs). The second part shows the effects of coupling low intensity electric fields (in the scale of units of μ Amperes) with weak magnetic fields (in the scale of milli Tesla) applied to protein crystallization. This approach consists of a novel experimental set up, which was used to study the influence of the coupled fields on the crystallization of lysozyme in solution and in gel media. This new approach is based on the classical theories of transport phenomena and offers a more accessible strategy to obtain suitable crystals for X-ray characterization or Neutron diffraction investigations.

1. Introduction

Throughout the years, structural determination of biological macromolecules and their macromolecular complexes has been developed primarily by X-ray-based techniques, being X-ray crystallography the most widely used. With the increasing availability of synchrotron radiation facilities, X-ray analysis remains the most powerful method to obtain 3D structures of macromolecules, independently of their molecular weight. However, it requires well-structured single crystals for high resolution data collection, and one must keep in mind that having beautiful crystals does not necessarily mean that they will diffract X-rays to high resolution [1,2].

Nowadays, the obtainment of the 3D structural model of any biomolecule in the direct/indirect space has come true, by either using Cryogenic Electron Microscopy (Cryo-EM, direct space) or X-ray free electron lasers (indirect space) to get the structure in solution using a highly pure biomacromolecular complex [3–5]. Besides these

techniques for obtaining the 3D structure of a variety of proteins, the mechanism of aggregation/nucleation, crystallization, and crystal growth are sources of physical and chemical information needed to understand most biological mechanisms. The predictions of crystal nucleation based on the classical theories of crystal growth have been published elsewhere [6]. Only few publications have dealt with the strategies based on physicochemical approaches for increasing the crystal quality and the criteria to analyze the X-ray data, as the majority of the publications have been focused on protein molecules, though the principle can be applied to other biological macromolecules (DNA, RNA, polysaccharides, and macromolecular complexes). Nowadays, it is becoming well known that the most adequate techniques to estimate the crystal quality are those that employ X-ray topography to obtain the rocking curves [7–11].

In the first part of this contribution, we illustrate some of the non-conventional crystallization techniques designed for growing and optimizing high-quality crystals, applied to human serum transferrin (Tf), to

* Corresponding author.

E-mail address: carcamo@unam.mx (A. Moreno).

<https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2022.100559>

Available online 10 February 2022

0960-8974/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

study their efficacy on a protein other than the usual model proteins employed for testing crystallization methods. Transferrins are a group of glycoproteins found in several organisms whose main function is to transport iron for its utilization in different cells. Tf, also known as serotransferrin, is the main iron transport protein involved in iron homeostasis [12], and therefore represents an important protein to study.

The second part of this contribution presents a new strategy that concerns the use of electric and magnetic fields, applied to lysozyme crystallization, either in solution or in gel media, to standardize the methodology. All these approaches were based on the classical theories of transport phenomena, where the diffusion control is imposed to lead the system to produce controlled gradients of mass and heat along the crystallization processes. To date, there is very little research on the effects of low intensity electric and magnetic fields on protein crystallization, as most of the efforts have been concentrated on those of the strong magnetic fields (ranging from 10 to 16 Tesla) as well as different types of electric fields (direct current, DC; alternating current, AC) on the crystal nucleation and the crystal growth of different kinds of proteins. These electromagnetic fields have been used so far to control either the crystal orientation or its size; however, they have also been used to increase the crystal quality when using either an in-house X-ray diffractometer or synchrotron radiation facilities. Though the magnetic fields are usually related to the orientation of crystals, they have also been effective in the growth of certain faces of the euhedral crystals mostly related to the c-axis, which is orientated in the direction of the magnetic force.

The aim of this contribution is to show how the number and size of crystals, as well as their nucleation, can be feasibly controlled by using practical conventional methods of crystal growth and non-conventional ones such as those using low intensity electromagnetic fields. The latter shows a novel experimental set up, which has never been published before.

2. Fundamentals of conventional crystallization methods

Protein crystal growth occurs under very specific conditions once a

metastable equilibrium is reached in supersaturation by mass transport processes [13]. This may only happen after the most important step, nucleation. From a thermodynamic point of view, nucleation represents a phase transition from a disordered to an ordered state, as the rearrangement of the molecules toward the phase transition produces entropy changes both in the forming crystal nucleus and the surrounding solution [14,15]. Along with the high crystallization enthalpy, an overall Gibbs free energy is obtained, which promotes crystal growth [15,16]. It should be noted that reaching the metastable zone is not trivial, as every protein follows a different path and not every method will be able to overcome intrinsic properties of the macromolecule that might complicate the crystallization process. Depending on the crystallization method, it is possible to explore or even avoid different zones of the phase diagram, as several parameters may be adjusted according to the crystallographer's particular needs (Fig. 1). On the other hand, crystal growth is a coupled process of five main contributions: 1) fluid dynamics, 2) heat and mass transfer, 3) surface kinetics, 4) morphology and phase changes, and 5) chemical reactions.

The energetics of the whole crystallization process is shown by Eq. (1) as Kashchiev and van Rosmalen suggested [6].

$$\Delta\mu = \mu_s - \mu_c \quad (1)$$

where μ_s and μ_c are the chemical potentials of a molecule in the solution and in the bulk of the crystal phase, respectively. We must remember that the chemical potential goes from the higher values to the minor ones. When $\Delta\mu > 0$, the solution is supersaturated, and only then is nucleation and/or crystal growth possible. The solution is, respectively, saturated or under-saturated when $\mu_s - \mu_c = 0$ or $\Delta\mu < 0$.

The driving force for the crystallization process is the difference in the chemical potential [6]:

$$\Delta\mu = k T \ln \beta \quad (2)$$

where k is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, and $\beta = C / C_e$ indicates supersaturation, i.e. the ratio of actual solute concentration (more precisely the activity) divided by the concentration (or activity) at the equilibrium.

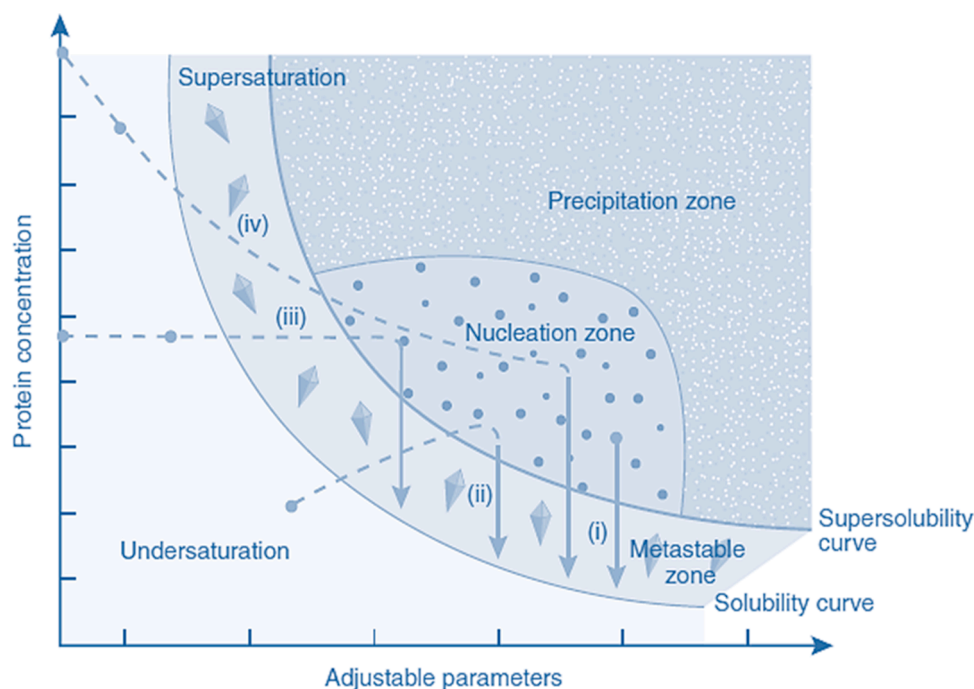


Fig. 1. General scheme of a protein crystallization phase diagram and solubility curve. Adjustable parameters include precipitant concentration, temperature, pH, etc. Some main conventional crystallization methods are presented along different regions of the metastable zone, namely, microbatch (i), vapor diffusion (ii), dialysis (iii) and free interface diffusion (iv) [17]. Copyright permission License No. 5,194,330,651,873.

The work $W(n)$ to form a cluster of $n = 1, 2, 3 \dots$ molecules can be obtained by thermodynamic considerations:

$$W(n) = -n\Delta\mu + \Phi(n) \quad (3)$$

where $\Phi(n)$ represents the effective excess energy of the cluster, while $\Delta\mu$ is given by Eq. (2).

According to the classical nucleation theory, $\Phi(n)$ is merely equal to the cluster total surface energy, $\gamma A_c(n)$, where γ (in $J m^{-2}$) is the specific surface energy of the cluster/solution interface, and $A_c(n) = (36\pi\nu_o^2)^{1/3} n^{2/3}$ is the area of the cluster surface. In this case, ν_o (cm^3) is the volume occupied by a molecule in the cluster [6].

$$W(n) = -nkT \ln\beta + (36\pi\nu_o^2)^{1/3} \gamma n^{2/3} \quad (4)$$

$$\gamma = B\lambda/\nu_o^{2/3} \quad (5)$$

In this equation, B is a numerical factor (ranging from ≈ 0.2 to 0.6); this value is approximately equal to 0.514 for spherical clusters, and λ (n) is the molecular heat of dissolution [6]. The parameter ν_o is the specific volume of the protein (estimated from $\nu_o = M_r/\rho N_A$, with ρ the density of the crystal ($g cm^{-3}$), N_A is the Avogadro number and M_r is the molecular mass of the protein ($g mol^{-1}$)).

This implies that γ is proportional to the $\ln C_e$ and indeed is the case, since λ and C_e (solubility) are related by $C_e = (1/\nu_o)\exp(-\lambda/kT)$ as described by Moelwyn-Hughes (see reference (14) cited in [6]). This way, the surface energy, γ , can be easily derived from the revised Stefan-Skapski-Turnbull formula [6]:

$$\gamma = B[-kT \ln(C_e \nu_o)]/\nu_o^{2/3} \quad (6)$$

So that:

$$\lambda = -kT \ln(C_e \nu_o) \quad (7)$$

For the crystallization process, we have the global equation, where we can plot ΔG versus size of the critical nucleus r based on Eq. (8).

$$\Delta G = -[(4/3)\pi r^3/\Omega]kT \ln\beta + 4\pi r^2\gamma \quad (8)$$

In general, at the metastable zone there is a competition between volume forces and surface forces. To understand the process of the formation of the critical nucleus, the idea based on Eq. (8) is to reach a highly stable nucleus that will surpass the critical size and will produce a negative value of ΔG to allow the system to be spontaneous. From this equation, r represents the size of the nucleus, Ω is the volume of the crystal unit cell, k is the Boltzmann's constant, T the temperature, β is the saturation (it is defined by $\beta = C/C_e$ or $\alpha = [(C-C_e)/C_e]$), and γ is the surface energy.

The initial crystal growth of macromolecules, that is, finding the initial set of crystallization conditions, is usually performed by conventional methods such as vapor diffusion and microbatch crystallization.

2.1. Vapor diffusion

Vapor diffusion follows the principle of chemical equilibrium at supersaturation between two solutions in a vapor phase. The droplet that contains the protein and the precipitant solution increases its concentration by equilibrating water or other volatile components from the droplet in the vapor phase with the reservoir solution in an enclosed system. There are two main setups for vapor diffusion, hanging drop and sitting drop [14]. Both setups yield similar results, although it has been shown that a hanging drop setup is more favorable as there is less contact with the surface of the crystallization plate, having the crystallization drop in a liquid/air interface instead of a liquid/solid interface that might contaminate the solution and/or alter nucleation [18] and facilitate crystal fishing for X-ray characterization.

2.2. Microbatch and microfluidic experiments

Microbatch crystallization is a preferred technique once the proportions of protein and precipitant solution are known, since this method consists of mixing both solutions directly and yields results faster [19]. The crystallization drop is protected from evaporation by covering it with low-density paraffin oil, ensuring that the initial concentration at the beginning of the experiment remains the same, as it is already the final concentration for crystal growth. The advantage that this method offers is that a supersaturation condition is created immediately; however, reaching this condition usually requires a series of trials and fine-tuning of crystallization conditions [14]. Although the procedure may seem simple, the mixing of the solutions must be performed in a controlled manner, as differences in density and diffusion coefficients at the mixing front determine the stability of the system [13].

On the other hand, there are methods based on microfluidics; this crystallization technique combines small volume crystallization droplets (protein, precipitating agents, and buffer solutions) sequentially injected by high-precision pumps [20]. Microfluidic systems present either a low Grashof number (revised in Section 4 related to crystal growth in gels and counter diffusion methods), or absence of convection due to a density gradient [13]. For this technique, most authors have observed lesser times of equilibrium and growth of crystals. However, some disadvantages include possible permeability of the elastic connections if the microfluidic chip is not properly sealed, and difficulty at implementing optimization, as it starts with previously mixed solutions (stocks) [20]. Nonetheless, it is feasible to incorporate a chip of this type to prepare solutions and to couple it in series. Recently, many proteins have been crystallized by using new chips and smart experimental approaches for microfluidics using graphene and nanotubes. Even these chips have reached the size of centimeters, where thousands of crystallization conditions can be tested. Miniaturization has been the final aim of this type of research [21].

3. Approaches for controlling crystal size and nucleation

3.1. Microseeding

Broadly speaking, seeding consists of taking existing crystals to improve crystal growth under new conditions, by several methods that explore different setups. Particularly, microseeding involves creating a stock suspension of microcrystals previously stabilized, usually obtained from crushing larger crystals, followed by performing serial dilutions of the seed stock which are later added to a pre-equilibrated fresh crystallization drop [22]. A method was developed for reproducing an entire set of conditions, called matrix microseeding [23]; however, microseeding may also be done in a random scheme [24]. Either strategy is an excellent resource for optimization of crystallization conditions, as it has shown to yield higherquality crystals (Fig. 2).

Microseeding has proven to be a broadly useful tool to improve crystals needed for different structural determination techniques and samples. From microcrystals for serial femtosecond crystallographic studies by X-ray free-electron laser (XFEL) radiation, which allows the study of microcrystals in ultra-quick radiation times [25,26], to large crystals around $1 mm^3$ in volume for neutron protein crystallography (NPX) [27,28], as well as for the crystallization of membrane proteins, which are usually challenging due to their hydrophobic properties [29], the applications of this method are various and valuable.

3.2. Molecularly imprinted polymers (MIPs)

Conventional methods rely on reaching supersaturation to grow crystals from crystal nuclei. However, if this occurs excessively quickly, we can expect several pitfalls, such as structural defects, polycrystalline growth, premature cessation of growth, etc.

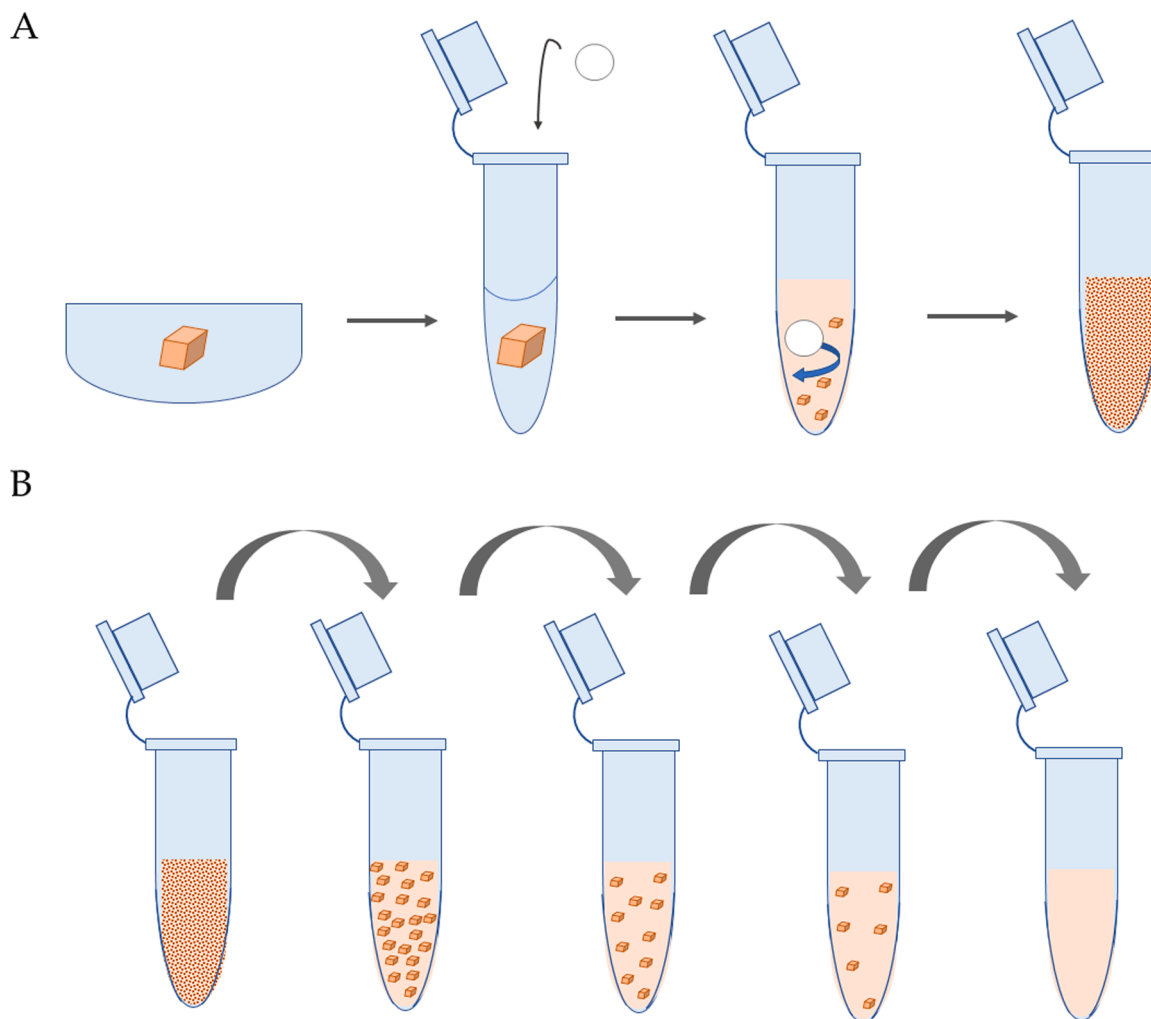


Fig. 2. Schematic representation of seed obtaining for microseeding. **A.** Creation of a seed suspension from an existing protein crystal through its crushing with a bead and vortex agitation. **B.** Dilution series of the initial seed stock.

Control of nucleation has been explored by performing crystallization of proteins within porous materials [30], some of them even customized with the shape of the protein itself. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs, Fig. 3) are smart materials that are polymerized in the presence of the molecule of interest, which acts as a template. Upon polymerization, the protein is removed, leaving cavities behind that will be useful for proteins to use as nucleation sites in future crystallization experiments. The protein should be removed because the MIP will be used in powder (as nucleant), otherwise, the protein inside the porous could be denatured therefore turning itself into a contaminating substance. This technique thus focuses on promoting crystal growth from a metastable solution by inducing nucleation-inducing substrates, or nucleants. Once crystals grow to a certain size, they either disengage from the MIP surface towards the surrounding solution, or may be removed manually with microtools to mount them for the diffraction experiments [30,31].

4. Crystal growth in gels and counter-diffusion

Considering the importance of mass transport in reaching supersaturation for protein crystal growth, a diffusive process is preferred to ensure more control and stability [13]. This condition may be reached through microgravity, or, more accessibly, with the use of a gel which allows for a gradual, controlled diffusion until equilibrium at supersaturation is reached [32,33]. Gels, namely physical gels, provide a

chemically inert three-dimensional network in which crystals are held for their nucleation and growth, as this network consists of pores that act as nucleation cells. This prevents damage due to contact with the solid surface of the container walls or bottom, and promotes a controlled mass transport led by diffusion and not convection [34]. Gels also provide a medium in which additives may be incorporated in a gradual manner, to keep the system as stable as possible with the possibility of exploring new conditions. Agarose gel is one of the most used media for crystal growth, as it offers certain advantages over other gels, such as controlling and tailoring crystal size by adjusting the concentration used [35], studying protein crystal polymorphism, and even the possibility of predicting the crystallization outcome [36]. A thorough review on gels used for protein crystallization has already been made [37], so this topic will not be discussed further here; rather, it is worth mentioning that the possibilities are broad and in constant development, for example, using functionalized gels for protein crystallization [38].

The counter diffusion technique is based on the principle of mass transport governed by diffusion, which provides a homogenous distribution of supersaturation in the crystallization solution, allowing molecules to find more favorable positions within the crystal lattice, and therefore resulting in a stable crystal [13,39]. Diffusion is promoted by reducing convective mass transport, which implies diminishing the value of the Grashof number (Gr_N). Gr_N describes the relative effect of buoyancy and viscous drag force in a fluid and is given by:

$$Gr_N = L^3 \beta_1 \Delta c g v^{-2}$$

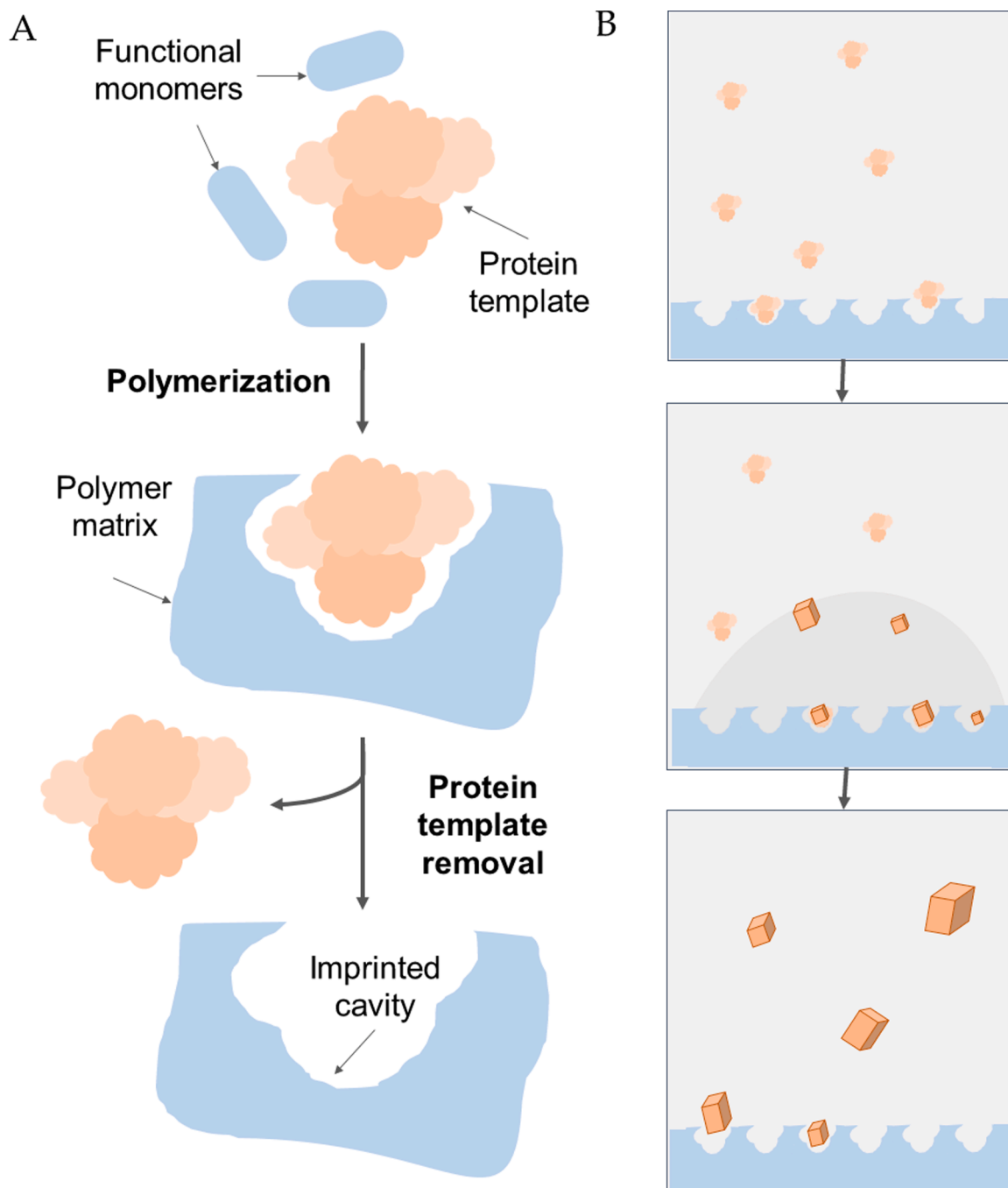


Fig. 3. Molecularly imprinted polymers (MIPs). **A.** Functional monomers interact chemically with the protein used as a template molecule. After polymerization with a crosslinker, the template remains “trapped” within, but is removable by elution of the protein, leaving a cavity behind. **B.** The cavities formed in the MIP aid mass transfer of the template protein, serving as nucleation sites from which crystals grow. This figure was conceptually based on [31].

Where L is the thickness of the cell (cm), Δc is the concentration difference, β_{1i} is the ratio of change in density to change in concentration, and ν is the kinematic viscosity (cm^2/s). One way to reduce the Grashof number is reducing L , and this can be facilitated by performing the experiment within capillary volumes; therefore, capillary tubes are used for counter diffusion experiments due to their elongated shape and, especially, their definite diameter, which provides a restricted space in which convection is reduced and crystals may grow throughout its internal surface area [40]. Crystal nucleation and growth occur once the precipitating agent meets the protein solution at the liquid-liquid interface and a supersaturation gradient is formed. Convective mass transport may be further reduced by adding a gelled medium, as it

further reduces L by reducing the size of the container to the size of the pore of the gel [13,40]. One of the advantages of counter-diffusion over conventional methods is that it facilitates screening of various conditions within the same experiment, thanks to the differences between the diffusion coefficients of the components of the precipitating agent. Besides being practical, it is efficient because it requires a small amount of protein solution [41].

Recent developments involve juxtaposing two or more non-conventional methods, such as counter-diffusion and dialysis, for example [42]. This allows to explore more than one approach in the hopes of getting the best of both. Fig. 4 illustrates a setup that involves counter-diffusion in capillary using agarose gel for boosting the

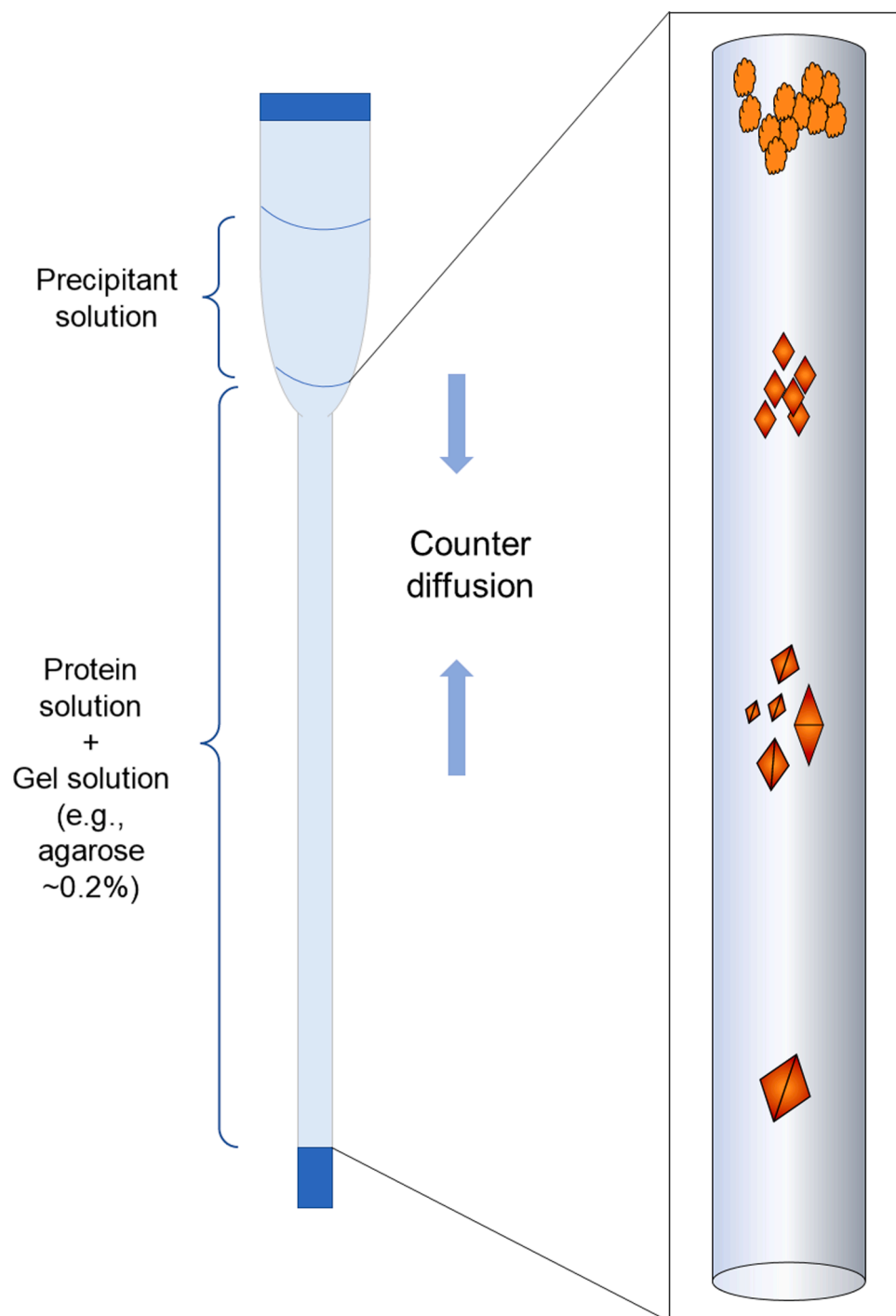


Fig. 4. Counter-diffusion in a crystal growth in gel in capillary method. A supersaturation gradient is created throughout the capillary tube, allowing crystals to grow gradually thanks to an exclusively diffusive regime within the capillary.

probabilities of achieving a successful crystallization experiment.

5. Methods applied to human serum transferrin

Human serum transferrin (Tf), also known as serotransferrin, is a ~80 kDa glycoprotein that transits the blood plasma, whose function is to transport iron from its absorption site towards every cell through the blood vessels. Its structure consists of two homologous lobes, an N-terminal lobe and a C-terminal lobe, each subdivided into two domains, in between which is found a metal-binding site, thus allowing Tf to bind 2 ferric ions per molecule [43,44]. Transferrin completes a cycle in which

it transits the bloodstream as holo-Tf (iron-loaded form) and binds to the transferrin receptor (TfR) expressed on endothelial cells. The Tf-TfR complex formed is internalized in endosomes, where the pH is more acid (5.5) than in the bloodstream (7.4); this pH decrease promotes a conformational change that induces iron release from the metal binding site of transferrin. Following iron release, apo-Tf (iron-free form) is detached from the TfR and recycled to the bloodstream, where it captures more ferric iron [45,46]. Two important factors to consider when crystallizing transferrin are its great conformational flexibility and that its mechanism of iron release is pH-dependent [44,45,47,48].

5.1. Transferrin purification

Human serum transferrin was commercially obtained (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in both its iron free (apo) and iron loaded (holo) forms. The same conditions were used for purifying both. The proteins were suspended in a buffer containing 50 mM TRIS-HCl pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and filtered through a 0.22 μm pore. The purification was made by ion exchange chromatography in a HiTrap Q HP 5 mL column using a linear gradient from 0 to 100% high salt buffer (50 mM TRIS-HCl pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and 1.0 M NaCl). After elution, apo and holo-Tf were dialyzed against 15 mM HEPES pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and 50 mM NaCl using a 6–8 kDa MWCO membrane, at 4 °C for 2 h, then other 2 h with fresh buffer, and finally overnight with fresh buffer. Finally, apo and holo were concentrated by centrifugation in Amicon tubes at 3000 x g in 15 min-cycles at 4 °C.

5.2. Transferrin crystallization using counter-diffusion methods

Transferrin crystals were grown from commercially obtained human serum transferrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a stock concentration of 20 mg mL⁻¹ using Index screen #88 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) condition as precipitant solution, which consists of 0.2 M ammonium citrate tribasic, pH 7, and 20% PEG 3350. Crystals were grown at 18 °C by the vapor diffusion method as previously standardized [49].

For the optimization of transferrin crystal growth, counter-diffusion in capillaries in agarose gel was used. This method was performed using 0.2% w/v stock solution of agarose in a 1:1 proportion with 40 mg mL⁻¹ stock solution of transferrin. This mixture was introduced in Lindemann glass tubes by capillary forces up to the start of the funnel end. Afterwards, the precipitant stock solution consisting of 0.4 M ammonium citrate dibasic, pH 7, and 40% w/v polyethylene glycol (PEG) 3350 was added at the top of the funnel and both ends of the tube were sealed (Fig. 5).

When crystallizing holo-transferrin in the vapor-diffusion set up we noticed that crystals were transparent. This behavior was particularly interesting because when analyzing X-ray data from the synchrotron facilities; it seems to be that the crystals lost their iron (Fig. 6).

As may be seen from Fig. 5, apo-transferrin crystals grown by the counter-diffusion method show uniformity in their optical properties, as well as a uniform shape, being Figures E and F the best results in terms of

shape and crystal quality. Besides this beauty of the crystals obtained by counter-diffusion methods, these crystals were slightly better in the diffraction patterns than those obtained in droplets by hanging-drop or sitting-drop methods. We have recently published the structure of apo transferrin combining classic crystallography and Small Angle X-ray Scattering (SAXS) [50]. The crystallographic work did show that the existence of sugars, i.e. glycosylation, surrounding the 3D structure of amino acids inhibited the high resolution of apo transferrin crystals. This is a perfect example to see that we can improve the physics of crystal growth, but we cannot overcome the chemical bonding related to the packing of the 3D structure. However, SAXS gave us the final answer to see the flexible chains as a function of some important pH variations. Therefore, nowadays there is not any single powerful technique to solve biological problems all in all. Even if we can improve the results, the chemical bonding and the chemical properties of the solutions are very important intrinsic items to consider.

6. A new approach using low intensity electromagnetic fields applied to the crystallization of lysozyme

The methods reviewed in this contribution have proven to be excellent tools for optimizing crystal growth for the structural determination of several macromolecular systems. Some studies have considered the thermodynamic fluctuations in crystallization systems subjected to electric fields, namely the change in the Gibbs free energy, as it determines the stability of the phases during crystal nucleation. Briefly, electric fields tend to reduce the critical radius as well as the system's Gibbs free energy, leading to a higher nucleation rate [51]. However, the effect of electromagnetic fields of low intensity focused on the nucleation and on protein crystallization processes have been scarcely explored so far [52–58].

Based on Eqs. (1) and (2), the total difference in the chemical potential is given by

$$\Delta\mu^{\text{Total}} = [\Delta\mu^{\text{solution}} - \Delta\mu^{\text{crystal}}] + \Delta\mu_{\text{electric}} + \Delta\mu_{\text{magnetic}} \quad (9)$$

This chemical potential has a contribution of both electric and magnetic fields. Both are also directly proportional to the temperature and supersaturation values.

$$\Delta\mu^{\text{Total}} = [\Delta\mu^{\text{solution}} - \Delta\mu^{\text{crystal}}] + [\Delta W^{\text{solution}}(\text{electric}) + \Delta W^{\text{crystal}}(\text{electric})] + [\Delta W^{\text{solution}}(\text{magnetic}) + \Delta W^{\text{crystal}}(\text{magnetic})]$$

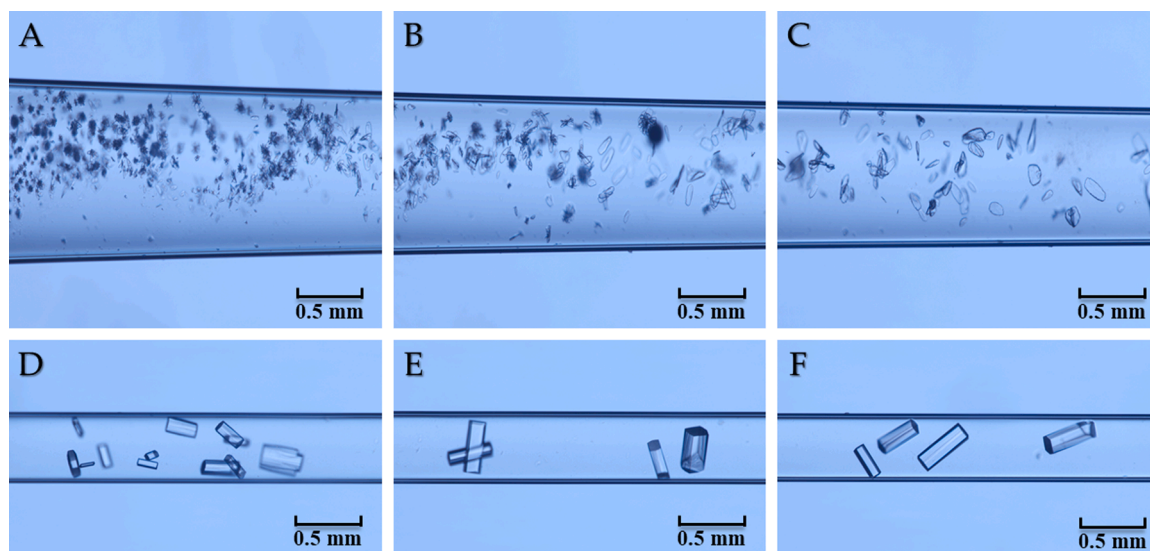


Fig. 5. Apo-Tf crystals grown in agarose gel inside capillary tubes by the counter-diffusion method. A-F apo-Tf crystals along the capillary tube, showing characteristic improvement of the visual crystal quality. A to C Apo-Tf crystals seen in a supersaturated area of the capillary tube. D and F Apo-Tf crystals in the best supersaturation values (middle part of the capillary to the lower part). Particularly, (E and F) Apo Tf crystals are in the lower part of the capillary tube.

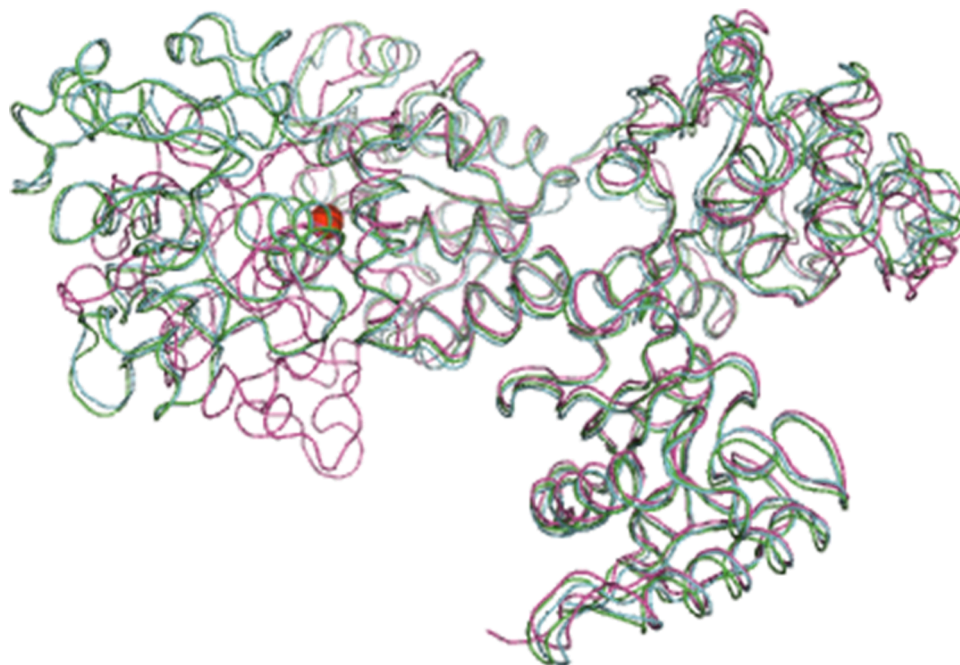


Fig. 6. Visualization of overlapped apo-Tf and holo-Tf structural models with a reported structure (light blue, apo Tf; green, holo-Tf; magenta, PDB 4H0W; red sphere, iron). The misfit of the models shows that the iron is lost during the crystallization process and therefore our holo-Tf doesn't fit 4H0W holo-Tf, but in reality, became apo-Tf.

Therefore, to understand the effects of low intensity electromagnetic fields, we have developed a new methodology applying low intensity electromagnetic fields based on the solubility curve of lysozyme to work on the regime of lower values of supersaturation that could be extended to any other biological macromolecule to grow crystals and control their size. This novel strategy has used low intensity devices and concerning the magnet, we have explored the Levitron®, a magnetic toy commercially available. This magnet supplies a permanent magnetic force of 20 milli Tesla. The physics and the simple theory of this magnet has been published in the 90s [59]. The magnet consists of a small spinning magnetic top and a donut-shaped magnetic base covered in wood. This magnetic top presents a stable levitation because of unique coupling of magnetic forces and torques with the gyroscopic action of the top. However, this top can be stabilized by fixing it with copper cords to use the magnetic force for additional investigations. The characteristics of the Levitron® have been also reviewed elsewhere [60].

6.1. Protein concentration and preparation

Lysozyme, the most popular enzyme for protein crystallization experiments, was used to standardize the technique (Sigma L6876). All chemicals were analytical grade. Lysozyme was prepared in concentrations of 60 mg/mL, 80 mg/mL (when mixing 1:1 in solution), and 120 mg/mL (for 1:1:1 in gels) as stock solutions. The gel was prepared 0.3% w/v as stock solution to gel a final concentration 0.1% w/v (when mixing 1:1:1). These stock concentrations were prepared in sodium acetate buffer to reach a final concentration of 50 mM and pH 4.5. The protein concentration was measured using an UV-VIS Spectrometer (Varian model Cary E10) to check the correct analytical concentration. The precipitating agent (NaCl) was prepared in 100 mM acetate buffer 50 mM pH 4.5 at different concentrations: 60 mg/mL, 80 mg/mL (when mixing 1:1 in solution) and 120 mg/mL (when mixing 1:1:1 for the gel case) to get the final concentration of 30 or 40 mg/mL for NaCl and the gel 0.1% w/v in all cases.

The experiments were prepared with the following final concentration: 30 mg/mL lysozyme + 40 mg/mL NaCl, as well as 40 mg/mL + 40 mg/mL final concentrations of both protein and precipitating agent

respectively. Both conditions were prepared with/without gel at 0.1% (w/v).

6.2. Experimental setup and growth cell

The growth cell was based on a previous design published elsewhere [61], and the batch method was used, where the protein and the precipitant were carefully mixed in the region of low supersaturation. The growth cell consisted of placing two antiparallel plates of ITO electrodes (ITO stands for Indium Tin Oxide) displaced 0.5 cm from one another to connect the current alligators for the cathode and anode, sandwiching a rubber frame with 0.15 cm of thickness. A low temperature melting silicon was used to close the cell to avoid solution leaking. Inset in Fig. 7A shows the front and lateral views of this cell and its dimensions. The cell was filled with the mixture of protein and precipitant in a 1:1 ratio, or 1:1:1 ratio in the case of gel growth. For the electric field experiments (Fig. 7A), the cell was connected to the Potentiostat/Galvanostat to apply a direct current of 10 micro-Amperes. For the magnetic field experiments (Fig. 7B), the cell was located on the sample holder, levitating above a permanent donut-shaped magnet of 20 milli Tesla (Levitron®) and stabilized with copper stripes. For the electric and magnetic fields experiments (Fig. 7C—airial view, and 7D—side view), the cell was connected to both the Potentiostat/Galvanostat, providing the electric field, and the magnet, providing the magnetic field; copper stripes were used to stabilize the sample holder, producing an anti-vibration system, and helping to connect the growth cell to the Potentiostat/Galvanostat.

6.3. The solubility plot of lysozyme

The solubility plot was based on a morphogram obtained from the experimental observations where the crystals or precipitates appeared along the experiments. All experiments were performed at 20 °C. The most promising results in terms of number of crystal and waiting time were obtained at concentrations of 40 mg/mL and 30 mg/mL of lysozyme. As shown in Fig. 8, from a further optimization condition using 4% (w/v) NaCl (i.e. 40 mg/ml) and 40 and 30 mg/ml of lysozyme (the

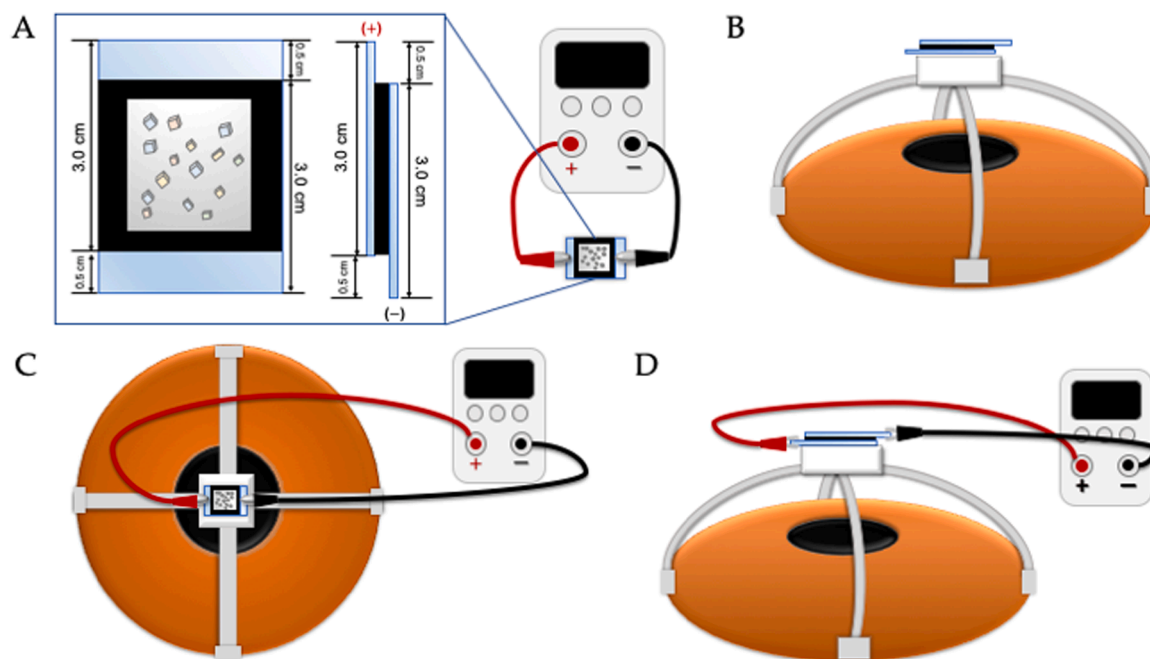


Fig. 7. Experimental setup for electric, magnetic, and electromagnetic field-assisted protein crystallization. (A) For the electric field experiments, two antiparallel ITO electrode plates sandwich the growth cell (see insets for dimensions and design) and are connected to a potentiostat/galvanostat by red (anode) and black (cathode) alligators. (B) For the magnetic field experiments, the growth cell is located on the sample holder (white), which levitates above the donut-shaped magnet (orange) that provides the magnetic field. Copper stripes (gray) are used for stabilizing the sample holder. (C) Aerial view and (D) side view of the low-intensity electromagnetic field experimental setup. The growth cell, located on the sample holder, is both levitating above the magnet (stabilized by the copper stripes) and connected to the potentiostat/galvanostat.

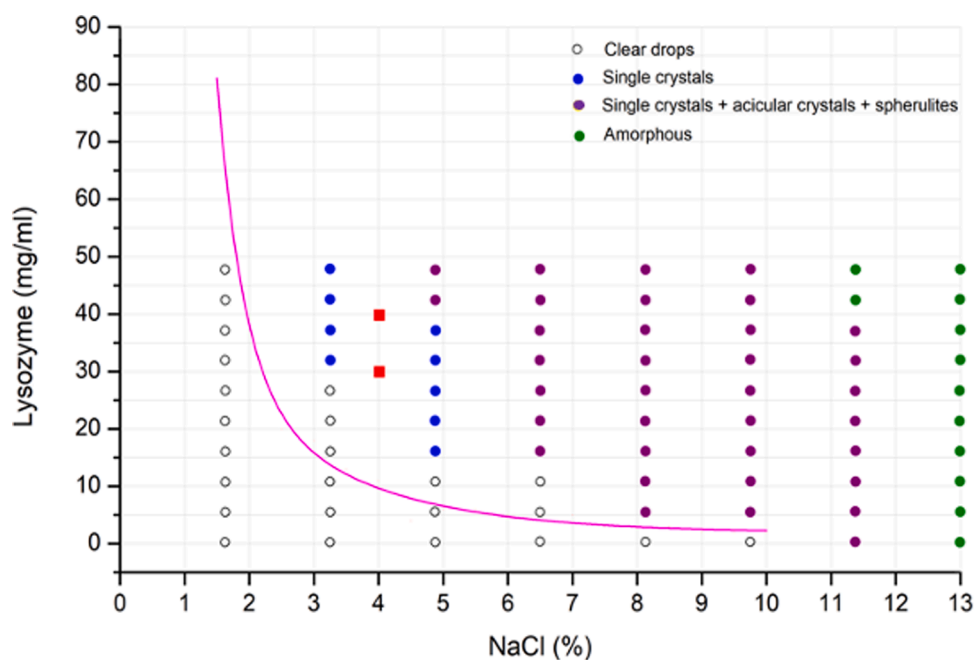


Fig. 8. Solubility plot imprinted in colors, where empty circles represent clear droplets, blue dots are the best area where crystals were obtained, purple dots represent the area where single crystals, acicular crystals, or spherulites were observed, and green dots represent amorphous precipitates.

two red spots in Fig. 8) were the most appropriate for our experimental set-up.

Solubility plot imprinted in colors, where empty circles represent clear droplets, blue dots are the best area where crystals were obtained, purple dots represent the area where single crystals, acicular crystals, or spherulites were observed, and green dots represent amorphous precipitates.

6.4. X-ray diffraction

Crystallization cells containing the crystals were carefully disassembled by removing the silicon sealant surrounding the cell. The two plates of the cell were peeled open. From each section, a minimum of three crystals were selected and transferred to the cryo-protectant solution composed of mother liquid supplemented with 15% (v/v)

glycerol. Crystals were flash cooled in liquid nitrogen and stored until data collection. The X-ray data collection was performed at the Xaloc beamline of the Spanish synchrotron radiation source ALBA (Barcelona, Spain). All data sets were collected following an identical protocol: 3000 frames, at 225 mm distance (1.3 Å), with 0.1 s exposition time and 1.28 transmittance. Using a wavelength of incident X-rays of 0.82 Å reflexion data were recorded with an Eiger 16 M detector. Data were processed with XDS [62] and further merged, scaled, and reduced with Aimless of the CCP4 software suite [63]. All statistical data were extracted from Aimless log files.

7. Results

7.1. Growth cell and crystallization of lysozyme

Firstly, we tested the growth cell (Fig. 7) in a perpendicular position to the electric field and to the magnetic fields. The second experiment was performed locating the growth cell in horizontal position, having the electric field and magnetic fields parallel to each other.

Both experiments were performed at concentrations 30/40 of lysozyme respect to NaCl, and 40/40 stands for 40 mg/mL protein and 40 mg/mL of NaCl. Protein crystallization was performed in solution (50 mM acetate buffer, pH 4.5) Fig. 9, and in buffered agarose gel 0.1% (w/v) Fig. 10. When combining electric and magnetic fields, it appears that the number of crystals is substantially reduced, as shown in Fig. 10.

The best visual results found in most of the experiments were obtained when the concentration was 40/40 mg/mL in gel media. Fig. 11 shows a summary of these results (the best) observed for a similar experiment run for a month until the crystal growth process was completed. All crystals reached their maximum size.

All experiments were performed in triplicate and the statistics of crystals was carefully done. Fig. 12 shows the results obtained for the best of the cases in terms of number of crystals.

The observed trend went as follows: lots of crystals grew in the

control conditions, less crystals grew in the electric field condition, and a remarkable reduction of crystals was observed when combining both fields. The best results in terms of lysozyme crystal number and size were observed when combining these electromagnetic fields.

7.2. Quality indicators based on X-ray characterization

The quality of the crystals obtained was assessed by X-ray diffraction (Figs. 13, 14), with which 3000 frame datasets (300° in 0.1° steps) were acquired from 53 crystals (12 of them without field as control, 23 under electric field, and 18 under both electric and magnetic fields). Data was acquired at XALOC beamline of the Spanish synchrotron radiation source (ALBA) using a 0.918397 Å beam and a Pilatus M6 detector at 223 mm from the crystal. The resolution limit was fixed to 1.3 Å during data processing. All indicators included in the summary block of the Aimless log files were automatically extracted to the indicators data set. Only overall indicators were included, as “inner” indicators are highly correlated with “overall” ones and “outer” indicators are meaningless because the resolution was clipped to 1.3 Å. All highly correlated indicators (for instance R_{merge} , R_{meas} , R_{pim} , and variants) were removed from the analysis as well as anomalous scattering indicators. Finally, the variables selected for analysis were the following: unit cell parameters a and c (as the ratio a/c), isotropic Wilson B-factor (B), mosaic spread (μ), R_{merge} , number of unique observations (N_{u}), overall intensity over noise (I/σ), and the chi square at the end of refinement (χ^2).

A statistical analysis of these indicators was done by comparing crystals grown under the same field (either C-control, E-electric, or EB-electric and magnetic), the same growth media (either S-solution or G-gel), or the same electrode (either A-anode or C-cathode). Table 1 shows ANOVA multiple pairwise-comparison between the means of these groups. The p-values in the table indicate how likely the mean of the two groups is the same. No differences between indicator distributions were found between crystals at the anode and the cathode (last two columns). The μ , R_{merge} , and χ^2 indicators did not show any significant difference

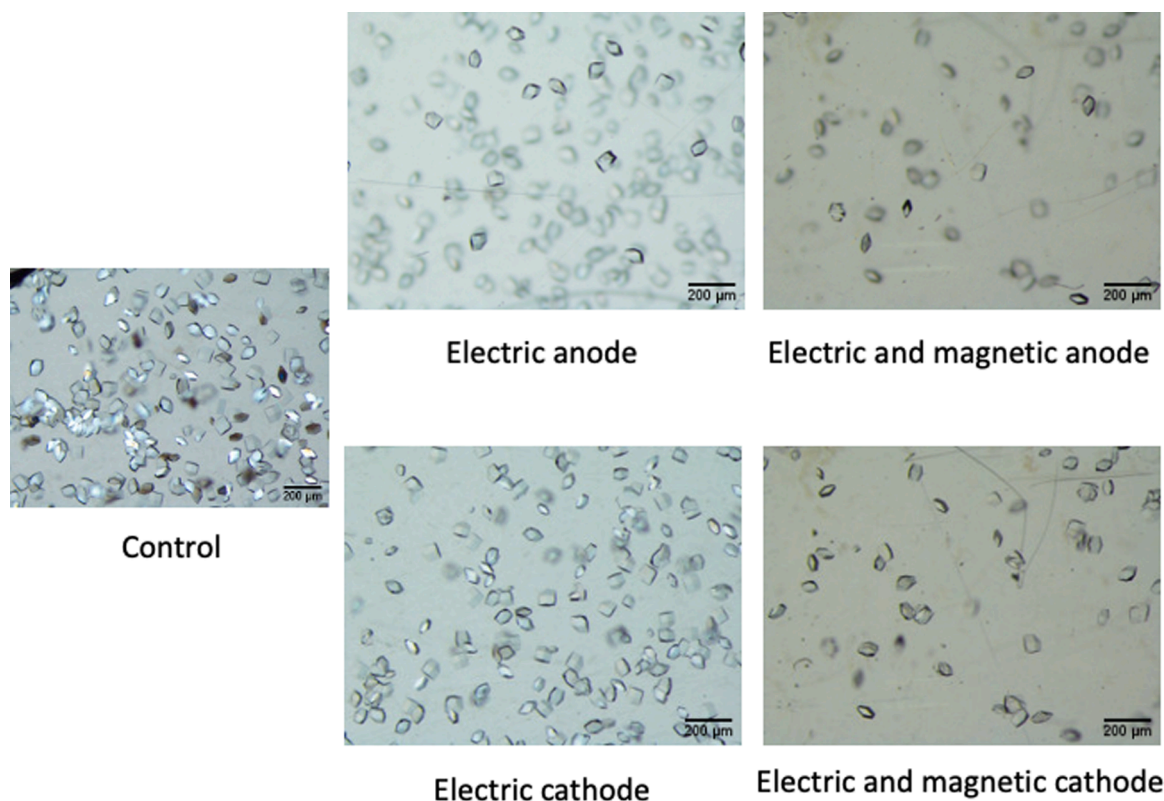


Fig. 9. Crystallization of lysozyme in solution at concentration 40 mg/mL of protein and 40 mg/mL of NaCl.

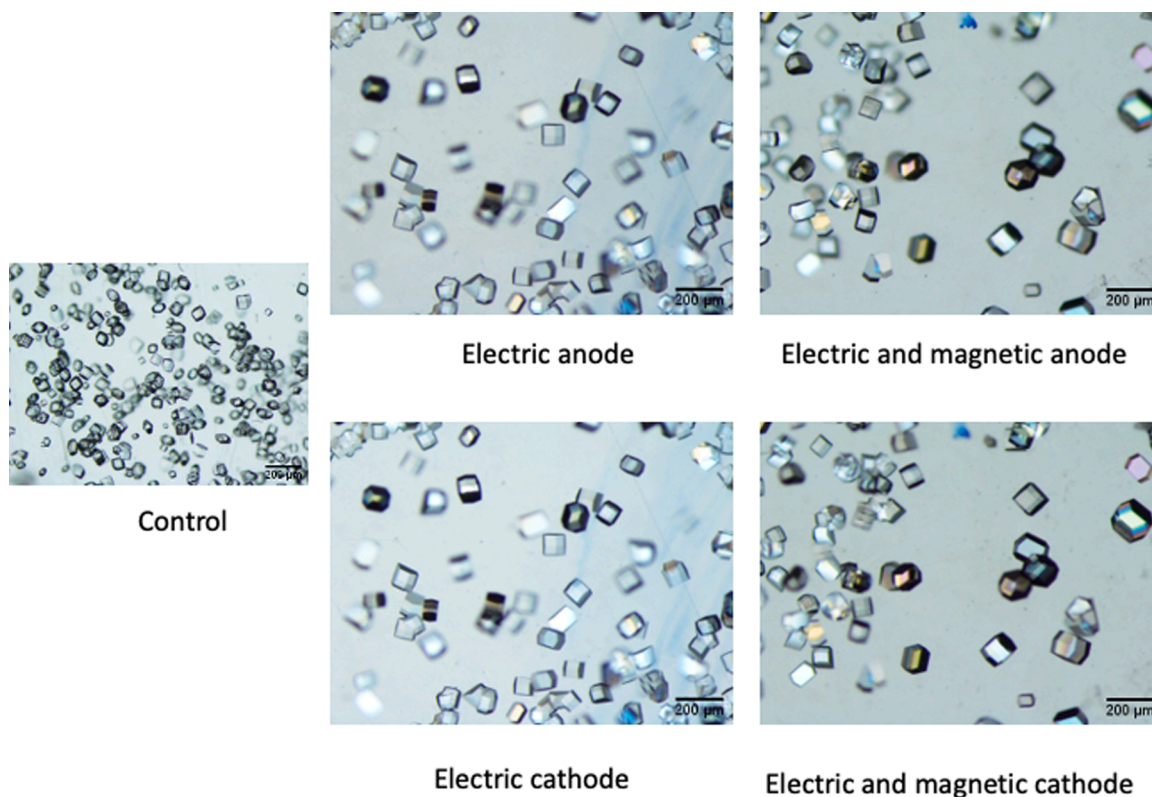


Fig. 10. The crystallization of lysozyme in gel at concentration of 40 mg/mL of protein and 40 mg/mL of NaCl.

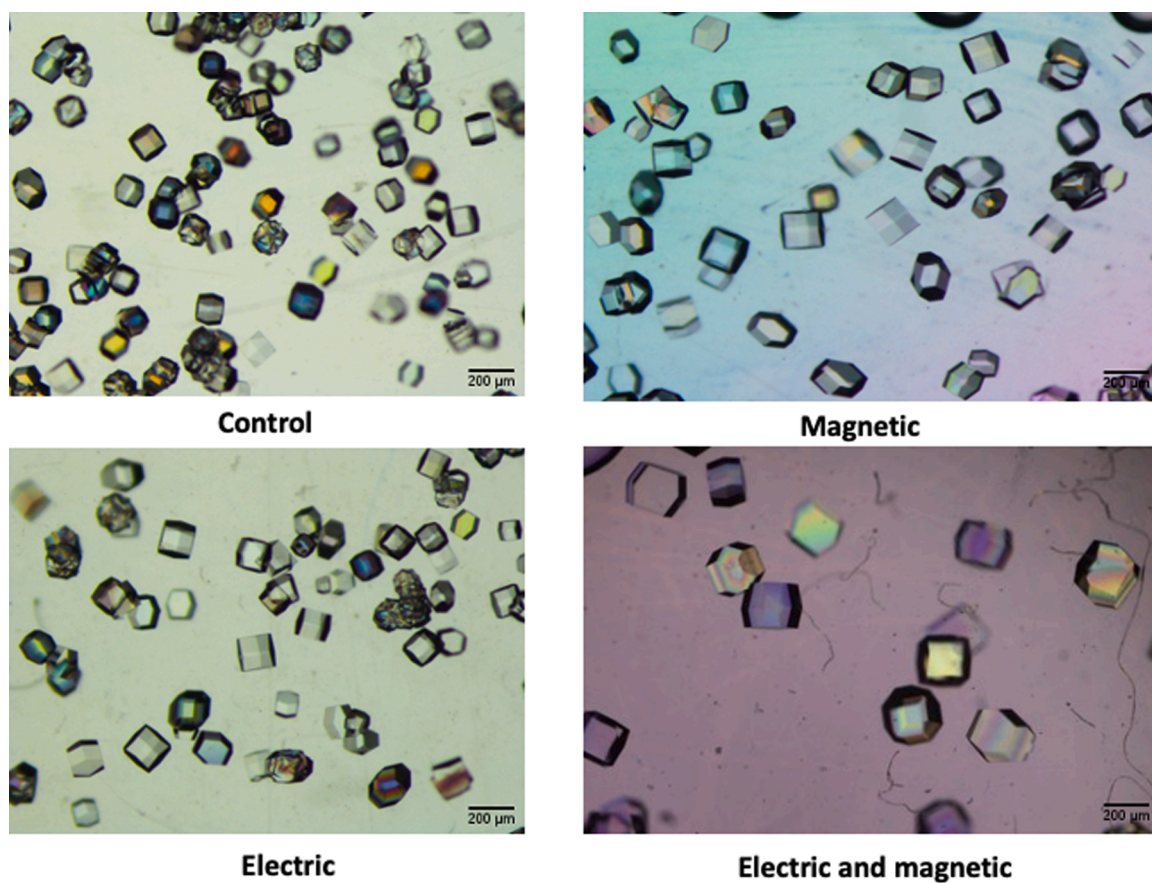


Fig. 11. Crystallization of lysozyme in gel at concentration 40 mg/mL of protein and 40 mg/mL of NaCl.

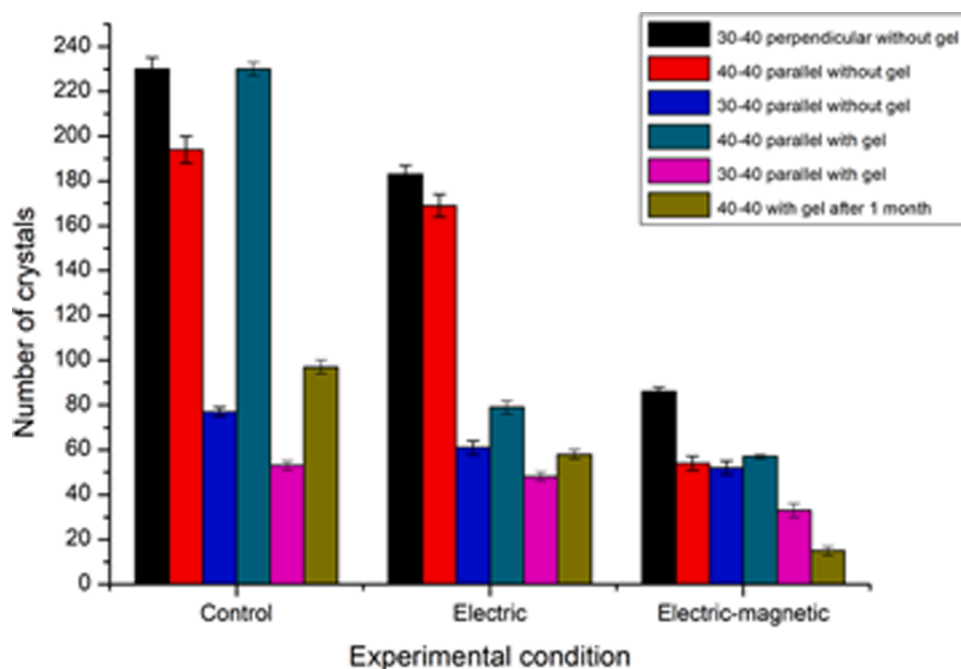


Fig. 12. The Statistics of the crystallization of lysozyme at different conditions: Controls compared with Electric (E) and Electro-Magnetic fields (EB) in terms of number of crystals.

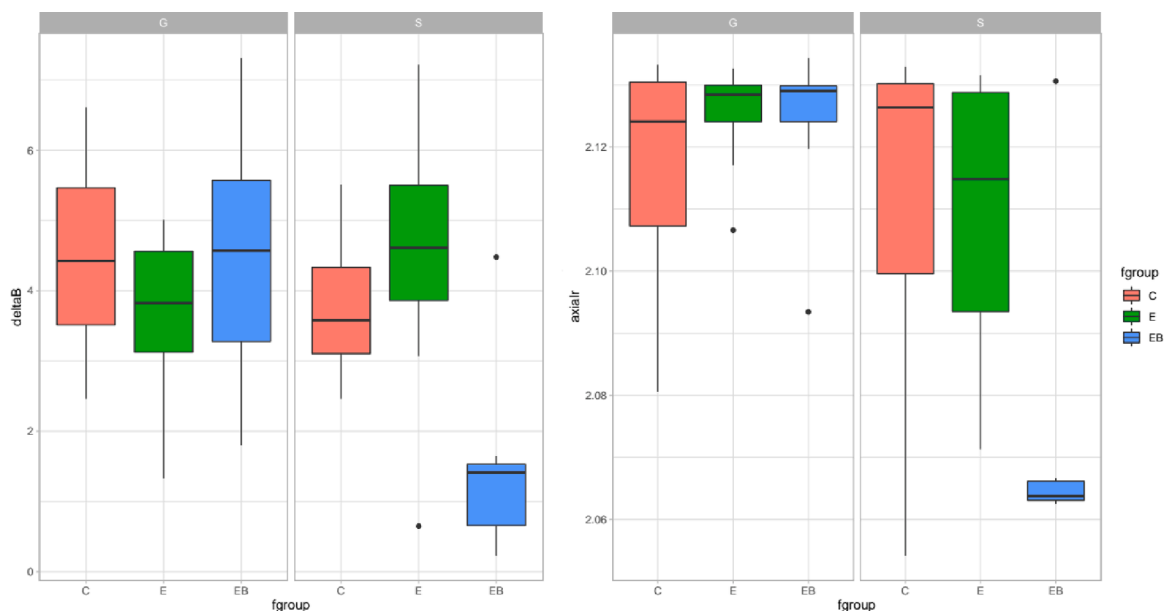


Fig. 13. Distribution of the B (left) and a/c (right) indicators. Each panel shows the median (thick horizontal black line), first and third quartiles (top and bottom limits of the colored rectangles), whiskers extending to $\pm 3IQR/2$, where IQR is the inter-quartile range. Any data point beyond these whiskers (most probably an outlier) is plotted as a point.

when S/G or C/E/EB groups were compared (Figure S1 in supplementary materials). N_u and I/σ statistics show small differences, with larger values for the crystals grown in solution under EB fields (Figure S2 in supplementary materials). The largest differences between groups were found in the lattice parameters (a/c) and in the B indicator (Fig. 13). EB crystals grown in gel show lower I/σ values and higher B values than those grown in free solution. a/c values for EB crystals grown in gel are much larger than those of crystals grown in free solution. Both effects could be correlated, as the differences in a/c ratio may be produced by an anisotropic damping of the thermal vibrations in the a direction. The fact that this damping is only observed in solution-

grown crystals seems to indicate that some degree of crystal orientation with respect to the magnetic field exists and contributes to freeze this vibration damping in the crystal lattice. Crystal orientation has been reported in magnetic fields [64–68], but only for much larger fields. Further experiments are required to track the origin of these differences, including anisotropic B refinement for crystals grown under different conditions.

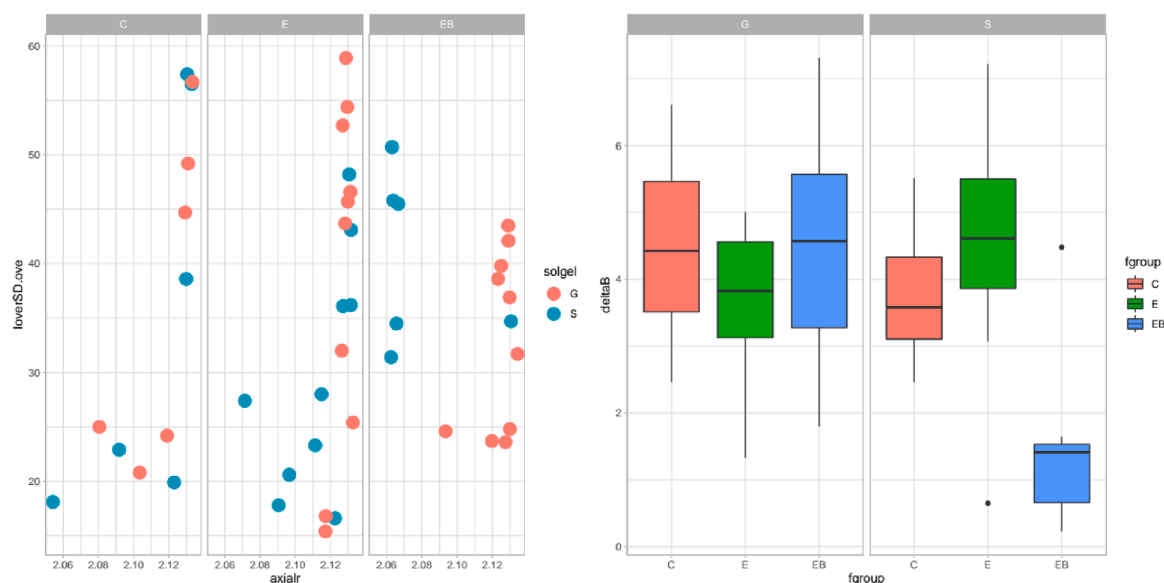


Fig. 14. (A) Projection of the crystals analyzed and the indicator directions into the Dim1/Dim2 space obtained by principal component analysis of the indicators' data set. μ , R_{merge} , and I/σ , are roughly parallel to Dim1, whereas a/c and N_u are close to Dim2. (B) Overall I/σ values as a function of the axial ratio a/c . Crystals grown in gel/solution are indicated by red/blue dots. Crystals grown in the C/E/EB conditions are shown in the left/middle/right panels.

Table 1

p-values from ANOVA multiple pairwise-comparison between the means of groups. In the second row, "X/Y" means "comparison of groups X and Y"; a third term between parentheses "(Z)" means that only crystals within this Z group are compared. The first three numeric columns correspond to the differences due to the fields (E: electric, B: magnetic, EB: both), the next three show the differences due to the growth medium (S: Solution, G: gel), and the last two columns the differences due to the electrode where the crystal grew (A: anode, C: cathode). Statistically significant differences (p-value < 0.05) are highlighted in red. p-values larger than 0.05, but smaller than 0.20 (i.e. relatively large, but not significant differences) are shown in orange.

Indicator	Effect of fields			Effect on growth media			Anode/Cathode	
	E/C	EB/C	EB/E	S/G (EB)	S/G(E)	S/G(C)	A/C (EB)	A/C (B)
<i>a</i>	0.81031517	0.12795781	0.01350362	7.24e-05	0.0124186	0.7850207	0.5526636	0.8936635
<i>c</i>	0.7070098	0.9999505	0.6477025	7.65e-05	0.2816138	0.6620451	0.959671	0.1163293
<i>a/c</i>	0.7472732	0.5383549	0.1167659	4.95e-05	0.0515445	0.7177455	0.7185596	0.3203278
<i>B</i>	0.9688955	0.4955857	0.2702866	0.0005053	0.5300033	0.379423	0.7635126	0.8605415
μ	0.9138611	0.9214715	0.6501585	0.6723419	0.4404005	0.8360233	0.5152219	0.1232149
R_{merge}	0.9693858	0.9455877	0.8059232	0.1237154	0.4678781	0.422678	0.8800973	0.1904494
N_u	0.7465136	0.0455970	0.0020585	0.1414393	0.7423469	0.1506342	0.628647	0.7259428
I/σ	0.9309115	0.9952748	0.8691875	0.0415117	0.135645	0.9036302	0.7300617	0.2437978
I/σ	0.8658248	0.5421992	0.1873434	0.7559474	0.7529517	0.0756824	0.9086381	0.6345258

A Principal Components Analysis¹ of the distribution indicators (Fig. 14a and supplementary Figure S2) shows that more than 70% of the variability can be explained by two dimensions. The first one is close to the projected directions of μ , R_{merge} and I/σ , while the second one is close to N_u , a , and B . The direction of these two groups of indicators, projected in the Dim1/Dim2 space, are roughly perpendicular. For this reason, we can use two axes from these two groups to represent most of the variability in the indicators without the complexity of PCA dimensions. This is shown in Fig. 14b, where (I/σ), is plotted as a function of the axial ratio a/c . The "control" crystals (left panel) show the expected behavior of lysozyme crystals: most of them have the $a/c = 2.13$

ratio, characteristic of HEW lysozyme and a few of them have lower a/c and I/σ values. These are the "bad" crystals growing defective or getting broken during crystal handling or data collection. Although it is well known that agarose gel-grown protein crystals are of improved quality, when compared to gel-free solution grown ones [33,34], from our results both gel- and solution-grown crystals are equally represented among the good and the bad crystals. Crystals grown under the electric field (middle panel) show a similar distribution; the only difference with control crystals is that now all crystals having lower a/c values come from the S group. Due to the small number of crystals, it is difficult to assess if this is a relevant difference or an accident. Crystals grown under E and B fields (right panel) show a completely different behavior. As in the other two groups, there is a characteristic a/c value of 2.13, but almost all crystals having this "normal" ratio were grown in gel, while solution-grown crystals show a lower a/c value. This value is not a

¹ Chapter 8 of the book >>> R.A. Johnson & D.W. Wichern (2008) "Applied Multivariate Statistical Analysis", 6th Edition Pearson.

random one as in the C and E groups, but a characteristic a/c value of 2.065, as if they crystallized in a lattice having a unit cell slightly more elongated in the c direction. In addition, the I/σ value of the crystals having $a/c = 2.065$ is similar to that in the C and E groups, while crystals with the common $a/c = 2.13$ value have lower I/σ values than the corresponding C and E groups.

8. Concluding remarks

Proteins are complex molecules that exhibit different behaviors and properties when found in solution or within a crystal. Therefore, searching for the best crystallization conditions is a unique and exciting path for each protein. In this work we have re-visited some of the standard crystallization techniques and introduced new approaches, such as using low intensity electromagnetic fields, evaluated by their influence on crystal quality. As shown by the quality indicators, the unit cell parameters “ a ” and “ c ” are strongly and inversely correlated among themselves and with the thermal B factor. In a similar manner, the mosaicity is correlated with R_{merge} and I/σ ; consequently, there is also a strong inverse correlation between R_{merge} and I/σ . Finally, a strong correlation is also observed between the number of unique observations and the “ a ” unit cell parameter. There is a synergistic effect when electric and magnetic fields are applied either in solution or in gel, as the number of crystals is reduced in most of the cases, and the size is increased. Consequently, these parameters are extremely sensitive to the supersaturation and temperature values used for the experiment. Therefore, we can conclude that external physical parameters, electric fields, magnetic fields, or convection-free media can be used to influence crystal nucleation and growth, affecting ultimately crystal quality. However, we have also showed that intrinsic chemical characteristics, as in the case of transferrin, can impose the final crystal quality, surpassing any potential beneficial physical effect.

Acknowledgements

One of the authors (C. C-E) is a doctoral student from the *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas*, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 856528. One of the authors (A.M.) acknowledges DGAPA-UNAM for the support during the sabbatical year at the I.A.C.T. and C.S.I.C. – University of Granada in Spain. This project was also supported by the grant DGAPA-PAPIIT project No. IN207922 (to A.M.) and the Spanish Ministry of Science and Innovation, grant PID2020–116261GB-I00 / AEI / 10.13039/501100011033, (to J.A.G.). We are grateful to the Spanish Radiation Synchrotron source, ALBA (Barcelona, Spain), for the provision of time and the staff at XALOC beamline for assistance during data collection. The authors acknowledge Ms. Antonia Sánchez-Marín for the final revision and English style corrections for this manuscript.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.pcrysgrow.2022.100559](https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2022.100559).

References

- J.A. Gavira, Current trends in protein crystallization, *Arch. Biochem. Biophys.* 602 (2016) 3–11, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.010>. Jul.
- R. Giegé, C. Sauter, Biocrystallography: past, present, future, *Hfsp J.* 4 (3–4) (2010) 109–121, <https://doi.org/10.2976/1.3369281>. Jun.
- X. Benjin, L. Ling, Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy, *Protein Sci.* 29 (4) (2020) 872–882, <https://doi.org/10.1002/pro.3805>. Apr.
- S. Boutet, et al., High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography, *Science* 337 (6092) (2012) 362–364, <https://doi.org/10.1126/science.1217737>. Jul.
- R. Fromme, et al., Serial femtosecond crystallography of soluble proteins in lipidic cubic phase, *IUCr J* 2 (5) (2015) 545–551, <https://doi.org/10.1107/S2052252515013160>. Sep.
- D. Kashchiev, G.M. van Rosmalen, Review: nucleation in solutions revisited, *Cryst. Res. Technol.* 38 (7–8) (2003) 555–574, <https://doi.org/10.1002/crat.200310070>.
- T.J. Boggon, et al., Synchrotron X-ray reciprocal-space mapping, topography and diffraction resolution studies of macromolecular crystal quality, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56 (7) (2000) 868–880, <https://doi.org/10.1107/S0907444900005837>. Jul.
- F. Otolara, J. Manuel Garcia-Ruiz, J. Antonio Gavira, B. Capelle, Topography and high resolution diffraction studies in tetragonal lysozyme, *J. Cryst. Growth* 196 (2–4) (1999) 546–558, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(98\)00849-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(98)00849-5). Jan.
- M.-C. Robert, B. Capelle, B. Lorber, Growth Sectors and Crystal Quality, in: *Methods in Enzymology*, 368, Elsevier, 2003, pp. 154–169, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)68009-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)68009-2).
- M.C. Robert, B. Capelle, B. Lorber, R. Giegé, Influence of impurities on protein crystal perfection, *J. Cryst. Growth* 232 (1–4) (2001) 489–497, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01164-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01164-2). Nov.
- R. Giegé, B. Lorber, A. Théobald-Dietrich, Crystallogenes of biological macromolecules: facts and perspectives, *Acta Cryst.* 50 (1994) 339–350, <https://doi.org/10.1107/S0907444994001344>.
- C. Campos-Escamilla, The role of transferrins and iron-related proteins in brain iron transport: applications to neurological diseases, in: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 123, Elsevier, 2021, pp. 133–162, <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.09.002>.
- J.M. Garcia-Ruiz, F. Otolara, A. Garcia-Caballero, The role of mass transport in protein crystallization, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 72 (2) (2016) 96–104, <https://doi.org/10.1107/S2053230X16000030>. Feb.
- A. McPherson, J.A. Gavira, Introduction to protein crystallization, *Acta Crystallogr. F* 70 (1) (2014) 2–20, <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>.
- C.N. Nanev, Advancements (and challenges) in the study of protein crystal nucleation and growth; thermodynamic and kinetic explanations and comparison with small-molecule crystallization, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 66 (2) (2020), 100484, <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2020.100484>. May.
- C.N. Nanev, Recent insights into protein crystal nucleation, *Crystals* (2073-4352) 8 (5) (2018) 219. May.
- N.E. Chayen, E. Saridakis, Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal, *Nat. Methods* 5 (2) (2008) 147–153, <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>, 01.
- H. Hou, et al., A systematic comparison of sitting and hanging-drop crystallization using traditional and cross-diffusion microbatch crystallization plates, *J. Cryst. Growth* 521 (2019) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2019.05.011>. Sep.
- N.E. Chayen, P.D. Shaw Stewart, D.M. Blow, Microbatch crystallization under oil — A new technique allowing many small-volume crystallization trials, *J. Cryst. Growth* 122 (1–4) (1992) 176–180, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(92\)90241-A](https://doi.org/10.1016/0022-0248(92)90241-A). Aug.
- N. Candoni, R. Grossier, M. Lagaize, S. Veessler, Advances in the use of microfluidics to study crystallization fundamentals, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 10 (1) (2019) 59–83, <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060718-030312>. Jun.
- J.-W. Wang, et al., Miniaturization of the whole process of protein crystallographic analysis by a microfluidic droplet robot: from nanoliter-scale purified proteins to diffraction-quality crystals, *Anal. Chem.* 91 (15) (2019) 10132–10140, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02138>. Aug.
- T. Bergfors, Seeds to crystals, *J. Struct. Biol.* 142 (1) (2003) 66–76, [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00039-X). Apr.
- A. D’Arcy, F. Villard, M. Marsh, An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63 (4) (2007) 550–554, <https://doi.org/10.1107/S0907444907007652>. Apr.
- P.D. Shaw Stewart, S.A. Kolek, R.A. Briggs, N.E. Chayen, P.F.M. Baldock, Random microseeding: a theoretical and practical exploration of seed stability and seeding techniques for successful protein crystallization, *Cryst. Growth Des.* 11 (8) (2011) 3432–3441, <https://doi.org/10.1021/cg2001442>. Aug.
- M. Ibrahim, et al., Improvements in serial femtosecond crystallography of photosystem II by optimizing crystal uniformity using microseeding procedures, *Struct. Dyn.* 2 (4) (2015), 041705, <https://doi.org/10.1063/1.4919741>. Jul.
- R. Dods, et al., From macrocrystals to microcrystals: a strategy for membrane protein serial crystallography, *Structure* 25 (9) (2017) 1461–1468, <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.002>, e2Sep.
- K. Koruza, B. Lafumat, M. Nyblom, W. Knecht, Z. Fisher, From initial hit to crystal optimization with microseeding of human carbonic anhydrase IX—A case study for neutron protein crystallography, *Crystals* 8 (11) (2018) 09, <https://doi.org/10.3390/cryst8110434>.
- R. Hussein, et al., Optimizing crystal size of photosystem II by Macroseeding: toward neutron protein crystallography, *Cryst. Growth Des.* 18 (1) (2018) 85–94, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00878>. Jan.
- S.A. Kolek, B. Bräuning, P.D. Shaw Stewart, A novel microseeding method for the crystallization of membrane proteins in lipidic cubic phase, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 72 (4) (2016) 307–312, <https://doi.org/10.1107/S2053230X16004118>. Apr.
- S. Khurshid, E. Saridakis, L. Govada, N.E. Chayen, Porous nucleating agents for protein crystallization, *Nat. Protoc.* 9 (7) (2014) 1621–1633, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.109>. Jul.
- E. Saridakis, N.E. Chayen, Imprinted polymers assisting protein crystallization, *Trends Biotechnol.* 31 (9) (2013) 515–520, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.003>. Sep.
- I. Zegers, et al., Counterdiffusion protein crystallisation in microgravity and its observation with PromISS (protein microscope for the international space station,

- Microgravity Sci. Technol 18 (3–4) (2006) 165–169, <https://doi.org/10.1007/BF02870402>. Sep.
- [33] J.A. Gavira, F. Otálora, L.A. González-Ramírez, E. Melero, A.E.S. van Driessche, J.M. García-Ruiz, On the quality of protein crystals grown under diffusion mass-transport controlled regime (I), *Crystals* 10 (2) (2020) 68, <https://doi.org/10.3390/cryst10020068>. Jan.
- [34] A. Moreno, M.E. Mendoza, 31 - Crystallization in gels, in: P. Rudolph (Ed.), *Handbook of Crystal Growth*, 2nd Edition, Elsevier, Boston, 2015, pp. 1277–1315, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63303-3.00031-6>.
- [35] F. Artusio, A. Castellví, A. Sacristán, R. Pisano, J.A. Gavira, Agarose gel as a medium for growing and tailoring protein crystals, *Cryst. Growth Des.* 20 (8) (2020) 5564–5571, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00736>. Aug.
- [36] F. Artusio, A. Castellví, R. Pisano, J.A. Gavira, Tuning transport phenomena in agarose gels for the control of protein nucleation density and crystal form, *Crystals* 11 (5) (2021), <https://doi.org/10.3390/cryst11050466>. Art. no. 5May.
- [37] O. Velásquez-González, et al., Crystal growth in gels from the mechanisms of crystal growth to control of polymorphism: new trends on theoretical and experimental aspects, *Crystals* 9 (9) (2019) 443, <https://doi.org/10.3390/cryst9090443>. Aug.
- [38] Guillermo Escolano-Casado, et al., Extending the pool of compatible peptide hydrogels for protein crystallization, *Crystals* 9 (5) (2019) 244, <https://doi.org/10.3390/cryst9050244>. May.
- [39] K. Tsukamoto, H. Koizumi, M. Maruyama, H. Miura, Y. Suzuki, and H. Tanaka, “Do we need microgravity to improve the diffraction properties of protein crystals?”, p. 7.
- [40] F. Otálora, J.A. Gavira, J.D. Ng, J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods applied to protein crystallization, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 101 (1–3) (2009) 26–37, <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.004>. Nov.
- [41] L.A. González-Ramírez, et al., Efficient screening methodology for protein crystallization based on the counter-diffusion technique, *Cryst. Growth Des.* 17 (12) (2017) 6780–6786, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01353>. Dec.
- [42] S. Sugiyama, et al., Growth of protein crystals in high-strength hydrogels with the dialysis membrane, *Jpn. J. Appl. Phys.* 60 (1) (2021), 015506, <https://doi.org/10.35848/1347-4065/abd0c7>. Jan.
- [43] M. Wang, et al., ‘Anion clamp’ allows flexible protein to impose coordination geometry on metal ions, *Chem. Commun.* 51 (37) (2015) 7867–7870, <https://doi.org/10.1039/C4CC09642H>.
- [44] K. Mizutani, M. Toyoda, B. Mikami, X-ray structures of transferrins and related proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820 (3) (2012) 203–211, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.003>. Mar.
- [45] H. Kawabata, Transferrin and transferrin receptors update, *Free Radical Biol. Med.* 133 (2019) 46–54, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>. Mar.
- [46] P. Bourassa, W. Alata, C. Tremblay, S. Paris-Robidas, F. Calon, Transferrin receptor-mediated uptake at the blood–brain barrier is not impaired by Alzheimer’s disease neuropathology, *Mol. Pharmaceutics* 16 (2) (2019) 583–594, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00870>. Feb.
- [47] K.C. Edwards, H. Kim, R. Ferguson, M.M. Lockart, J.B. Vincent, Significance of conformation changes during the binding and release of chromium(III) from human serum transferrin, *J. Inorg. Biochem.* 206 (2020), 111040, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111040>. May.
- [48] M.A. Fernandes, et al., A review of properties, delivery systems and analytical methods for the characterization of monomeric glycoprotein transferrin, *Crit. Rev. Anal. Chem.* (2020) 1–12, <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743639>. Mar.
- [49] J. Wally, et al., The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding, *J. Biol. Chem.* 281 (34) (2006) 24934–24944, <https://doi.org/10.1074/jbc.M604592200>. Aug.
- [50] C. Campos-Escamilla, D. Siliqi, L.A. Gonzalez-Ramirez, C. Lopez-Sanchez, J.A. Gavira, A. Moreno, X-ray characterization of conformational changes of human Apo- and Holo-transferrin, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (24) (2021), <https://doi.org/10.3390/ijms222413392>. , Jan.
- [51] P.K. Jha, et al., A review on effect of DC voltage on crystallization process in food systems, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 42 (2017) 204–219, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.002>. Aug.
- [52] N.J. English, Molecular simulation of crystallisation in external electric fields: a review, *Crystals* 11 (3) (2021), <https://doi.org/10.3390/cryst11030316>. , Mar.
- [53] S.Y. Ryu, I.H. Oh, S.J. Cho, S.A. Kim, H.K. Song, Enhancing protein crystallization under a magnetic field, *Crystals* 10 (9) (2020), <https://doi.org/10.3390/cryst10090821>. , Sep.
- [54] L.F. Alexander, N. Radacsi, Application of electric fields for controlling crystallization, *Cryst. Eng. Comm.* 21 (34) (2019) 5014–5031, <https://doi.org/10.1039/C9CE00755E>. Aug.
- [55] Z.-Q. Wu, et al., A first attempt investigation on crystallization screening and crystal quality of lysozyme under different simulated gravities in a large-gradient magnetic field, *Cryst. Eng. Comm.* 21 (26) (2019) 4001–4010, <https://doi.org/10.1039/C9CE00730J>. Jul.
- [56] Y.-L. Liu, et al., A periodic magnetic field as a special environment for scientific research created by rotating permanent magnet pairs, *Rev. Sci. Instrum.* 89 (10) (2018), 105103, <https://doi.org/10.1063/1.5016570>. Oct.
- [57] T.K. Walter, C.F. da G. Ferreira, J. Iulek, E.M. Benelli, Use of protein thin film organized by external electric field as a template for protein crystallization, *ACS Omega* 3 (8) (2018) 8683–8690, <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01277>. Aug.
- [58] C. Nanev, Recent insights into the crystallization process; protein crystal nucleation and growth peculiarities; processes in the presence of electric fields, *Crystals* 7 (10) (2017) 310, <https://doi.org/10.3390/cryst7100310>. Oct.
- [59] T.B. Jones, M. Washizu, R. Gans, Simple theory for the Levitron®, *J. Appl. Phys.* 82 (2) (1997) 883–888, <https://doi.org/10.1063/1.365856>. Jul.
- [60] M. Michaelis, B. Bingham, M. Charlton, C.A. Isaac, A variety of Levitrons: a review, *Eur. J. Phys.* 42 (1) (2021), 015001, <https://doi.org/10.1088/1361-6404/abc2c>. Jan.
- [61] E. Flores-Hernández, V. Stojanoff, R. Arreguín-Espinosa, A. Moreno, N. Sánchez-Puig, An electrically assisted device for protein crystallization in a vapor-diffusion setup, *J. Appl. Crystallogr.* 46 (3) (2013) 832–834, <https://doi.org/10.1107/S0021889813010558>.
- [62] W. Kabsch, XDS, *Acta Cryst D* 66 (2) (2010) 125–132, <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>. , Jun.
- [63] M.D. Winn, et al., Overview of the CCP 4 suite and current developments, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67 (4) (2011) 235–242, <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>. Apr.
- [64] G. Szaki, Crystal quality enhancement by magnetic fields, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 101 (1) (2009) 45–55, <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.003>. Nov.
- [65] J.A. Gavira, J.M. García-Ruiz, Effects of a magnetic field on lysozyme crystal nucleation and growth in a diffusive environment, *Cryst. Growth Des.* 9 (6) (2009) 2610–2615, <https://doi.org/10.1021/cg8008688>. Jun.
- [66] E.-K. Yan, C.-Y. Zhang, J. He, D.-C. Yin, An Overview of hardware for protein crystallization in a magnetic field, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (11) (2016) 1906, <https://doi.org/10.3390/ijms17111906>. Nov.
- [67] C. Pareja-Rivera, et al., Recent advances in the understanding of the influence of electric and magnetic fields on protein crystal growth, *Cryst. Growth Des.* 17 (1) (2017) 135–145, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01362>. Jan.
- [68] D.-C. Yin, “Chapter 5. utilization of magnetic field for protein crystallization,” in *Chapter 5. utilization of magnetic field for protein crystallization*, EDP sciences, 2021, pp. 108–143. doi: 10.1051/978-2-7598-2500-4.c007.



Camila Campos-Escamilla was awarded with a B.Sc. in Pharmaceutical Biological Chemistry from the School of Chemistry of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) in 2018. Currently, Camila C-E. is a PhD candidate in Biomedical Science from UNAM, working in the Chemistry of Biomacromolecules Department at the Institute of Chemistry, UNAM.

Camila C-E. has worked as Assistant to a level III researcher of the National Researchers’ System (Sistema Nacional de Investigadores, SNI) from September 2017 to December 2018. She has participated in congresses such as the “VI National Reunion of Diffractometry / I International Reunion of Synchrotron Light Users from the Mexican Society of Crystallography (SMCr)” at the Autonomous University of the State of Hidalgo (UAEH) in November 2019, earning the 2nd place award in the poster presentation session, and the “I National Congress of the Mexican Society of Synchrotron Light / I International Congress of Synchrotron Light Techniques”, held virtually from the University of Guanajuato in June 2021, earning the 3rd place award in the poster presentation session.

Camila C-E. has also attended other international academic activities such as the “SSRL RapiData 2021: Data collection and structure solving – a practical course for macromolecular X-ray measurements”, held virtually from the SLAC National Laboratory Accelerator in May 2021, and the “SAXS (Small Angle X-ray Scattering) online course for biomacromolecules” held virtually from the LANEM-IQ, UNAM from March to May 2021. Additionally, Camila C-E. has participated as a lecturer in the ACS Student Chapter of the University of San Carlos, Guatemala with the lecture “Protein crystallization: methods and applications” in June 2020 (held virtually).

Camila C-E. has so far 4 publications in international journals, one of them regarding the X-ray characterization of conformational changes of human apo- and holo-transferrin (*International Journal of Molecular Sciences*, 2021), another being a Chapter regarding the role of transferrins and iron-related proteins in brain iron transport (*Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2021), and the other two regarding the mechanisms of crystal growth in gels and control of polymorphism (*Crystals*, 2019), and novel devices for transporting protein crystals to synchrotron facilities (*Crystals*, 2018).



Dr. Luis A. Gonzalez-Ramirez My field of research focuses on the crystallization of biological macromolecules, inorganic compounds and molecules of pharmacological interest and their structural resolution by X-ray crystallography.

I hold a degree in Pharmacy with a specialization in pharmaceutical technology, food microbiology and clinical analysis, and a Master of Science with a specialization in Food Science and Technology. I obtained my PhD in Biotechnology at the University of Granada working in the Laboratory of Crystallographic Studies of the IACT-CSIC. My scientific background is based on the study of the crystallization and structural resolution of biological macromolecules using a new technique developed in the laboratory: namely, the technique of counter-diffusion in gels, which mimics the conditions of absence of convection by gravity in normal experiments on Earth, generating high-quality crystals for structural resolution studies at the atomic level.

In order to do this, I had the opportunity of carrying out six protein crystallization experiments in the International Space Station (ISS) within the framework of different projects with the European Space Agency. The results, of high scientific impact, showed that there was no significant difference in the crystal quality of the crystals obtained in microgravity and on land using the technique developed in our group.

Subsequently, I have directed and expanded these studies to other molecules such as inorganic compounds and organic molecules, including drugs.

Currently, apart from scientific research, I am also in charge of the automated protein crystallization equipment and I am the supervisor of the X-ray diffraction facility of our laboratory at the National Nuclear Safety Council.



Dr. Fermin Otálora He is Doctor in Earth Sciences (Univ. Granada, Spain), specialized in Crystallography. He started working in the field of crystal growth in diffusive media and the development of computational models that integrated the physics of mass transport in diffusive media and that of crystal growth. This research lead him to works on the characterization and study of crystalline and fractal growth patterns. These studies contributed decisively to the development of counter-diffusion techniques for the growth of crystals, notably protein crystals. During his postdoctoral period he worked at the European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble (France) on the most advanced methods for the characterization of protein

crystals by diffraction. He also specialized in the characterization by optical techniques (microscopy and interferometry) of mass transport in solutions and gels. This set of skills for the theoretical and experimental study of crystal growth in diffusive media, as well as the obtained crystals, allowed him to actively participate in the microgravity crystal growth work developed by the LEC since 1996, participating in various microgravity missions of the European, American and Japanese space agencies, coordinating the Topical Team for Crystal Growth of the European Agency and participating in the development of the Granada Crystallization Facility (a LEC instrument for crystallization in microgravity) and several reactors of the APCF and PCDF (ESA instruments) for research in protein crystallization in space. At the beginning of the 2000s, he began to work in two new, and different, lines of research: stochastic simulations of populations in ecology and the self-organized formation of mineral patterns. The first line, relegated somewhat later, arose due to the proximity of the computational methods used in the simulation of stochastic aggregation during crystal growth and those required for the study of aggregation in bird colonies. The second line was more continuous and it is the one that he has followed since then, combining the study of the mechanisms of formation and self-organization of crystal aggregates and the use of the properties of the crystals observed in natural media as indicators of the conditions of formation, which allows the study of environmental conditions in inaccessible or disappeared media, as in the case of Precambrian crystals grown at the same time and in the formations where the first evidence of life on Earth has been detected. In recent years, his work, in national and European projects, has focused on the investigation of the crystallization processes involved in the self-organization of mineral patterns (MISOS) of great importance for prebiotic chemistry and detection of primitive life, and also having great technological possibilities. In the last years, he has restarted his work on protein crystallization, concentrated on crystal characterization and in new, advanced crystal growth methods. It is worth highlighting his active participation in science education and dissemination, as coordinator of master and doctorate programs at the UIMP, teaching classes in these programs and in specialized courses organized by the LEC and developing dissemination projects such as the "Fractals" and "Crystals" exhibitions, and many other activities. He has headed the ESA Topical Team on Protein Crystallization and has been member of the Cultural Heritage Commission of the IUCr, member of the Executive Committee of the European Crystallographic Association (ECA) and the Spanish Group of Crystallography and Crystal Growth (GE3C), and the International Organization for Crystal Growth (IOCG). He has authored 70 papers (h-index 26).



Dr. José A. Gavira is a Senior Research Scientist at the Spanish National Research Council (CSIC). Originally from a physical-chemistry background he gaining his PhD in protein crystallization in diffusion mass transport media (Granada, Spain, 2000), awarded with the First Prize of the PhD Chemistry-program of the University of Granada.

Dr. Gavira was a Postdoctoral Researcher at the University of Huntsville (UAH) in Alabama (USA) in collaboration with several groups at the Marshall Space Flight center (NASA) in protein crystallization and in situ resources utilization projects (2000–2003). He became member of the Southeast collaborative structural genomic project for the development of new throughput protein crystallization techniques. In this period, he acquired a solid experience in crystallography and registered the patent "A high throughput crystallization cassette for the growth and optimization of macromolecular crystals". In 2003 he returned to LEC to lead the macromolecular crystallography research line while getting involved in several projects to study macromolecule crystallization under microgravity conditions, funded by the European (ESA), American (NASA) and Japanese (JAXA) space agencies. In 2007 Dr. Gavira got a permanent position as research scientist of the National Research Council (CSIC: *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*) at the Laboratory for Crystallographic Studies (LEC: *Laboratorio de Estudios Cristalográficos*) of the *Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra* (IACT) and actively participated in the creation of the *Factoría Española de Cristalización* (Consolider-Ingenio project). At this time, he started to develop his main research line based on the biotechnological application of protein/enzyme crystals for drug formulations, as self-supported catalysts and as biosensors including the improvement of properties of phylogenetically reconstructed ancestral proteins in collaboration with Prof. Sanchez Ruiz. He also maintained a permanent collaboration with the group of Dr. T. Krell for the crystallization and structure determination of bacterial chemoreceptors. Due to the mutual interest in understanding bacterial sensing mechanisms this on-going collaboration is been very fruitful. Up to date Dr. Gavira has deposited 105 structural models at the PDB.

Since 2021 Dr. Gavira is the head of the Department LEC. He has been Vice-president of the International Organization for Biological Crystallization and is a current member of the board. He is also member of the management board of the Crystallography and Crystal Growth Specialized Group (GE3C) of the RSEQ. Dr. Gavira is co-director of the International School on Biological Crystallization (7th edition in 2019), co-Director of the Advance Crystallization Course (supported by FEBS), co-organizer of ICCBM-workshops, and chair is several sessions of IUCr, ECA and IOBCr meetings. He is also member of the C10 evaluation panel of the ESRF.

Dr. Gavira has published more than 111 articles in peer-reviewed journals (h index = 27). He is also part of the review panel of ActaF (IUCr journals), editor of *Crystals* and frequent reviewer for several journals (CG&D, ActaD, BBA, Molecular Biology Report, PNAS, etc.) He is invited in a yearly base to at least one International schools/workshops. Dr. Gavira has issue three patents and he is cofounder of the Spin-off Crystalgel (23/10/2017–2021).



Dr. Abel Moreno was awarded with a B.Sc. in Chemistry from the Autonomous University of Puebla (Mexico) in 1990 and his professional title was homologated as the B.Sc. in Chemistry from the University of Granada in Spain. Dr. Moreno was also awarded with a Ph.D. in Chemistry from the University of Granada (Spain) in 1995. Currently, Dr. Moreno is a full Professor of Biological and Physical Chemistry at the Institute of Chemistry of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) in Mexico City. He has been distinguished as a member of the National System of Researchers of Mexico (SNI) at level 3 (the highest category of Mexican scientists), a member of the Mexican Academy of Sciences, Mexican Society of Crystallography, Mexican Society of Synchrotron Light, the New York Academy of Sciences, and member of the Mexican and American Chemical Societies as well as the Spanish Royal Society of Chemistry. Prof. Moreno has been a visiting professor at the University of Cambridge (United Kingdom, 2009) and at the University of Strasbourg (France, 2003–2004). Dr. Moreno has been a visiting scientist at the University of Luebeck and at the Institute of Crystal Growth (IKZ) Berlin (Germany, February 2004), at the University of Tohoku (Japan, Autumn 2003), at Imperial College London (United Kingdom in 1999 and 2000), and at the University of California Riverside (USA, 1997).

Doctor Moreno is a Full Professor of Biological and Physical Chemistry; he was the Chair of the Lectures on Physical Chemistry for Biomedical Sciences (1997–2002), and from 2010 he is the Chair of the Course: Equilibrium and Kinetics in the undergraduate level at the Faculty of Chemistry UNAM. He was habilitated to supervise students into the PhD Graduate Programs in Biomedical, Biological, Chemical and Materials Sciences since 2000.

Dr. Abel Moreno has published more than 115 papers in prestigious international journals cited 2500 times having a H-index of 25. He is the author of 15 book chapters and 7 books on his specialties in Biological Crystallogenes, Crystallochemistry, and Biomineralization processes. Into the Academia he has graduated more than 30 students at all levels from BSc up to the PhDs and postdoctoral fellows. Prof. Moreno was the former President of the International Organization for the Biological Crystallization from September 2010 to September 2012 (IOBCr). He is also member of the international advisory board of the Commission of Crystal Growth and Characterization of Materials of the International Union of Crystallography, member of the Executive Committee of the International Organization for Crystal Growth (2019–2022). Prof. Moreno was the President of the Mexican Society of Crystallography from 2018 to 2019, he is currently the vice-President of Mexican Society of Synchrotron Light from 2019 to 2023. He is also member of the Advisory board of the Latin America Asia Africa and Middle East Program (LAAAMP) of the IUCr–UNESCO–IUPAP. Prof. Moreno is member of the Editorial Board of the journal *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* (ELSEVIER). Editor for the Latin America section of the Newsletter of the International Union of Crystallography, and Editor-in-Chief of the section Biomolecular Crystals of the journal *Crystals* (MDPI, Switzerland). Recently was assigned associate editor of the journal *Revista Mexicana de Física* (Mexico).



Article

X-ray Characterization of Conformational Changes of Human Apo- and Holo-Transferrin

Camila Campos-Escamilla ¹, Dritan Siliqi ^{2,*}, Luis A. Gonzalez-Ramirez ³, Carmen Lopez-Sanchez ³,
Jose Antonio Gavira ³ and Abel Moreno ^{1,3,*}

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México; camila.cescamilla@gmail.com

² Istituto di Cristallografia (IC), National Research Council (CNR), Via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy

³ Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, C.S.I.C. University of Granada, Avenida de las Palmeras No. 4, 18100 Armilla, Granada, Spain; luis.gonzalez@csic.es (L.A.G.-R.); carmen@iact.ugr-csic.es (C.L.-S.); jgavira@iact.ugr-csic.es (J.A.G.)

* Correspondence: dritan.siliqi@ic.cnr.it (D.S.); carcamo@unam.mx (A.M.); Tel.: +39-0805929164 (D.S.); +52-5556224467 (A.M.)

Abstract: Human serum transferrin (Tf) is a bilobed glycoprotein whose function is to transport iron through receptor-mediated endocytosis. The mechanism for iron release is pH-dependent and involves conformational changes in the protein, thus making it an attractive system for possible biomedical applications. In this contribution, two powerful X-ray techniques, namely Macromolecular X-ray Crystallography (MX) and Small Angle X-ray Scattering (SAXS), were used to study the conformational changes of iron-free (apo) and iron-loaded (holo) transferrin in crystal and solution states, respectively, at three different pH values of physiological relevance. A crystallographic model of glycosylated apo-Tf was obtained at 3.0 Å resolution, which did not resolve further despite many efforts to improve crystal quality. In the solution, apo-Tf remained mostly globular in all the pH conditions tested; however, the co-existence of closed, partially open, and open conformations was observed for holo-Tf, which showed a more elongated and flexible shape overall.

Keywords: Small-Angle X-ray Scattering; X-ray Crystallography; human serum transferrin; conformation change; pH-dependence



Citation: Campos-Escamilla, C.; Siliqi, D.; Gonzalez-Ramirez, L.A.; Lopez-Sanchez, C.; Gavira, J.A.; Moreno, A. X-ray Characterization of Conformational Changes of Human Apo- and Holo-Transferrin. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13392. <https://doi.org/10.3390/ijms222413392>

Academic Editor: Weontae Lee

Received: 10 November 2021

Accepted: 7 December 2021

Published: 13 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human serum transferrin (Tf), also known as serotransferrin, is a ~80 kDa glycoprotein that transits blood plasma, whose function is to maintain iron homeostasis by transporting iron from its absorption site to every cell through the blood vessels. Its structure consists of two homologous lobes, an N-terminal lobe and a C-terminal lobe, each subdivided into two domains, in between which a metal-binding site is found, thus allowing Tf to bind two ferric ions per molecule [1,2]. The transferrin completes a cycle in which it transits the bloodstream as holo-Tf (iron-loaded form) and binds to the transferrin receptor (TfR) expressed on endothelial cells. The Tf-TfR complex formed is internalized in endosomes, where the pH is more acidic (5.5) than in the bloodstream (7.4); it is suggested that this pH decrease promotes a conformational change that induces iron release from the metal-binding site of transferrin. Following iron release, apo-Tf (iron-free form) is detached from the TfR and recycled into the bloodstream, where it captures more ferric iron [3,4].

Transferrin's mechanism of iron transport draws special attention because it occurs in endothelial cells of the blood-brain barrier. These tightly bound cells restrict the influx of material from the bloodstream, limiting the possibilities of treatment for various neurological diseases; however, transferrin is able to cross this barrier thanks to receptor-mediated endocytosis [5,6]. Moreover, transferrin is not limited to binding iron, and it may bind other molecules of therapeutic interest [7–11]. Therefore, it is an attractive candidate for

targeted drug delivery. To determine the feasibility of such a system, a thorough structural and bioanalytical characterization of transferrin is essential. X-ray crystallography is one of the most widely used approaches for structure determination, and several Tf models have been obtained so far [1,2,12–14]; however, further research is necessary to generate models that provide deeper knowledge for potential biomedical applications.

Although the behavior of a macromolecule in its physiological environment is not the same as it is *in vitro*, it is helpful to know about it to fine-tune experimental setups. The aim of this contribution is to provide insight into the structural complexity of native human serum transferrin and the challenges that go along with it. When crystallizing transferrin, two important factors must be considered: its great conformational flexibility and the fact that its mechanism of iron release is pH-dependent [2,3,6,15] and has an important impact on its conformational states [16]. In this work, we first summarize the efforts to improve crystal quality which yielded little success in solving the structure via crystallographic methods at a very high resolution. Considering that we are dealing with a highly flexible system, we employed one of the most powerful techniques for obtaining structural information of molecules in a solution: Small-Angle X-ray Scattering (SAXS). Therefore, we further characterized the system using SAXS, exploring not only protein concentration, but also the behavior of the apo- and holo-Tf at three physiologically and experimentally relevant pH conditions. From this study, we can propose conformational details of the mechanism of pH-dependent iron release from transferrin.

2. Results and Discussion

Numerous crystals of apo- and holo-Tf have been grown by the classic vapor-diffusion technique, showing great optical properties and well-defined morphology (Figure S1), but limited diffraction resolution after many trials. This might be due to several factors that affect crystal packing, as well as a high sensitivity to temperature and pH alterations. To optimize the conditions for apo-Tf and holo-Tf crystal growth and X-ray diffraction for structural determination, some dedicated effort has been made, both chemically and physically. We explored the crystallization space chemically by including sets of new additives. Crystals obtained by vapor diffusion were protected with a variety of cryo-protection strategies, from naked crystal diffraction to several standard cryo-protectants tested at different concentrations and soaking times. To provide better control of nucleation and crystal growth, we turned to several non-conventional crystallization techniques [17–20], namely counter-diffusion in agarose gels in several of its possible setups, which also allows the exploration of the supersaturation rate. These efforts have yielded good-looking crystals, but their stability is compromised once they are removed from their growth medium, making it impossible to proceed to X-ray diffraction. In view of these results, the time it would take to obtain crystals with an appropriate size and stability for X-ray diffraction through these techniques' results is impractical.

After exploring a plethora of strategies, a crystallographic model of apo-Tf has been constructed from X-ray diffraction data from one of the best crystals grown under the conventional vapor-diffusion technique. The data collection and refinement statistics for our apo-Tf model, deposited under the 7Q1L PDB code, are summarized in Table 1.

The data for our apo-Tf model are good enough for visualizing the general protein structure, allowing the location of two NAG moieties bound to residue Asn413. Some extra density could be observed after the second NAG element, which points to a potential elongation of the glycosyl chain that could be the key factor hampering crystal quality improvement. As has been reviewed, glycosylation does not necessarily prevent crystallization—it may even help—but the resolution limit and diffraction quality may suffer [21]. Superposition with chain A of glycosylated and non-glycosylated apo forms of human transferrin (PDB ID 2HAV and 2HAU) give RMSD values of 0.56 Å and 0.70 Å, respectively. However, the resolution is still limited in its ability to provide insight into the functional details. Therefore, this called for alternative structural determination strategies that do not require a crystal sample. One of these techniques is Small-Angle X-ray Scat-

tering (SAXS), a low-resolution technique that provides structural information of proteins in quasi-native conditions, as they are studied in a solution [22]. The experimental and calculated SAXS details for both apo- and holo-Tf forms are summarized in Table 2.

Table 1. Data collection and refinement statistics (values in parentheses are for highest-resolution shell).

Protein	Apo-Transferrin
Ligand	NAG
PDB identifier	7Q1L
Data collection	
Beamline	BL14-1
Space Group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions a, b, c (Å)	87.63, 102.15, 199.97
ASU	2
Resolution (Å)	37.24– 3.0 (3.107– 3.0)
R _{merge} (%)	9.32 (116.0)
I/σ _I	12.13 (1.16)
Completeness (%)	99.81 (99.82)
Unique reflections	36660 (3606)
Multiplicity	7.3 (8.0)
CC _(1/2)	0.999 (0.559)
Refinement	
Resolution (Å)	37.24– 3.00
R _{work} /R _{free} (%)	22.03 / 25.01
No. atoms	10716
Protein	10592
Ligands	235
Water	7
B-factor (Å ²)	120.52
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å)	0.005
Bond angles (°)	0.85
Ramachandran (%)	
Favored	92.95
Allowed	6.75
Outliers	0.30

SAXS analysis of the one-dimensional SAXS experimental curves (Figure 1A) was initially performed to judge the quality of the data and to obtain basic structural information related to the size and shape of the studied proteins. One such structural parameter is the radius of gyration (R_g) calculated from the slope of the Guinier plot described as $\ln(I_s)$ vs. s^2 , where $s = 4 \pi \sin(\theta)/\lambda$ is the scattering vector (2θ is the scattering angle and λ is the wavelength) [23]. For globular proteins, this plot is expected to be linear at low s , corresponding to values of $s \cdot R_g$ into Guinier zone (1.0–1.3). The linearity of the Guinier plot is considered a quality measurement of the data, but it does not ensure the ideality of the sample. Guinier plots for apo-Tf and holo-Tf were linear (Figure S2), and the R_g value had an average value of 31 Å and 33 Å (see Table 2 for more details) for apo and holo, respectively, and no differences were noted at different pH values.

The dimensionless Kratky plot was used to investigate the flexibility (and shape) of the proteins (Figure 1B). The maximum value of 1.104 at $\sqrt{3}$ (dashed black line) corresponds to a globular and compact protein, such as the bovine serum albumin (BSA) protein used as a standard in these experiments. For holo-Tf at different pH values (red curves), the maxima were shifted to the right (larger than $\sqrt{3}$) and were higher than the standard, which denoted a well-folded but asymmetric shape. For apo-Tf (blue curves), no differences

were observed at different pH values, compared to holo-Tf, especially at the lowest level of pH. Furthermore, in Table 2, the values for the Porod coefficient are shown, and it can be noted that for the holo form, the protein is more flexible than for apo. In conclusion, by using R_g , D_{max} , Kratky plot, and Porod coefficient, it is possible to see that holo-Tf is more elongated and more flexible, and this is more evident at low pH.

Table 2. Experimental and calculated SAXS data.

Data Collection Parameters						
Beamline	BM29, ESRF					
Detector	Pilatus3 2M in vacuum					
Beam size (mm)	0.2 × 0.2					
Energy (keV)	12.5					
Sample-to-detector distance (mm)	2.867					
s range (\AA^{-1})	0.0025–0.6					
Exposure time (s)	1					
Temperature (K)	293					
Data collection mode	In batch, automated sample changer					
Structural parameters	apo-Tf			holo-Tf		
	pH 8.0	pH 7.0	pH 5.5	pH 8.0	pH 7.0	pH 5.5
Concentration range (mg mL ⁻¹)	5	5	5	5	5	5
s Interval for Fourier inversion (\AA^{-1})	0.014–0.258	0.015–0.258	0.017–0.258	0.018–0.247	0.021–0.249	0.015–0.248
R_g (from P(r)) (\AA)	31.2 ± 0.02	31.2 ± 0.02	31.2 ± 0.02	33.0 ± 0.05	33.2 ± 0.05	34.2 ± 0.06
R_g (from Guinier approximation) (\AA)	31.1 ± 0.00	31.1 ± 0.00	31.1 ± 0.01	32.4 ± 0.01	33.4 ± 0.01	33.7 ± 0.01
s R_g limits (from Guinier approximation)	0.44–1.29	0.44–1.28	0.21–1.30	0.56–1.28	0.66–1.30	0.48–1.30
D_{max} (\AA)	94.2	96.4	98.4	131.0	135	146
Porod coefficient	3.7	3.7	3.7	3.5	3.0	3.0
Porod volume estimate (nm ³)	104	106	106	106	103	105
Model excluded volume (nm ³)	119					
Molecular Mass (kDa) from:						
Porod volume	66.0					
Excluded volume (×0.5)	60.0					
From sequence	77.0					
Modeling Ambiguity	2.1 (might be ambiguous)			2.4 (might be ambiguous)		
SASBDB code	SASDMP7	SASDMN7	SASDMM7	SASDMS7	SASDMR7	SASDMM7
SAXS software employed						
Primary data reduction	ESRF online software tools					
Data processing	ScÅtter IV / ATSAS 3.0.4					
Computation of model intensities	CRY SOL (ATSAS)					
Modeling	DAMMIN (ATSAS), SREFLEX (ATSAS), MultiFoxy					

The maximum size of a protein (D_{max}) can be obtained from analysis of the SAXS data by means of the Pair-Distance Distribution Function (P(r)) (Figure 1C), which corresponds to the distribution of distances between all the electrons within the protein. The Pair-Distance Distribution Function is obtained using the Indirect Fourier Transformation [24], with a trial-and-error procedure at the end of which the obtained D_{max} corresponds to the smoothest and most positive distribution. Differences in the D_{max} of a protein relate to conformational changes. Additionally, it is possible to calculate the R_g from the Pair-Distance Distribution Function and compare its value with that estimated from the Guinier plot. In the case of holo-Tf, differences in D_{max} were observed as the pH value lowered, suggesting a conformational change induced by an acidic environment (Table 2). For apo-Tf, no differences were observed at different pH values with respect to holo-Tf. For the latter, P(r) distribution (Figure 1C), as well as R_g and D_{max} values (Table 3), showed a more elongated molecule, particularly at the lowest pH.

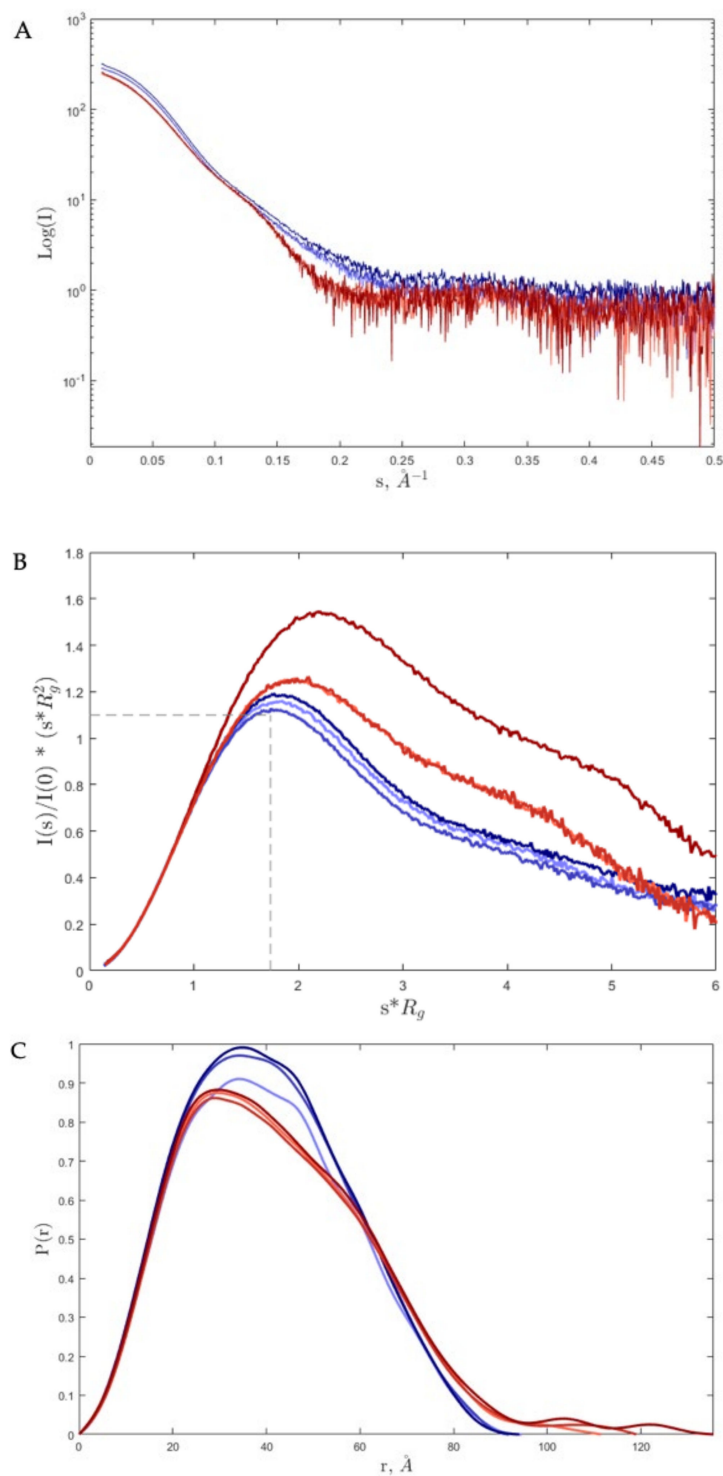


Figure 1. (A). Log₁₀ SAXS intensity versus scattering vector, s . The plotted range represents only positive data within the specified s -range. (B). Dimensionless Kratky plot. The maximum value (intersection of dashed black lines) at Guinier-Kratky point (1.732, 1.1) corresponds to the main peak position for globular particles. (C). Pair-Distance, $P(r)$, Distribution Function. The maximum dimension, D_{max} , is the largest non-negative value that supports a smooth distribution function. The curves are overlapped; the red and blue curves correspond to iron-loaded transferrin (holo-Tf) and iron-free transferrin (apo-Tf), respectively. The color gradient for both from light to dark represents the change of pH from 8.0 to 5.5, correspondingly.

Table 3. Experimental and calculated data for apo- and holo-Tf at three different pH values.

apo-Tf					
pH 8.0					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	6.5
1	1	1	30.4	103.4	3.6
2	1	0.9	29.9	103.2	1.6
	2	0.1	36.7	127.1	
pH 7.0					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	5.8
1	1	1	30.2	103.2	3.2
2	1	0.88	29.9	103.4	1.2
	2	0.12	33.8	119.6	
pH 5.5					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	8.5
1	1	1	30.1	103.1	6.3
2	1	0.91	30.1	103.1	1.4
	2	0.09	33.8	119.9	
holo-Tf					
pH 8.0					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	28.6
1	1	1	31.7	106.4	7.3
3	1	0.5	31.6	103.0	4.1
	2	0.26	29.8	102.5	
	3	0.24	37.31	127.7	
pH 7.0					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	45.6
1	1	1	31.9	109.6	13.2
3	1	0.44	31.9	104.0	6.43
	2	0.35	30.4	103.9	
	3	0.21	37.5	132.9	
pH 5.5					
State	Conformation	Fraction	R _g	D _{max}	χ ²
0	0	1	29.5	102.4	33.6
1	1	1	31.9	109.9	4.59
3	1	0.57	31.4	102.4	2.4
	2	0.13	29.5	101.9	
	3	0.30	37.4	132.6	

For all the data sets, SAXS modeling was performed by using an ab initio reconstruction of a protein structure by simulated annealing using a single-phase dummy atom [25]. For apo-Tf, independently of the pH, the reconstructions are the same (superposed), and the 2HAV (chain A) model fit very well into it. For simplification, in Figure 2A, this

is shown only for pH 8.0. On the contrary, for holo-Tf, the models showed differences (more elongated) with respect to the apo-Tf models (more globular) and especially, as expected from global parameters (R_g and D_{max}), for pH 5.5. For simplification, the last case (holo-Tf at pH 5.5) is shown in Figure 2B, indicating that the holo-Tf changed its conformation with respect to the apo-Tf and that this depends on pH changes. We used the SREFLEX program [26], which uses normal mode analysis (NMA) to estimate the flexibility of high-resolution models of biological macromolecules and improves their agreement with experimental SAXS data. In Figure 2C, we show the fitting into the DAMMIN model of the refined and improved (the χ^2 is decreased from 33.5 to 1.74) holo-Tf model by SREFLEX.

To further investigate the pH dependence of transferrin, we employed a SAXS-based pseudo-atomic modeling approach using the MultiFoXS server [27]. This technique can be used for the structural characterization of flexible proteins in a solution if a high-resolution structure or a comparative model of the studied protein is available. The procedure consists of a low-resolution rigid-body fitting to the experimental data that includes flexibility between the folded domains that make up the structure. This is performed by sampling random conformations along flexible residues and considering that an ensemble of multiple conformations contributes to a single observed SAXS profile. As a starting model, we used chain A from the 2HAV structure (Figure 3A, State 0) after removing the ligand, and hinge residues (T336 and L671) were identified by the HingeProt program [28]. The MultiFoXS server sampled over 10,000 conformations, using the hinge residues as above, calculated their SAXS profiles, and scored multi-state models according to their fitting to the experimental profile. The state number corresponds to the number of possible conformations. For instance, State 0 corresponds to the starting model; then, from State 1 to State 2, the fitting of the weighted calculated profile for two conformations is lowered to the χ^2 value (better fitting). The same is true from State 2 to State 3. Therefore, the higher the number of states, the higher the flexibility of the model. In Table 3, all the data are summarized. For each conformation, the value of the fraction, R_g , and D_{max} are indicated for each State, as well as the corresponding χ^2 fitting value. In Figure 3B–D, the conformations for State 3 (three conformations) of holo-Tf at pH 5.5 are shown, with their contribution shown as a percentage (instead of the fraction as in Table 3), indicating the two hinge residues (Figure 3A) in the initial model (State 0). We did not observe any conformational changes for the apo form. Indeed, 90% (Table 3) of the available conformations are populated by the “closed” conformation, corresponding to the initial model.

The SAXS analyses performed here at different pH conditions confirm that there are different conformations co-existing in the solution. Although for apo-Tf there are no major differences observed, holo-Tf shows a predominant population of a partially open conformation, besides the open and closed conformations, as evidenced by the R_g and D_{max} values for the three-state model at all pH values (Figure 3). These results also show that holo-Tf is more elongated and flexible than the apo-form, suggesting that the presence of iron has an impact on the stability of transferrin in the solution. Furthermore, the partially open conformation in holo-Tf (Table 3) may suggest a monoferric state, wherein transferrin has only one of its lobes loaded with iron.

An interesting observation when analyzing the holo-Tf crystals grown for crystallographic analysis is that they lose the coloration that is indicative of the presence of iron, as observed when holo-Tf is in a solution. This has led us to hypothesize that these crystals correspond to a polymorph of apo-Tf, and iron is probably lost during the crystallization process, as the optical properties of transferrin differ depending on the amount of iron present within the protein [29]. This notion is also supported by the differences between apo-Tf and holo-Tf observed with SAXS.

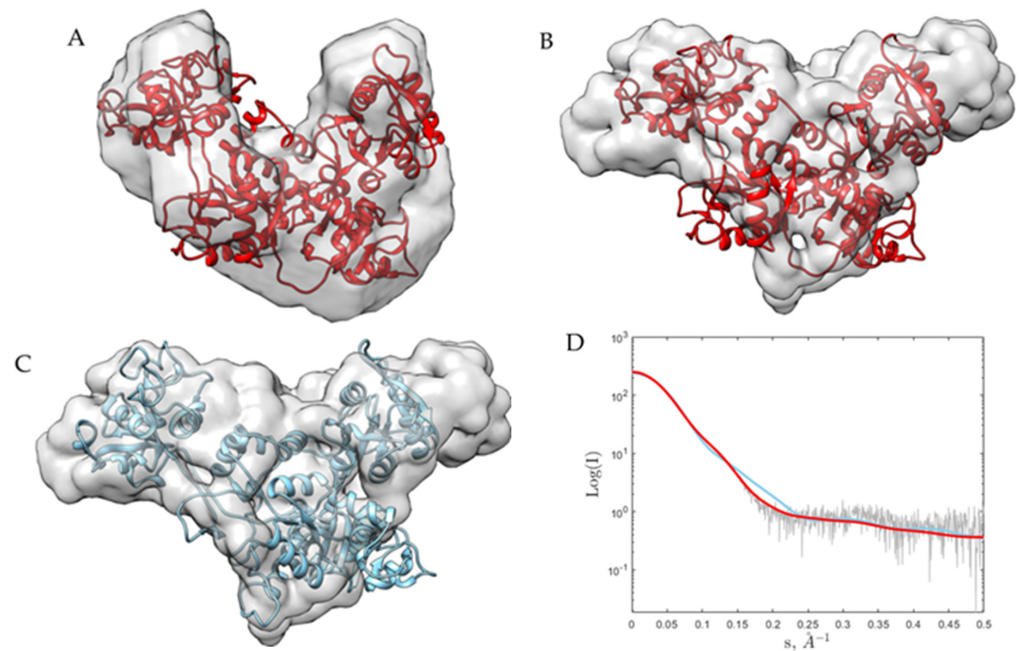


Figure 2. (A) and (B), 2HAV (chain A) model fit into DAMMIN (ab initio SAXS modeling) for apo-Tf at pH 8.0 and holo-Tf at pH 5.5, respectively. (C), 2HAV (chain A) model refined by SREFLEX fit into DAMMIN (ab initio SAXS modeling) for holo-Tf at pH 5.5. (D), Fitting of the calculated SAXS for the 2HAV model (chain A) (red) and after the refinement (SREFLEX) (cyan) scattering curves for holo-Tf at pH 5.5 compared to the experimental scattering signal (blue).

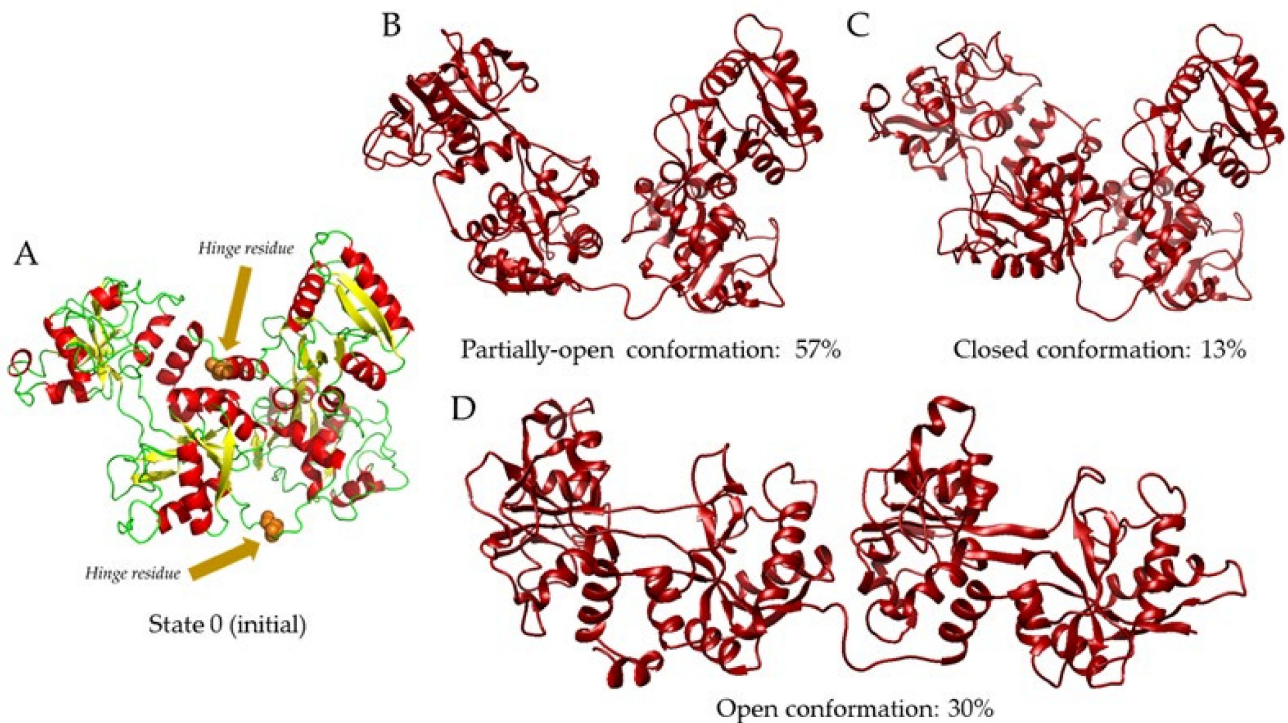


Figure 3. SAXS-based pseudo-atomic modeling using MultiFoXS for holo-Tf at pH 5.5. Multi-state models at different pH values were obtained after sampling over 10,000 conformations using the 2HAV (chain A) structure as a starting model and Thr371 and Leu671 as hinge residues (shown by spheres), corresponding to State 0 (A). For State 3, three conformations were observed in the following proportions: partially open, 57% (B); closed, 13% (C); open, 30% (D).

3. Materials and Methods

3.1. Purification of Transferrin

Human serum transferrin was commercially obtained (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in both its iron-free (apo) and iron-loaded (holo) forms. The same conditions were used for purifying both. The proteins were suspended in a buffer containing 50 mM TRIS-HCl pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and filtered through a 0.22 µm pore. The purification was accomplished by ion-exchange chromatography in a HiTrap Q HP 5 mL column using a linear gradient from 0 to 100% high salt buffer (50 mM TRIS-HCl pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and 1.0 M NaCl). After elution, apo- and holo-Tf were dialyzed against 15 mM HEPES pH 8.0 with 20 mM NaHCO₃ and 50 mM NaCl using a 6–8 kDa MWCO membrane, at 4 °C for 2 h, then other 2 h with a fresh buffer, and finally overnight with a fresh buffer. Finally, apo and holo were concentrated by centrifugation in Amicon tubes at 3000 × g in 15-min cycles at 4 °C.

3.2. Crystallization and Macromolecular Crystallography

Transferrin crystals were grown at a stock concentration of 20 mg mL⁻¹ using Index screen #88 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) condition as the precipitant solution, which consists of 0.2 M ammonium citrate tribasic, pH 7, and 20% PEG 3350. Crystals were grown at 18 °C by the vapor-diffusion method as previously standardized [13,30].

Prior to data collection, crystals were subject to cryo-preservation by being flash cooled in liquid nitrogen and then stored. Because crystal quality was the main issue, several protocols were assayed, including the use of several cryoprotectants (i.e., glycerol, PEG 200, MPD, etc.) at different concentrations and soaking times, the use of naked crystals, or long soaking (24 h) for crystals obtained in capillaries by the counter-diffusion technique. The crystal quality of a total of 103 different samples was evaluated from X-ray diffraction data collected from beamlines XALOC of ALBA (Barcelona, Spain), ID-30B, ID23-1, ID30A-3 of ESRF (Grenoble, France), as well as from SSRL [31,32] synchrotron sources.

3.3. X-ray Diffraction

The X-ray data collection was performed at the microfocus beamline BL-14-1 at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory (Menlo Park, CA, USA). The crystals were cryo-protected with 30% (v/v) glycerol and immediately put into the X-ray beam under cryogenic conditions at 100 K. The wavelength of incident X-rays was 1.13 Å with an Eiger 16M detector. Data-collection strategies included high-redundancy data, and each sample was rotated in 0.25° increments. The HKL3000 [33] suite and XDS [34] were used to process initial data that were further merged, scaled, and reduced with the Aimless [35] of the CCP4 software suite [36]. Molecular replacement was achieved using chain A of the apo-Tf model PDB ID 2HAV as the search model in Molrep [37]. Initial refinement began with Refmac [38] and was finalized with phenix.refine [39]. Final model quality was assessed with MolProbity [40], and the files were prepared for deposition with PDB extract [41]. Refinement statistics and quality indicators are summarized in Table 1.

3.4. Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

SAXS experiments for transferrin were carried out at BM29 [42,43] beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The wavelength of incident X-rays was 1 Å, and the Pilatus3 2M detector, in vacuum, was placed 2.867 m from the sample, leading to a scattering vector range from 0.025 to 6 nm⁻¹. To avoid radiation damage, samples with a volume of 40 µL were measured using a robotic sample handler [44] in flow-through mode, collecting over 10 frames lasting 1 s for each sample. Frames were automatically checked for radiation damage, and those not displaying any radiation damage were then averaged [45]. Before and after each sample, buffer scattering was collected and subtracted from sample scattering. The buffer consisted of 15 mM HEPES, 20 mM NaHCO₃, and 50 mM NaCl, tested at pH 8.0, 7.0, and 5.5. To assess

concentration effects, a dilution series consisting of 2 concentrations (2.5 and 5 mg mL⁻¹), for both Tf-apo and Tf-holo samples, was measured. The stock protein sample was at a concentration of 20 mg mL⁻¹ and it was diluted up to 5 mg mL⁻¹ and 2.5 mg mL⁻¹, using the buffer corrected at pH 7.0 and 5.5 for the tests on these pH. We did not check the final pH of the solution, but we calculate that during the dilution, the pH should not be significantly different from the expected value. Since the scattering curves for Tf did not display any concentration dependence at the highest concentrations (Figures S3–S8), this concentration (5 mg mL⁻¹) was used in our analysis. Merging, subtracting, and subsequent analysis were performed using PRIMUS [46] and Scatter [47] software. The SAXS modeling was performed by using DAMMIN [25], SREFLEX [26], and MultiFoXS [27] software. Theoretical scattering curves were calculated and compared to experimental SAXS profiles using CRY SOL [48]. Modeling and fitting figures were obtained with Chimera [49].

4. Conclusions

The Small-Angle X-ray Scattering data clearly showed a strong pH dependency and open-structured conformation at different times and pH values. Static snapshots that we attempted to derive from X-ray diffraction data were hampered by intrinsically low crystal quality and/or high sensitivity to crystal manipulation. We can conclude that the glycosylation is perhaps the main reason that all the efforts to improve crystal quality were not successful, along with the high flexibility of the structure, as shown in the SAXS experiments in the solution. From this study, we can propose conformational details of the mechanism of pH-dependent iron release from transferrin, including a monoferric intermediate state, which will have important biomedical research impacts on the transport of iron or ligands against brain diseases.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222413392/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.M., D.S., and J.A.G.; methodology and experimental parts, C.C.-E., A.M., L.A.G.-R., C.L.-S., and D.S.; data collection for X-ray and SAXS analyses, D.S. and J.A.G.; writing—review and editing, C.C.-E., D.S., J.A.G., L.A.G.-R., and A.M.; funding acquisition, A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: DGAPA-PAPIIT project No. 207922.

Institutional Review Board Statement: The funders had no role in the design of the study; in the data collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish results.

Data Availability Statement: The X-ray data and the refined structure were submitted to the wwPDB (Protein Data Bank) with a deposition ID: D_1292118813 with an assigned accession code (s): PDB ID 7Q1L. SAXS data were submitted to and validated by SASBDB (<https://www.sasbdb.org/>) [50], with assigned accession codes: SASDMP7, SASDMN7, SASDMM7, SASDMS7, SASDMR7, SASDMM7 for apo- and holo-TF at pH 8.0, 7.0, and 5.5, respectively.

Acknowledgments: One of the authors (C.C.-E.) is a doctoral student from the *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* and has received CONACyT fellowship 856528. One of the authors (D.S.) acknowledges SAXS data collection at B29 of ESRF (Grenoble, France) through Italian BAG MX2363 and Francesco Baldassarre (IC-CNR, Bari, Italy) for the sample preparations. The contents of this publication are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of NIGMS or NIH. One of the authors (J.A.G.) acknowledges X-ray diffraction data collected at beamlines XALOC of ALBA (Barcelona, Spain), ID-30B, ID23-1, ID30A-3 of ESRF (Grenoble, France). One of the authors (A.M.) acknowledges DGAPA-UNAM for the support during a sabbatical year at the I.A.C.T. and C.S.I.C.—University of Granada in Spain. This project was also supported by the grant DGAPA-PAPIIT project No. 207922. Use of the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, is supported by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. DE-AC02-76SF00515. The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by

the DOE Office of Biological and Environmental Research and by the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences (P30GM133894).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wang, M.; Lai, T.P.; Wang, L.; Zhang, H.; Yang, N.; Sadler, P.J.; Sun, H. “Anion clamp” allows flexible protein to impose coordination geometry on metal ions. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7867–7870. [[CrossRef](#)]
2. Mizutani, K.; Toyoda, M.; Mikami, B. X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 203–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bourassa, P.; Alata, W.; Tremblay, C.; Paris-Robidas, S.; Calon, F. Transferrin Receptor-Mediated Uptake at the Blood–Brain Barrier Is Not Impaired by Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 583–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Campos-Escamilla, C. The role of transferrins and iron-related proteins in brain iron transport: Applications to neurological diseases. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2021**, *123*, 133–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fernandes, M.A.; Hanck-Silva, G.; Baveloni, F.G.; Junior, J.A.O.; De Lima, F.T.; Eloy, J.O.; Chorilli, M. A Review of Properties, Delivery Systems and Analytical Methods for the Characterization of Monomeric Glycoprotein Transferrin. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2020**, *51*, 399–410. [[CrossRef](#)]
7. Śliwińska-Hill, U. Interaction of imatinib mesylate with human serum transferrin: The comparative spectroscopic studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *173*, 468–475. [[CrossRef](#)]
8. Śliwińska-Hill, U. Spectroscopic studies of simultaneous binding of cyclophosphamide and imatinib mesylate to human holo-transferrin. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *252*, 119538. [[CrossRef](#)]
9. Shamsi, A.; Mohammad, T.; Khan, M.S.; Shahwan, M.; Husain, F.M.; Rehman, T.; Hassan, I.; Ahmad, F.; Islam, A. Unraveling Binding Mechanism of Alzheimer’s Drug Rivastigmine Tartrate with Human Transferrin: Molecular Docking and Multi-Spectroscopic Approach towards Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules* **2019**, *9*, 495. [[CrossRef](#)]
10. Shamsi, A.; Shahwan, M.; Ahamad, S.; Hassan, I.; Ahmad, F.; Islam, A. Spectroscopic, calorimetric and molecular docking insight into the interaction of Alzheimer’s drug donepezil with human transferrin: Implications of Alzheimer’s drug. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *38*, 1094–1102. [[CrossRef](#)]
11. Amroabadi, M.K.; Taheri-Kafrani, A.; Saremi, L.H.; Rastegari, A.A. Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and apo-human serum transferrin as a drug carrier protein. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yang, N.; Zhang, H.; Wang, M.; Hao, Q.; Sun, H. Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 999. [[CrossRef](#)]
13. Wally, J.; Halbrooks, P.J.; Vonrhein, C.; Rould, M.A.; Everse, S.J.; Mason, A.B.; Buchanan, S.K. The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24934–24944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Curtin, J.P.; Wang, M.; Cheng, T.; Jin, L.; Sun, H. The role of citrate, lactate and transferrin in determining titanium release from surgical devices into human serum. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 471–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Edwards, K.C.; Kim, H.; Ferguson, R.; Lockart, M.; Vincent, J.B. Significance of conformation changes during the binding and release of chromium(III) from human serum transferrin. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *206*, 111040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kulakova, A.; Indrakumar, S.; Sønderby, P.; Gentiluomo, L.; Streicher, W.; Roessner, D.; Frieß, W.; Peters, G.H.J.; Harris, P. Structural-stability studies on recombinant human transferrin. *Biorxiv* **2019**, 742957, preprint. [[CrossRef](#)]
17. Otálora, F.; Gavira, J.A.; Ng, J.D.; García-Ruiz, J.M. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 26–37. [[CrossRef](#)]
18. Gavira, J.A. Current trends in protein crystallization. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *602*, 3–11. [[CrossRef](#)]
19. Gavira, J.A.; Otálora, F.; González-Ramírez, L.A.; Melero, E.; Van Driessche, A.E.; García-Ruiz, J.M. On the Quality of Protein Crystals Grown under Diffusion Mass-transport Controlled Regime (I). *Crystals* **2020**, *10*, 68. [[CrossRef](#)]
20. Ng, J.D.; Gavira, J.A.; García-Ruiz, J.M. Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 218–231. [[CrossRef](#)]
21. Mesters, J.R.; Hilgenfeld, R. Protein Glycosylation, Sweet to Crystal Growth? *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2251–2253. [[CrossRef](#)]
22. Gräwert, T.W.; Svergun, D.I. Structural Modeling Using Solution Small-Angle X-ray Scattering (SAXS). *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 3078–3092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Guinier, A. La diffraction des rayons X aux très petits angles: Application à l’étude de phénomènes ultramicroscopiques. *Ann. Phys.* **1939**, *11*, 161–237. [[CrossRef](#)]
24. Glatter, O. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *J. Appl. Crystallogr.* **1977**, *10*, 415–421. [[CrossRef](#)]
25. Svergun, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2879–2886. [[CrossRef](#)]
26. Panjkovich, A.; Svergun, D.I. Deciphering conformational transitions of proteins by small angle X-ray scattering and normal mode analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *18*, 5707–5719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Schneidman-Duhovny, D.; Hammel, M.; Tainer, J.; Sali, A. FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W424–W429. [[CrossRef](#)]

28. Emekli, U.; Schneidman-Duhovny, D.; Wolfson, H.J.; Nussinov, R.; Haliloglu, T. HingeProt: Automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2007**, *70*, 1219–1227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bogaerts, J.; Johannessen, C. On/off resonance Raman optical activity of human serum transferrin. *J. Raman Spectrosc.* **2019**, *50*, 641–646. [[CrossRef](#)]
30. Flores-Ibarra, A.; Campos-Escamilla, C.; Guerra, Y.; Rudiño-Piñera, E.; Demitri, N.; Polentarutti, M.; Cuéllar-Cruz, M.; Moreno, A. Novel Devices for Transporting Protein Crystals to the Synchrotron Facilities and Thermal Protection of Protein Crystals. *Crystals* **2018**, *8*, 340. [[CrossRef](#)]
31. Russi, S.; Song, J.; McPhillips, S.E.; Cohen, A.E. The Stanford Automated Mounter: Pushing the limits of sample exchange at the SSRL macromolecular crystallography beamlines. *J. Appl. Crystallogr.* **2016**, *49*, 622–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. González, A.; Moorhead, P.; McPhillips, S.E.; Song, J.; Sharp, K.; Taylor, J.R.; Adams, P.; Sauter, N.K.; Soltis, S.M. Web-Ice: Integrated data collection and analysis for macromolecular crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41*, 176–184. [[CrossRef](#)]
33. Minor, W.; Cymborowski, M.; Otwinowski, Z.; Chruszcz, M. HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution—From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 859–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kabsch, W. Research papers XDS research papers. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132. [[CrossRef](#)]
35. Evans, P.R.; Murshudov, G.N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1204–1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Winn, M.D.; Ballard, C.C.; Cowtan, K.D.; Dodson, E.J.; Emsley, P.; Evans, P.R.; Keegan, R.; Krissinel, E.B.; Leslie, A.G.W.; McCoy, A.; et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vagin, A.A.; Teplyakov, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025. [[CrossRef](#)]
38. Murshudov, G.N.; Skubák, P.; Lebedev, A.A.; Pannu, N.S.; Steiner, R.A.; Nicholls, R.A.; Winn, M.D.; Long, F.; Vagin, A.A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Afonine, P.V.; Mustyakimov, M.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Moriarty, N.W.; Langan, P.; Adams, P. Joint X-ray and neutron refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 1153–1163. [[CrossRef](#)]
40. Chen, V.B.; Arendall, W.B.I.; Headd, J.J.; Keedy, D.A.; Immormino, R.M.; Kapral, G.J.; Murray, L.W.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21. [[CrossRef](#)]
41. Yang, H.; Guranovic, V.; Dutta, S.; Feng, Z.; Berman, H.M.; Westbrook, J. Automated and accurate deposition of structures solved by X-ray diffraction to the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1833–1839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pernot, P.; Theveneau, P.; Giraud, T.; Fernandes, R.N.; Nurizzo, D.; Spruce, D.; Surr, J.; McSweeney, S.; Round, A.; Felisaz, F.; et al. New beamline dedicated to solution scattering from biological macromolecules at the ESRF. *J. Phys. Conf. Ser.* **2010**, *247*, 012009. [[CrossRef](#)]
43. Blanchet, C.E.; Spilotros, A.; Schwemmer, F.; Graewert, M.A.; Kikhney, A.; Jeffries, C.M.; Frank, S.; Mark, D.; Zengerle, R.; Cipriani, F.; et al. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 431–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Round, A.; Felisaz, F.; Fodinger, L.; Gobbo, A.; Huet, J.; Villard, C.; Blanchet, C.E.; Pernot, P.; McSweeney, S.; Rössle, M.; et al. BioSAXS Sample Changer: A robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 67–75. [[CrossRef](#)]
45. Franke, D.; Kikhney, A.G.; Svergun, D.I. Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* **2012**, *689*, 52–59. [[CrossRef](#)]
46. Konarev, P.; Volkov, V.V.; Sokolova, A.; Koch, M.H.J.; Svergun, D.I. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 1277–1282. [[CrossRef](#)]
47. Förster, S.; Apostol, L.; Bras, W. Scatter: Software for the analysis of nano- and mesoscale small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 639–646. [[CrossRef](#)]
48. Svergun, D.I.; Barberato, C.; Koch, M.H.J. CRY SOL— a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 768–773. [[CrossRef](#)]
49. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
50. Kikhney, A.G.; Borges, C.R.; Molodenskiy, D.S.; Jeffries, C.M.; Svergun, D.I. SASBDB: Towards an automatically curated and validated repository for biological scattering data. *Protein Sci.* **2019**, *29*, 66–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



The role of transferrins and iron-related proteins in brain iron transport: applications to neurological diseases

Camila Campos-Escamilla*

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad de Posgrado, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

*Corresponding author: E-mail: camila.cescamilla@gmail.com

Contents

1. Introduction	134
2. Brain iron transport	135
3. Iron and neurodegeneration	138
3.1 Oxidative stress and ferroptosis	139
3.2 Damage to the blood-brain barrier (BBB)	142
3.3 Alzheimer's disease (AD)	142
3.4 Parkinson's disease (PD)	143
3.5 Huntington's disease (HD)	144
3.6 Multiple sclerosis (MS)	145
3.7 Sanfilippo syndrome	145
4. Iron transport related proteins	146
4.1 Transferrin receptors 1 and 2 (TfR1 and TfR2)	146
4.2 Divalent metal transporter 1 (DMT1)	149
4.3 Ferroportin 1 (Fpn1)	149
4.4 Ferritin	150
4.5 Hephaestin (Heph)	150
4.6 Ceruloplasmin (Cp)	151
5. Transferrins	151
5.1 Human serum transferrin (Tf)	152
6. Perspectives on the use of transferrin as a drug delivery system	154
7. Concluding remarks	156
Acknowledgments	156
References	156

Abstract

Iron transport in the central nervous system (CNS) is a highly regulated process in which several important proteins participate to ensure this important metal reaches its sites of action. However, iron accumulation has been shown to be a common factor in different neurological disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, Multiple Sclerosis, and Sanfilippo syndrome. This review is divided into four parts. The first part describes brain iron transport in homeostasis, mentioning the main proteins involved, whereas the second part contrasts the consequences of iron dysregulation, elaborating on its role in the aforementioned neurodegenerative diseases. The third part details the functions of the main proteins involved in brain iron homeostasis and their role in neurodegeneration. In the fourth part, in order to highlight the importance of transport proteins, the focus is set on human serum transferrin, the main iron transport protein. This final part describes perspectives about the mechanisms and chemical properties of human transferrin for the development of potential targeted drug delivery systems across the blood-brain barrier (BBB) or enhancers for the treatment of neurological diseases.



1. Introduction

Neurological diseases are a topic of major interest given the complexity of their nature. Particularly, neurodegenerative diseases are taking the spotlight because as the elderly population increases, the incidence of age-related maladies increases as well (Acevedo, Masaldan, Opazo, & Bush, 2019; Hodgson et al., 2020; Licher et al., 2019; McWhirter, Ritchie, Stone, & Carson, 2020; Sfera, Bullock, Price, Inderias, & Osorio, 2018). Nowadays, the search for treatments for neurodegenerative diseases remains a challenge, as the knowledge about their causes is still rather unknown, and some of them are still considered to be part of the natural course of aging; such is the case of Alzheimer's disease (Chang, 2019; Mills, Dong, Wang, & Xu, 2010; Muhoberac & Vidal, 2019; Wang et al., 2020). However, neurodegeneration is not exclusive of the geriatric population, since it is also observed in Sanfilippo Syndrome, a disorder that affects children (Heon-Roberts, Nguyen, & Pshezhetsky, 2020). Therefore, it is important to analyze the panorama of disease in order to understand the potential source of the problem. Several studies have been reviewed over the last decade to shed light on the causes and factors that lead to neurodegeneration, and thus to find the means to deal with this health issue. These studies have shown an important relationship between iron and neurological alterations, particularly neurodegeneration (Acevedo et al., 2019; Ashraf, Clark, & So, 2018;

Chang, 2019; Rouault, 2013; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Wang et al., 2020). It is known that the lack of sufficient iron leads to deficient overall brain performance at any stage of life (Hare, Ayton, Bush, & Lei, 2013; Scassellati, Bonvicini, Benussi, Ghidoni, & Squitti, 2020); however, increasing evidence shows that iron overload becomes more common in people of older age and is linked to neurodegenerative diseases (Buijs et al., 2017; Picca et al., 2019; Uranga & Salvador, 2018; Wawer, Jennings, & Fairweather-Tait, 2018). On the other hand, a close look to the biomolecules that contribute to the regulation of some of the main biochemical processes, such as transferrin and other iron transport-related proteins, which become affected when disease strikes, is also a good starting point (Acevedo et al., 2019; Chang, 2019; Guan, Wang, Lu, & Zhao, 2020; Ingrassia, Garavaglia, & Memo, 2019; Muhoberac & Vidal, 2019; Prakash, Dhaliwal, Kumar, & Majeed, 2017; Singh, Pandey, Vishwakarma, & Modi, 2019; Uranga & Salvador, 2018; Wang et al., 2020). In the following sections, we will discuss the main mechanisms of brain iron transport, the role of iron in neurodegeneration, the main iron transport-related proteins, and some perspectives on the use of transport proteins, namely human serum transferrin, for the treatment of neurological diseases.



2. Brain iron transport

Iron is an important metal involved in various physiological processes, such as ATP generation and DNA replication (Chang, 2019; Mills et al., 2010; Qian & Ke, 2019). The brain is the organ with the highest energy demand; thus, the mitochondrial electron transport chain must keep up with ATP production. In order to achieve this, iron must be present in sufficient proportion to maintain its function as a cofactor for mitochondrial enzymes such as ferredoxins and cytochromes. Particularly, iron is essential for a variety of neurological processes (McCarthy & Kosman, 2015; Rouault, 2013). In neuronal cells, iron is necessary for dopaminergic neurotransmitter synthesis and myelination of axons. Iron is involved in the synthesis and signaling of dopamine, noradrenaline, adrenaline and serotonin, as it acts as a cofactor for proteins such as phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and tryptophan hydroxylase (Hare et al., 2013). Myelination is an essential process for protection and conductivity-optimization in axons in the central nervous system (CNS), which takes an important role when pathogenesis appears. In the case of iron deficiency, myelin components

are decreased; consequently, myelination impairment slows neuronal conduction and reflex response (Hare et al., 2013; Möller et al., 2019; Nasrabady, Rizvi, Goldman, & Brickman, 2018).

Iron transport in the brain is effectuated by several pathways; namely, transferrin-dependent iron transport, non-transferrin bound iron (NTBI) mobilization, uptake and export by and from neurons, oligodendrocytes, astrocytes, and microglia (Hohnholt & Dringen, 2013; Roy Sarkar & Dutta, 2019). Although there are other molecular processes involved in iron uptake in each cell type, the Tf/TfR1/DMT1 iron uptake mechanism, which involves transferrin (Tf), transferrin receptor 1 (TfR1), and divalent metal transporter 1 (DMT1), is the main one present in neurons, astrocytes, and microglia. In the case of oligodendrocytes, this mechanism has only been found in early stages, so the main iron source in mature oligodendrocytes is provided by ferritin (Möller et al., 2019; Todorich, Zhang, Slagle-Webb, Seaman, & Connor, 2008). On the other hand, cellular iron export is mainly mediated by ferroportin 1 (Fpn1), in conjunction with ceruloplasmin (Cp)—a ferroxidase that converts ferrous iron to ferric iron—in the case of neurons and astrocytes, or with hephaestin (Heph) in the case of neurons, as well, oligodendrocytes, and microglia (Bonaccorsi di Patti et al., 2018; Jiang et al., 2015; Qian & Ke, 2019; Sokolov et al., 2017, 2017; White et al., 2012). The mechanisms of iron transport are illustrated in Fig. 1, and more detailed information about each of the aforementioned proteins involved in iron transport will be presented in section 4.

As much as iron is needed for several functions in the brain, this important organ requires a very strict control on its intake. This control is possible thanks to two main structures: the blood-brain barrier (BBB), and the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) (Duck, Simpson, & Connor, 2017; McCarthy & Kosman, 2015; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Simpson et al., 2015). The BBB consists of several tightly bound brain vascular endothelial cells (BVECs) that limit the flux of material between the blood and the brain (Mills et al., 2010). Regulation of iron influx by BVECs involves controlling receptor expression, internalization of Tf-TfR complexes, and acidification of cell endosomes (Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019). Astrocytes are perhaps the most important part of the BBB in terms of iron metabolism, since they're the first cells to encounter iron ions and compounds after these have traversed the endothelial cells of the BBB (see Fig. 1). Also, astrocytes may play a protective role toward neurons, since they can prevent the saturation of iron into the synaptic cleft by taking the NTBI into themselves (Hohnholt & Dringen, 2013). On the other

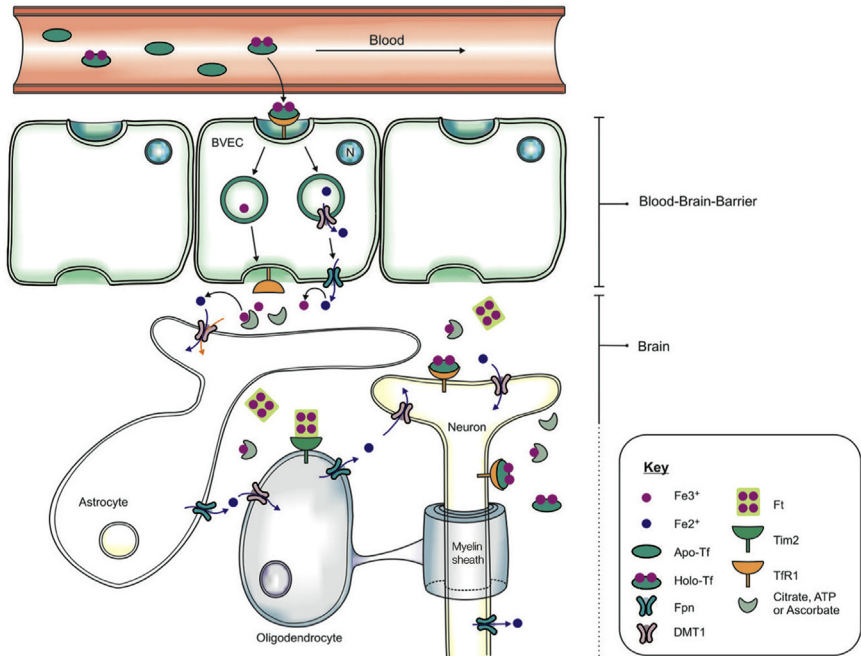


Fig. 1 Schematic representation of iron transport in the central nervous system. *Apo-Tf*, iron-free transferrin; *Holo-Tf*, iron-loaded transferrin; *Fpn*, ferroportin; *DMT1*, divalent metal transporter 1; *Ft*, ferritin; *Tim2*, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-2 (ferritin receptor); *Tfr1*, transferrin receptor 1. Reprinted with permission from Ashraf, A., Clark, M., & So, P.-W. (2018). The aging of iron man. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 65. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00065> (Fig. 2), Copyright 2018 licensed under CC BY 4.0.

hand, the BCSFB is composed of epithelial cells from the choroid plexus. This cerebral region is characterized by fenestrated capillaries through which iron-bound transferrin is able to cross. Also, the choroid plexus cells synthesize the important iron-related proteins previously described, such as Tf itself, TfR, DMT1, and Fpn1. However, it is suggested that the BCSFB mainly contributes to iron regulation through its removal through iron export mechanisms and clearance via interstitial fluid convective flow (Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019). Other than Tf dependent transport, NTBI, which is usually bound to citrate, ascorbate, or ATP, has an important role as it is the main source of iron for astrocytes, oligodendrocytes, and microglia (DeGregorio-Rocasolano, Martí-Sistac, & Gasull, 2019; Knutson, 2019).

Iron regulation is also effectuated by iron regulatory proteins (IRPs) at the post-transcriptional level; in case of iron insufficiency, IRPs bind specific iron responsive elements (IREs) at post-transcriptional level, in the 3' untranslated region of transferrin receptor mRNA (Joppe, Roser, Maass, & Lingor, 2019). This protects the TfR transcript from being degraded by nucleases and henceforth iron uptake is favored. The opposite occurs once iron reaches higher levels (Möller et al., 2019; Testi, Boffi, & Montemiglio, 2019).

3. Iron and neurodegeneration

Iron overload can lead to a variety of detrimental consequences, such as oxidative stress, cell death, and neurodegeneration (Fig. 2) (Chang, 2019; Han et al., 2020; Healy, McMahon, & FitzGerald, 2017; Ingrassia et al., 2019; Mills et al., 2010; Sfera et al., 2018). In addition, iron has the ability to induce the aggregation of some intrinsically disordered proteins, as it may interact with susceptible residues and thus promote the destabilization and unfolding of the usual suspects of some of the most known neurodegenerative diseases (Dekens, De Deyn, Sap, Eisel, & Naudé, 2020; Joppe et al., 2019; Liu, Fan, Yang, Wang, & Guo, 2018; Muhoberac & Vidal, 2019). As if this weren't enough, the aggregation process itself may promote the

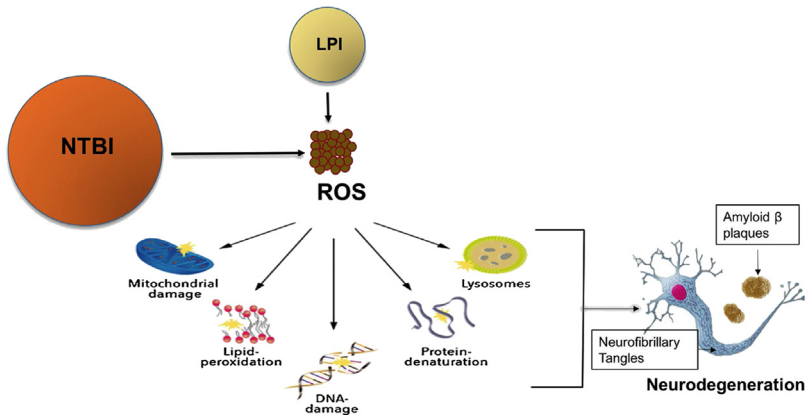


Fig. 2 Illustration of the intracellular damage caused by reactive oxygen species. *LPI*, labile plasma iron; *NTBI*, non-transferrin-bound iron; *ROS*, reactive oxygen species. Reprinted with permission from Bagwe-Parab, S., & Kaur, G. (2020). Molecular targets and therapeutic interventions for iron induced neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.12.011> (Fig. 1), Copyright 2019 Elsevier Inc.

formation of new iron binding sites that become centers of reactive oxygen species (ROS) production (Muhoberac & Vidal, 2019). A thorough compilation of studies regarding the impact of iron in the neurodegenerative process has been made by (Zanella et al., 2020). Table 1 summarizes the relationship between iron and several neurodegenerative diseases that will be described in the following subsections.

3.1 Oxidative stress and ferroptosis

As a product of the high energetic consumption by the brain, a great amount of ROS are generated, which contribute to a condition known as oxidative stress (Chen et al., 2020). This condition is caused by the generation of free radicals by the disruption of the mitochondrial respiratory chain. Iron is able to donate electrons to oxygen, which is useful for redox balance but in case of overload, ROS such as hydroxyl radicals can be produced via the Fenton reaction (Eq. 1) when iron is in its Fe(II) form (Chang, 2019).



Cell death may occur when pathways such as caspase-3-dependent apoptosis are triggered by iron accumulation, with subsequent damage to the mitochondrial membrane potential. However, a “new” type of regulatory cell death has been suggested to be exclusively activated in iron disorders: ferroptosis. The main events that take place in this particular type of cell death include the formation of ROS, lipid peroxidation, iron accumulation, inflammation, and redox homeostasis impairment (Han et al., 2020; Li et al., 2020; Mills et al., 2010; Muhoberac & Vidal, 2019). Several pathways for ferroptosis have been proposed, all of them eventually converging into lipid peroxidation. This is explained in the simplest terms by the aforementioned Fenton reaction, in which a ferrous-excessive ambient promotes the formation of ROS that cause damage to the lipids that form the cell membrane (Li et al., 2020). The main regulator in ferroptosis is glutathione peroxidase 4 (GPX4), an enzyme that repairs lipid peroxides by reducing them. However, iron overload is one of the causes of loss of GPX4 enzymatic activity and disruption of the synthesis of its precursor, glutathione (GSH), the main endogenous antioxidant molecule. The damage of proteins such as Ca^{2+} -ATPase, glutamate transporter, Na^+/K^+ -ATPase, and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor caused by intracellular iron accumulation is also a feature of ferroptosis (Hare et al., 2013). Even though there haven't been defined yet which are the specific markers associated to this process, the

Table 1 Summary of neurodegenerative diseases and their relationship with iron and iron transport proteins.

	Relationship with iron	Involved iron transport proteins	Main affected brain regions/components	References
Alzheimer's disease (AD)	Iron accumulation Iron-induced aggregation of amyloid- β protein Ferroptosis	Transferrin Ceruloplasmin Ferritin	Hippocampus Parietal cortex Motor cortex	(Ayton et al., 2018, 2017; Chang, 2019; Dekens et al., 2020; Diouf, 2020; Guan et al., 2020; Joppe et al., 2019; Liu et al., 2018; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Sabbir, 2018; Sfera et al., 2018; Taniguchi et al., 2008; Uranga & Salvador, 2018)
Parkinson's disease (PD)	Iron accumulation Restless leg syndrome Fatigue	Transferrin receptor 1 Divalent metal transporter 1 Ferroportin 1 Transferrin	<i>Substantia nigra</i> (neurons and glia)	(Abeyawardhane & Lucas, 2019; Cerri et al., 2019; Chang, 2019; Leung et al., 2020; Piao et al., 2017; Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Sun et al., 2018; Vellieux & d'Ortho, 2020; Yu et al., 2018; Zuo et al., 2016)
Huntington's disease (HD)	Excessive intracellular iron Ferroptosis		Oligodendrocytes	(Agrawal et al., 2018; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Sánchez-Castañeda et al., 2015; van Bergen et al., 2016)

Multiple sclerosis (MS)	Iron accumulation Demyelination		Gray matter Myelin Oligodendrocytes Astrocytes	(Hametner et al., 2013; Ropele et al., 2017; Roy Sarkar & Dutta, 2019; Siotto et al., 2019; Stankiewicz et al., 2014)
Sanfilippo syndrome	Iron accumulation	Ferritin	Microglia	(Fedele, 2015; Heon-Roberts et al., 2020; Hodroge et al., 2016; Kumari, 2018; Puy et al., 2018)

current research in this subject allows to summarize the key players of ferroptosis into reactive iron (Fe^{2+}) accumulation, lipid peroxidation, and a defective lipid peroxide repair system (i.e. GPX4) (Han et al., 2020). This particular cell death mechanism has been determined to be one of the main factors contributing to the development of neurodegeneration (Han et al., 2020; Knutson, 2019).

3.2 Damage to the blood-brain barrier (BBB)

It has been shown that systemic iron overload can cause damage to this structure if it reaches the brain parenchyma. For instance, after ischemic events such as strokes, elevated levels of Tf and TfR expression have been observed in cerebral regions such as the hippocampus (DeGregorio-Rocasolano et al., 2019).

A way of determining if the BBB has been damaged is by the detection of iron in the brain as a reflection of an increased iron intake (McCarthy & Kosman, 2015). Since iron has unpaired electrons at its farthest shell, it responds to external magnetic fields, a phenomenon known as magnetic susceptibility. This is useful for detecting iron compounds in the brain *in vivo* through non-invasive techniques such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) and quantitative susceptibility mapping (QSM) (Acosta-Cabronero, Betts, Cardenas-Blanco, Yang, & Nestor, 2016; Möller et al., 2019; Ropele, Enzinger, & Fazekas, 2017; Rouault, 2013).

3.3 Alzheimer's disease (AD)

Alzheimer's disease is characterized by the deposition of neurofibrillary tangles and amyloid plaques formed by the aggregation of amyloid- β protein ($\text{A}\beta$) in cerebral regions such as the hippocampus, the parietal cortex, and the motor cortex (Sabbir, 2018). Around these, iron deposits have also been found, indicating that iron associates with the metal-binding sites of $\text{A}\beta$, catalyzing its aggregation. A study made by QSM showed this association between iron increase and $\text{A}\beta$ deposition in the brain. Higher QSM levels measured in the hippocampus and the temporal and frontal lobes were related to low cognitive performance in subjects with $\text{A}\beta$ pathology (Ayton et al., 2017). Intra-neuronal iron accumulation appears to be also favored by the presence of $\text{A}\beta$ *per se*, since destabilization of Fpn and blockage of iron export channels have been observed (Sfera et al., 2018). Furthermore, the oxidative stress caused by iron accumulation contributes to the production of $\text{A}\beta$ (Uranga & Salvador, 2018). All in all, the aggregation of $\text{A}\beta$ protein causes the most neuronal damage, since these oligomers

block the synaptic communication when they accumulate in the inter-neuronal junctions (Chang, 2019). Notwithstanding, iron seems to be a key factor around it. A supporting finding is that ferritin expression increases with age and particularly in Alzheimer's disease, hence promoting iron accumulation in the brain and progression in AD symptoms (Ayton, Diouf, & Bush, 2018; Roy Sarkar & Dutta, 2019).

Recent studies have determined that transferrin levels in plasma (Guan et al., 2020) and ceruloplasmin (Diouf, 2020) and ferritin (Ayton et al., 2018) concentrations in cerebrospinal fluid are all related to cognitive decline in AD patients, supporting the current notion about iron metabolism's role in AD pathogenesis. Furthermore, transferrin had already been proposed as a biomarker for identifying AD, as it was found that in this pathologic condition, transferrin glycosylations were altered and thus lost binding activity (Taniguchi et al., 2008).

3.4 Parkinson's disease (PD)

In Parkinson's disease, iron accumulates in a cerebral region known as the *substantia nigra*, including neurons and glia from that region, as evidenced by higher echogenicity during MRI studies (Yu et al., 2018). Studies in mice have related this accumulation to a dysregulation on the intake and elimination of iron, mainly due to increased activity of TfR1 and DMT1, augmented expression of lactoferrin receptor on neurons, and reduced expression of Fpn1 (Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019). Further, some studies suggest that in Parkinson's disease, iron import is augmented uncontrollably by oxidation of iron-sulfur clusters, promoting the accumulation of transferrin and thus of iron in mitochondria (Cerri, Milanese, & Mastroberardino, 2019).

A comparative study (Zuo et al., 2016) with geriatric patients with PD evaluated, among other factors, the levels of iron and its related proteins and their participation in one of the symptoms observed in most cases of PD: fatigue. Fatigue can be manifested as mental fatigue, physical fatigue, or both. In this study, samples taken from cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients with mental fatigue showed significantly higher levels of iron and transferrin, in contrast with control samples. Also, samples taken from blood serum had decreased transferrin levels, inferring that most of it had reached the brain due to the lack of restriction from a damaged BBB. These observations suggested that an impaired iron regulation might be a potential mechanism of PD with mental fatigue (Zuo et al., 2016).

Some PD patients also manifest a condition called Restless Leg Syndrome (RLS), where abnormalities in iron distribution have also been observed (Vellieux & d'Ortho, 2020). A study made by (Piao et al., 2017) revealed that iron levels measured in CSF and peripheral blood in PD-RLS patients were found to be deficient, compared to PD patients without RLS. Paradoxically, Tf levels in CSF were found to be significantly increased; therefore, a possible explanation is that the iron carried by said Tf is not reaching the sites in the brain related to PD-RLS. An observation that supports this is the improvement in RLS patients who underwent iron supplementation treatments (Leung, Singh, McWilliams, Stockler, & Ipsiroglu, 2020).

Dopamine (DA) is the main neurotransmitter involved in Parkinson's disease; its deficiency is usually suggested to be one of the main players in this neurodegenerative condition. Iron, being a cofactor of tyrosine hydroxylase, contributes to the regulation of DA synthesis; hence, a deficit in iron concentration in the brain leads to a lessened production of DA (Piao et al., 2017). However, DA interaction with reactive iron (i.e. ferrous iron) results in the formation of protein-modifying quinones and in the aggravation of oxidative stress (Sun, Pham, Hare, & Waite, 2018), an event also triggered, although through different pathways, by the formation of H_2O_2 after DA's enzymatic hydrolysis by monoamine oxidase (Abeyawardhane & Lucas, 2019; Chang, 2019).

3.5 Huntington's disease (HD)

Energy metabolism is principally affected in Huntington's disease from its early stages, as evidenced by MRI studies where brain iron metabolism is modified. Post-mortem studies confirm the role of iron overload, as an excess of intracellular iron has been found in HD patients' brains, compared to similarly aged controls (Roy Sarkar & Dutta, 2019). Some studies have shown decreased levels of iron concentration in the progress of HD, possibly due to a redistribution of brain iron caused by the increased density of oligodendrocytes that occurs as a response to compensate myelin and neuronal loss (van Bergen et al., 2016). A previous study suggests similarities to this, as it was observed that in preliminary stages of HD, iron is usually found to be in excess, but as the disease evolves, there is an apparent decrease; however, this phenomenon may indicate that the iron is being redistributed (Sánchez-Castañeda et al., 2015). Other findings have found increased mitochondrial iron uptake in HD patients. However, this iron is not utilized, but accumulated in a labile form which in turn may be the responsible for mitochondrial

function disruption. This is also supported by a higher rate of oxidative stress evidenced by lipid peroxidation and ferroptosis in HD mice and human brains with iron overload (Agrawal, Fox, Thyagarajan, & Fox, 2018). All in all, the specific role of iron in HD pathogenesis is yet unclear, but definitely present, mostly at early stages.

3.6 Multiple sclerosis (MS)

Neurodegeneration in multiple sclerosis is usually attributed to inflammation, accompanied by other features such as demyelination and axonal damage (Stankiewicz, Neema, & Ceccarelli, 2014). In cases of MS patients with low disability, oxidative stress has been evidenced as a potential marker and therapeutic target (Siotto et al., 2019). These factors all share a relationship with iron management. MRI studies have revealed elevated iron concentration in multiple sclerosis patients' brains *in vivo*, particularly in gray matter and in the vicinity of MS lesions. These findings may provide an explanation to myelin loss and mitochondrial malfunction associated to this neurological condition (Ropele et al., 2017; Roy Sarkar & Dutta, 2019). Some authors have suggested that inflammatory cytokines may promote iron liberation from oligodendrocytes and astrocytes during the neuroinflammatory state associated to MS. This idea is supported by the findings, in histological and MRI analyses, of free iron in the extracellular space following the destruction of oligodendrocytes and myelin in active MS lesions (Hametner et al., 2013).

3.7 Sanfilippo syndrome

Contrarily to most neurodegenerative diseases, Sanfilippo syndrome affects the pediatric population and its etiology is genetic, as it shows an autosomal recessive inheritance pattern (Fedele, 2015; Heon-Roberts et al., 2020; Kumari, 2018). However, brain iron accumulation is a common factor with other "adult" neurological diseases (Hodroge et al., 2016; Puy et al., 2018). This pediatric neurodegenerative disease is characterized by the accumulation of abnormal heparan sulfate oligosaccharides (HSOs) in several tissues including the CNS (Fedele, 2015; Hodroge et al., 2016), which alters the child's overall development, causes cognitive decline, and is usually fatal within the first twenty years of life (Heon-Roberts et al., 2020; Kumari, 2018). The accumulation of HSOs increases the production of several pro-inflammatory molecules in microglia, as well as the expression of hepcidin, a peptide responsible for downregulating iron, as evidenced in a mice model study (Puy et al., 2018). This study also found abnormalities in ferritin expression possibly due to other iron dysregulation pathways yet to be clarified.

4. Iron transport related proteins

In this section, we briefly describe some of the main proteins involved in the iron transport in the CNS (Fig. 3), their role in homeostasis and in disease. Table 2 summarizes them in terms of location and function.

4.1 Transferrin receptors 1 and 2 (TfR1 and TfR2)

Also known as Cluster of Differentiation 71 (CD71), the TfR1 is an essential homodimeric protein for cellular iron uptake. It is constituted by a cytoplasmic domain, a transmembrane domain, and an extracellular domain, where it binds ferric iron-loaded transferrin (Tf) (Testi et al., 2019). Binding of Tf to TfR1 involves a conformational change in TfR1, specifically at its dimer interface (Eckenroth, Steere, Chasteen, Everse, & Mason, 2011).

It is thanks to this receptor that transferrin is able to traverse cells, as both proteins form a complex that is internalized in a process known as receptor-mediated endocytosis, which takes place via a clathrin dependent pathway.

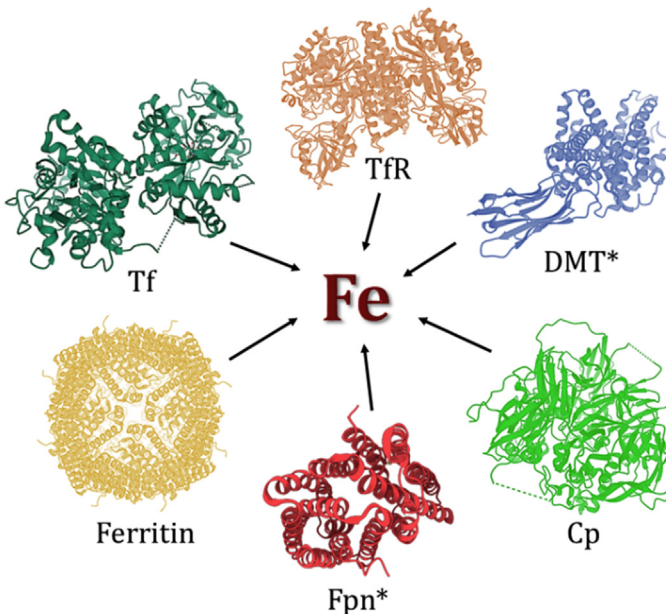


Fig. 3 Illustrative representation of the main proteins related to iron transport in the CNS. *Tf*, human serum transferrin (PDB: 4 × 1B); *TfR*, transferrin receptor ectodomain (PDB: 1CX8); Ferritin (PDB: 5N27); *Cp*, ceruloplasmin (PDB: 4ENZ); *Fpn*, ferroportin (PDB: 5AYM); *DMT*, divalent metal transporter (PDB: 4WGW). *Proteins from non-human sources.

Table 2 Summary of the main iron transport proteins, their location and function in human brain iron homeostasis.

	Location	Function	References
Transferrin (Tf)	Plasma (bloodstream)	Iron transport in blood circulation	(Fernandes et al., 2020; Kawabata, 2019; Möller et al., 2019)
Lactoferrin (LTF)	Glandular epithelial cells	Iron binding from Tf during inflammation	(Bonaccorsi di Patti et al., 2018; García-Montoya et al., 2012; Lambert, 2012; Liu et al., 2018; Page, 2019)
Melanotransferrin (MTf)	Tumor cells (melanomas) Cerebrospinal fluid (in AD)	Iron binding for tumor cells	(Ashraf et al., 2019; Chang, 2019; Lambert, 2012)
Transferrin receptor (TfR)	Cell Surface (endothelial cells of the BBB)	Receptor for cellular iron uptake Recognition of Tf on the cell surface	(Eckenroth et al., 2011; Lambert, 2012; Mills et al., 2010; Testi et al., 2019)
Divalent Metal Transporter 1 (DMT1)	Early endocytic compartments (astrocytes)	Metal transporter Uptake of iron from circulating Tf Internalization of NTBI in endosomes	(Bonaccorsi di Patti et al., 2018; Hohnholt & Dringen, 2013; Ingrassia et al., 2019; Knutson, 2019; Mills et al., 2010; Qian & Ke, 2019)
Ferroportin 1 (Fpn1)	Abluminal membrane of the brain (neurons and astrocytes)	Iron export	(Chang, 2019; Hare et al., 2013; Mills et al., 2010; Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019)
Ferritin	Neurons Microglia Oligodendrocytes	Iron storage	(Chang, 2019; Möller et al., 2019; Muhoberac & Vidal, 2019; Rouault, 2013; Todorich et al., 2008)

(Continued)

Table 2 Summary of the main iron transport proteins, their location and function in human brain iron homeostasis.—cont'd

	Location	Function	References
Hephaestin (Heph)	Cytoplasm (astrocytes) Epithelial cells (choroid plexus)	Ferroxidase; oxidizes ferrous iron to ferric iron in the intracellular milieu. Aids iron export by Fpn1.	(Dlouhy et al., 2019; Jiang et al., 2015; Rouault, 2013; Yanase et al., 2020)
Ceruloplasmin (Cp)	Cerebrospinal fluid	Ferroxidase in the extracellular milieu. Removes iron from Fpn1. Binds to LTF during inflammation.	(Bonaccorsi di Patti et al., 2018; Diouf, 2020; Jiang et al., 2015; Sokolov et al., 2017; White et al., 2012)

TfR1 is expressed on the surface of virtually every cell type, mostly in highly differentiated and rapidly dividing cells, immature erythroid cells and placental tissue; but also in endothelial cells of the blood-brain barrier, hepatocytes, reticulocytes and hepatocytes (Lambert, 2012; Mills et al., 2010; Testi et al., 2019). TfR2 is a paralog to TfR1, which means that it develops a different function although it originates from a duplicated gene. In contrast to TfR1, TfR2 is a transmembrane protein expressed only in hepatic, duodenal, and erythroid cells. Also, an important difference is that TfR2 doesn't have many regulative mechanisms, as its transcript doesn't include iron responsive elements (IREs) and therefore there is no downregulation of TfR2 in the event of iron overload (Lambert, 2012).

4.2 Divalent metal transporter 1 (DMT1)

Localized in the early endocytic compartments, DMT1 is the main transmembrane transporter for metal ions such as Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Cd^{2+} . Overall, its main functions in iron metabolism involve the uptake of iron from dietary ingestion, as it is expressed in the apical membrane of enterocytes in the proximal small intestine (Bonaccorsi di Patti et al., 2018), and in developing erythroid cells of the bone marrow, assimilating iron that comes from circulating transferrin (Knutson, 2019). In most mammalian cells, DMT1 is responsible for releasing iron obtained from the Tf-TfR1 cycle, once it is reduced from Fe^{3+} to Fe^{2+} in the endosome, to the cytosol (Mills et al., 2010). DMT1 is expressed in astrocytes, thus playing part in the uptake of ferrous iron (Hohnholt & Dringen, 2013). It has also been observed that DMT1 is able to transport another form of circulating iron known as Non-Transferrin Bound Iron (NTBI), which consists of iron being bound to anions such as citrate or ascorbate, or to other proteins such as albumin, ferritin, or lactoferrin (Qian & Ke, 2019). When Tf transport is impaired or absent, DMT1 becomes the main mediator of iron by internalizing NTBI in the endosome (Knutson, 2019). In relation to neurodegeneration, some findings have shown an increase in the expression of DMT1; however, this event is not enough to cause neurodegeneration by itself. On the other hand, DMT1 increase and iron accumulation have been found in the *substantia nigra* of PD patients, indicating a potential role in the pathogenesis of PD (Ingrassia et al., 2019).

4.3 Ferroportin 1 (Fpn1)

Fpn1 is the protein responsible for iron export across the abluminal membrane (i.e. the brain side of the brain interstitial membrane that separates it

from the bloodstream) (Mills et al., 2010; Qian & Ke, 2019). This transmembrane protein is expressed in neurons and astrocytes, and it is assisted by the ferroxidase hephaestin, which converts the divalent iron into ferric iron, so that iron efflux is accomplished (Chang, 2019; Hare et al., 2013). Iron accumulation has also been proposed to be due to the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, related partly to a reduced Fpn1 expression (Qian & Ke, 2019; Roy Sarkar & Dutta, 2019).

4.4 Ferritin

A much structurally larger molecule, Ferritin is the main iron storage protein, conformed by two types of subunits, H type (heavy) and L type (light), which co-assemble into a supramolecular spherical-shaped protein (Chang, 2019). In the CNS, the expression of these subunits varies, as the H type is mainly expressed in neurons, the L type in microglia, and a combination of both in oligodendrocytes (Möller et al., 2019). Oligodendrocytes need a great amount of iron for myelin synthesis, which explains the significantly higher expression of ferritin and its receptor, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 2 (Tim-2) (Todorich et al., 2008). Ferritin is able to store up to 4,500 iron atoms in a non-reactive state, taking the excess of ferrous iron from the labile iron pool (LIP) to avoid the generation of reactive oxygen species (ROS), the aggregation of proteins, and the formation of iron deposits, which may all cause cellular damage. Additionally, it also serves as an arsenal of iron for when it is needed for physiological functions. The mechanisms by which iron is released from ferritin consist on degradation of this protein, either by lysosomes or by proteasomes (Muhoberac & Vidal, 2019; Rouault, 2013).

4.5 Hephaestin (Heph)

Heph is a ferroxidase expressed in the cytoplasm of human brain astrocytes and in the epithelial cells of the choroid plexus (Yanase et al., 2020). It is the main enzyme responsible for oxidizing iron from its ferrous form (Fe^{2+}) to its ferric, non-toxic form (Fe^{3+}) and thus allowing the binding of iron to Tf (Rouault, 2013). The importance of this protein resides in its function, as it works hand to hand with Fpn1 to regulate iron export (Dlouhy, Bailey, Steimle, Parker, & Kosman, 2019). A study using Heph knockout mice demonstrated its essential role in brain iron homeostasis, considering its interaction with other iron regulatory proteins, as the lack of this iron export-related protein led to iron accumulation in several brain regions, and a consequential deficiency in other cell types (Jiang et al., 2015).

4.6 Ceruloplasmin (Cp)

This protein has been proposed as a potential marker for neurodegeneration due to its increased concentration in cerebrospinal fluid in patients with amyloid pathology and mild cognitive decline (Diouf, 2020). Ceruloplasmin is an important regulator of iron toxicity due to its function as a ferroxidase in the extracellular milieu, since it removes iron from ferroportin after iron export to prevent its saturation and degradation (Bonaccorsi di Patti et al., 2018). Some studies have shown that it works in a slightly different but interrelated manner with the aforementioned hephaestin (Jiang et al., 2015; White et al., 2012). Additionally, it is a key player during inflammation, a relevant factor of several diseases, during which it readily binds to lactoferrin (Sokolov et al., 2017), an iron-binding protein involved in the immune response which we will review later on.



5. Transferrins

Transferrins are described separately from the rest of the iron-transport proteins reviewed so far because we want to highlight the relevance of human serum transferrin (Tf), the main iron transport protein, as a potential drug delivery system, as it will be further discussed in the following section.

Transferrins are a family of glycoproteins found in several organisms whose main function is to transport iron for its utilization in different cells (Lambert, 2012). Lactoferrin (LTf) is mainly expressed by glandular epithelial cells and neutrophils, and it is found in bodily secretions such as milk, saliva, and tears (Page, 2019). It plays an important role in the immune response toward infection, as it binds to bacterial lipopolysaccharides to induce peroxidation and trigger cell lysis (García-Montoya, Cendón, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2012; Page, 2019) and to iron to prevent its utilization by invading pathogens (Bonaccorsi di Patti et al., 2018). In fact, lactoferrin's affinity to iron is 300-fold higher than transferrin's, especially in acidic conditions, so that iron from circulating Tf is transferred to LTf during inflammation (Lambert, 2012; Page, 2019). Interestingly, studies have observed that LTf plays a neuroprotective role in neurodegenerative diseases, particularly in AD, through several mechanisms such as metal chelation, regulation of inflammatory processes, and cell autophagy, making LTf a promising molecule of study for targeting neurodegeneration (Liu et al., 2018).

Another member of the transferrin family is melanotransferrin (MTf), primarily found in human tumor cells known as melanomas, although expression of this protein has also been found in normal tissues such as salivary glands, sweat glands, liver, intestine, and umbilical cord (Chang, 2019). A recent study has implied MTf as a potential marker for AD given its altered distribution in cerebrospinal fluid in patients with mild cognitive decline, a preliminary stage of this disease (Ashraf, Alepuz Guillen, Aljuhani, Hubens, & So, 2019). In MTf, iron binding only occurs in its N-lobe, it is neither recognized by TfR1 nor TfR2, and its function under normal conditions remains unclear. However, it has been proposed that its expression on the surface of melanoma cells may allow their crossing through the blood brain barrier to unchain metastasis (Lambert, 2012).

5.1 Human serum transferrin (Tf)

Also known as serotransferrin, transferrin is the main iron transport protein involved in iron homeostasis, as it travels through the bloodstream picking up free iron in its Fe(III) form and delivers it to cells through its binding to the TfR1 (Kawabata, 2019; Möller et al., 2019). It is thanks to transferrin's structural and functional properties that it has become an attractive candidate for novel targeted drug-delivery systems (Fernandes et al., 2020). Transferrin is composed of two lobes, the amino-terminal (N) and the carboxyl-terminal (C), each divided into two subdomains: N1 and N2, and C1 and C2. Both lobes are connected by a bridge formed by residues 332 through 338, at the N1 and C1 subdomains. A ribbon representation of transferrin's overall structure is presented in Fig. 4. These lobes are structurally homologous, but slightly different in terms of their function. For instance, it has been observed that the N-lobe is mainly focused on carrying iron, whereas the C-lobe is majorly involved in recognition by the TfR (Eckenroth et al., 2011; Yang, Zhang, Wang, Hao, & Sun, 2012).

Tf binds two ferric ions to each of its metal-binding sites with very high affinity, though reversibly (Chang, 2019). Some studies have demonstrated its ability to bind different metals other than iron, indicating a certain structural and coordination-bond flexibility in its metal-binding site (Adam, Trumm, Smith, MacGillivray, & Panak, 2018; Bewley et al., 1999; Yang et al., 2012). The metal-binding and release mechanisms of transferrin have been broadly described throughout the last few decades (Adams et al., 2003; Hirose, 2000; Jeffrey et al., 1998; Kawabata, 2019; H. Li & Qian, 2002; MacGillivray et al., 2000, 1998; Wally et al., 2006; Wang et al., 2015). Briefly, a conformational change in which both domains

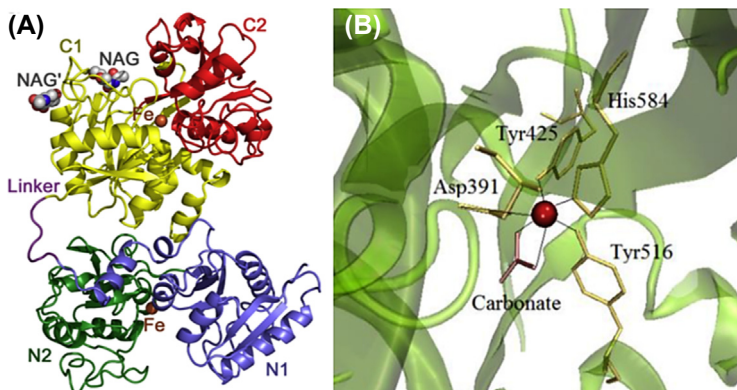


Fig. 4 Crystallographic structure of human serum transferrin. (A) Overall structure of Tf with iron bound to both of its iron-binding sites. Its subdomains are represented as N1 lobe in blue, N2 lobe in green, C1 lobe in yellow, and C2 lobe in red, and the linker peptide is shown in purple. Iron ions are represented as brown spheres and N-acetylglucosamine moieties (NAG and NAG') are shown in sphere models. (B) Transferrin metal binding site. Metal ion is represented in a red sphere. (A) Reprinted with permission from Springer Nature Service Center GmbH: Springer Nature, Yang, N., Zhang, H., Wang, M., Hao, Q., & Sun, H. (2012). Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. *Scientific Reports*, 2(1), 999. <https://doi.org/10.1038/srep00999> (Fig. 1A), Copyright 2012. (B) Reprinted with permission from Duca, G., Anghel, L., & Erhan, R. V. (2018). Structural aspects of lactoferrin and serum transferrin observed by ftr spectroscopy. *Chemistry Journal of Moldova*, 13(1), 111–116. <https://doi.org/10.19261/cjm.2018.482> (Fig. 1D) by Copyright 2018 licensed under CC BY 4.0.

that conform the N lobe, identified as N1 and N2, go through a rigid body rotation, implies the burial of a region and a simultaneous exposure of another that allows solvent accessibility (Jeffrey et al., 1998).

Structural studies suggest that there are three basic conformational stages in the tertiary structure of transferrin: fully-closed, partially-opened, and fully-opened. These conformations are governed by interactions between the protein and its environment and with the formation and dissociation of the coordination bonds between the metal and the transferrin's metal-binding pocket residues. Knowledge of the partially-opened conformation of the N-lobe is of special relevance given that it has allowed to describe the mechanism by which metals bind to transferrin. A comparison made between the isolated N-lobe of serotransferrin and the isolated N-lobe of lactoferrin revealed a highly conserved nature in the mechanism that involves the conformational change between the open and closed state, indicating that ligand binding in the different members of the transferrin family follows practically the same mechanism (Jeffrey et al., 1998).

Iron release from the transferrin molecule has been proposed to be activated by a “dilysine-trigger” conformed by Lys206 and Lys296. In the iron-loaded protein, these lysines are bound by a hydrogen bond; when the pH decreases, Lys206 is protonated, leading to a destabilization of the closed conformation by repulsive forces (Jeffrey et al., 1998; Yang et al., 2012). Nonetheless, it has been observed that this “dilysine trigger” is only activated in the N-lobe, whereas in the C-lobe, the mechanism of iron release is mediated by the binding of His349 to the TfR1 and the protonation by the acid environment. When iron release is completed, a series of events takes place to ensure the stabilization of the apo-Tf molecule within the Tf-TfR1 complex before its release to blood circulation. This stabilization is made possible by the protonation of His349, as well as of His318, which favor cation- π interactions with residues Phe760 and Trp641 of the TfR1, respectively. Therefore, throughout the Tf-TfR1 complex’s passage within the endosome, Tf remains bound to the TfR1 by its C1 subdomain, and the acidification that causes iron to be released is the same that allows the stabilization of apo-Tf within the complex with its receptor (Eckenroth et al., 2011).



6. Perspectives on the use of transferrin as a drug delivery system

The majority of the strategies developed so far for targeting the CNS have proven a low to null success rate in clinical trials by several reasons; namely, the strategies *per se*, as they are usually designed to avoid or disrupt the BBB, or because they used ineffective vehicles altogether. These strategies are thoroughly described by (Pardridge, 2020).

Transport proteins are thus attractive potential drug delivery systems, as they generally have well-described transport mechanisms, they’re usually found in the bloodstream, and they have some degree of flexibility that allows them to bind ligands. Particularly, transferrin possesses promising physicochemical properties to propose it as such a system (Fernandes et al., 2020). Within the transferrin family, lactoferrin has also shown promising observations regarding neuroprotection, thus making it a molecule worth studying further (Liu et al., 2018). On other viewpoints, some of the promising strategies for traversing the BBB include the reengineering of molecules to create molecular BBB Trojan horses, which are defined as monoclonal antibodies against endogenous BBB receptors such as the TfR1 or the insulin receptor (Pardridge, 2017). Taking the principle of a molecular Trojan

horse, which basically mimics an endogenous transport mechanism, transferrin might be the horse altogether, carrying a drug that does not cross the BBB by itself.

A study revealed that the metal-binding site of transferrin can be somewhat “molded” by modifying the anions that complete the coordination sphere; for instance, the introduction of a malonate anion instead of a carbonate anion widens the metal-binding pocket, since malonate allows for larger angles and thus more space for molecules to bind. Albeit having a wider binding pocket, the C-lobe remains closed with minor conformational changes, something essential for transferrin to be recognized by its receptor (Wang et al., 2015). This knowledge is useful for evaluating how much room there could be for other molecules, such as drugs, to bind to the Tf metal-binding site.

A recent approach toward AD treatment was the evaluation of the interaction between human transferrin and rivastigmine tartrate, an existing Alzheimer’s drug already used in the therapeutics of this disease (Shamsi et al., 2019). The findings of such study in terms of the binding sites and mechanisms may be useful for future studies using other drugs and focusing on transferrin as the delivery system.

Iron chelation has become an important strategy for targeting neurodegeneration due to iron overload and some of its derivations, such as ferroptosis (Bayir et al., 2020; Han et al., 2020). Within the main iron chelators that have been tested is deferoxamine, which could help to regulate the load of intracellular iron (Joppe et al., 2019; Liu et al., 2018). In a similar manner, deferiprone has been tested and shown positive results to alleviate some of the early motor symptoms of PD. It must be noted that most of the trials developed in this area have yielded promising results in animal models, but only mild effects in clinical trials (Han et al., 2020). Herein, transferrin could be a means of getting a more efficient delivery of iron chelators.

Other approaches involving transferrin have opted for using it as the recognition molecule, as an extension of another drug delivery system. For instance, a study by (Pinheiro et al., 2020) proposes lipid nanoparticles loaded with quercetin, a neuroprotective antioxidant flavonoid, functionalized with transferrin for a more efficient delivery. This functionalization favors the neuroprotective effect by reducing amyloid-beta aggregation, the main hallmark of Alzheimer’s disease, implying that transferrin works synergistically with other drug delivery systems (Pinheiro et al., 2020). This is not the first time that transferrin has been used as a tag for recognition of the

TfR, so this strategy is also promising and supports the valuable role of transferrin in novel drug delivery systems development for targeting the CNS.

In contexts other than neurodegeneration, potential targets for transferrin-mediated drug delivery are cancer cells; because of their uncontrolled proliferation rate, they require excessive quantities of iron and thus they express up to a hundred times more TfR than normal cells (during metastases) (Testi et al., 2019).



7. Concluding remarks

The studies reviewed so far have confirmed the close relationship between iron, its transport proteins, and the so far observed causal factors of several neurodegenerative diseases. In addition, several deleterious processes, such as oxidative stress, are also linked with iron misplacement, such as the relatively recently described ferroptosis. Therefore, iron transport proteins must be paid close attention, as they may be potential therapeutic targets for neurological diseases.

The search for an adequate drug delivery system for the central nervous system is still in research, but the knowledge we possess so far will allow to propose new pathways to reach this target effectively. Several attempts are being made and drugs are being evaluated to overcome the challenge of treatment beyond the blood-brain barrier. In this review, an emphasis has been made on the relevance of human serum transferrin, the main iron transport protein, as a promising molecule for targeted drug delivery to the CNS.

Acknowledgments

The author would like to acknowledge Prof. Dr. Abel Moreno from the Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, for the technical supervision throughout the elaboration of this chapter.

References

- Abeyawardhane, D. L., & Lucas, H. R. (2019). Iron redox Chemistry and implications in the Parkinson's disease brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/4609702>.
- Acevedo, K., Masaldan, S., Opazo, C. M., & Bush, A. I. (2019). Redox active metals in neurodegenerative diseases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(8), 1141–1157. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01731-9>.
- Acosta-Cabronero, J., Betts, M. J., Cardenas-Blanco, A., Yang, S., & Nestor, P. J. (2016). In vivo MRI mapping of brain iron deposition across the adult lifespan. *Journal of Neuroscience*, 36(2), 364–374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1907-15.2016>.

- Adams, T. E., Mason, A. B., He, Q.-Y., Halbrooks, P. J., Briggs, S. K., Smith, V. C., et al. (2003). The position of arginine 124 controls the rate of iron release from the N-lobe of human serum transferrin: A structural study. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6027–6033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210349200>.
- Adam, N., Trumm, M., Smith, V. C., MacGillivray, R. T. A., & Panak, P. J. (2018). Incorporation of transuranium elements: Coordination of Cm(iii) to human serum transferrin. *Dalton Transactions*, 47(41), 14612–14620. <https://doi.org/10.1039/C8DT02915F>.
- Agrawal, S., Fox, J., Thyagarajan, B., & Fox, J. H. (2018). Brain mitochondrial iron accumulates in Huntington's disease, mediates mitochondrial dysfunction, and can be removed pharmacologically. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.002>.
- Ashraf, A., Alepuz Guillen, J. A., Aljuhani, M., Hubens, C., & So, P.-W. (2019). Low cerebrospinal fluid levels of melanotransferrin are associated with conversion of mild cognitively impaired subjects to Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 181. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00181>.
- Ashraf, A., Clark, M., & So, P.-W. (2018). The aging of iron man. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 65. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00065>.
- Ayton, S., Diouf, I., & Bush, A. I. (2018). Evidence that iron accelerates Alzheimer's pathology: A CSF biomarker study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(5), 456–460. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316551>.
- Ayton, S., Fazlollahi, A., Bourgeat, P., Raniga, P., Ng, A., Lim, Y. Y., et al. (2017). Cerebral quantitative susceptibility mapping predicts amyloid- β -related cognitive decline. *Brain*, 140, 2112–2119. <https://doi.org/10.1093/brain/awx137>.
- Bagwe-Parab, S., & Kaur, G. (2020). Molecular targets and therapeutic interventions for iron induced neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.12.011>.
- Bayir, H., Anthonymuthu, T. S., Tyurina, Y. Y., Patel, S. J., Amoscato, A. A., Lamade, A. M., et al. (2020). Achieving life through death: Redox Biology of lipid peroxidation in ferroptosis. *Cell Chemical Biology*, 27(4), 387–408. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.014>.
- van Bergen, J. M. G., Hua, J., Unschuld, P. G., Lim, I. A. L., Jones, C. K., Margolis, R. L., et al. (2016). Quantitative susceptibility mapping suggests altered brain iron in premanifest Huntington disease. *American Journal of Neuroradiology*, 37(5), 789–796. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4617>.
- Bewley, M. C., Tam, B. M., Grewal, J., He, S., Shewry, S., Murphy, M. E. P., et al. (1999). X-ray crystallography and mass spectroscopy reveal that the N-lobe of human transferrin expressed in *Pichia pastoris* is folded correctly but is glycosylated on serine-32[†]. *Biochemistry*, 38(8), 2535–2541. <https://doi.org/10.1021/bi9824543>.
- Bonaccorsi di Patti, M. C., Cutone, A., Polticelli, F., Rosa, L., Lepanto, M. S., Valenti, P., et al. (2018). The ferroportin-ceruloplasmin system and the mammalian iron homeostasis machine: Regulatory pathways and the role of lactoferrin. *Biometals*, 31(3), 399–414. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0087-5>.
- Buijs, M., Doan, N. T., van Rooden, S., Versluis, M. J., van Lew, B., Milles, J., et al. (2017). In vivo assessment of iron content of the cerebral cortex in healthy aging using 7-Tesla T2*-weighted phase imaging. *Neurobiology of Aging*, 53, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.005>.
- Cerri, S., Milanese, C., & Mastroberardino, P. G. (2019). Endocytic iron trafficking and mitochondria in Parkinson's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 110, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.009>.
- Chang, Y.-Z. (2019). *Brain iron metabolism and CNS diseases*.

- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., et al. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, 53(3). <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>.
- DeGregorio-Rocasolano, N., Martí-Sistac, O., & Gasull, T. (2019). Deciphering the iron side of stroke: Neurodegeneration at the crossroads between iron dyshomeostasis, excitotoxicity, and ferroptosis. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 85. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00085>.
- Dekens, D. W., De Deyn, P. P., Sap, F., Eisel, U. L. M., & Naudé, P. J. W. (2020). Iron chelators inhibit amyloid- β -induced production of lipocalin 2 in cultured astrocytes. *Neurochemistry International*, 132, 104607. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104607>.
- Diouf, I. (2020). Cerebrospinal fluid ceruloplasmin levels predict cognitive decline and brain atrophy in people with underlying β -amyloid pathology. *Neurobiology of Disease*, 7.
- Dlouhy, A. C., Bailey, D. K., Steimle, B. L., Parker, H. V., & Kosman, D. J. (2019). Fluorescence resonance energy transfer links membrane ferroportin, hephaestin but not ferroportin, amyloid precursor protein complex with iron efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 294(11), 4202–4214. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005142>.
- Duca, G., Anghel, L., & Erhan, R. V. (2018). Structural aspects of lactoferrin and serum transferrin observed by ftir spectroscopy. *Chemistry Journal of Moldova*, 13(1), 111–116. <https://doi.org/10.19261/cjm.2018.482>.
- Duck, K. A., Simpson, I. A., & Connor, J. R. (2017). Regulatory mechanisms for iron transport across the blood-brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.083>.
- Eckenroth, B. E., Steere, A. N., Chasteen, N. D., Everse, S. J., & Mason, A. B. (2011). How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13089–13094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105786108>.
- Fedele, A. (2015). Sanfilippo syndrome: Causes, consequences, and treatments. *The Application of Clinical Genetics*, 269. <https://doi.org/10.2147/TACG.S57672>.
- Fernandes, M. A., Hanck-Silva, G., Baveloni, F. G., Oshiro Junior, J. A., de Lima, F. T., Eloy, J. O., et al. (2020). A review of properties, delivery systems and analytical methods for the characterization of monomeric glycoprotein transferrin. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743639>.
- García-Montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>.
- Guan, J., Wang, P., Lu, L., & Zhao, G. (2020). Association of plasma transferrin with cognitive decline in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 38. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00038>.
- Hametner, S., Wimmer, I., Haider, L., Pfeifenbring, S., Brück, W., & Lassmann, H. (2013). Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain: Iron in the MS Brain. *Annals of Neurology*, 74(6), 848–861. <https://doi.org/10.1002/ana.23974>.
- Han, C., Liu, Y., Dai, R., Ismail, N., Su, W., & Li, B. (2020). Ferroptosis and its potential role in human diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 239. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00239>.
- Hare, D., Ayton, S., Bush, A., & Lei, P. (2013). A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00034>.
- Healy, S., McMahon, J. M., & FitzGerald, U. (2017). Modelling iron mismanagement in neurodegenerative disease in vitro: Paradigms, pitfalls, possibilities & practical considerations. *Progress in Neurobiology*, 158, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.08.004>.

- Heon-Roberts, R., Nguyen, A. L. A., & Pshezhetsky, A. V. (2020). Molecular bases of neurodegeneration and cognitive decline, the major burden of Sanfilippo disease. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 344. <https://doi.org/10.3390/jcm9020344>.
- Hirose, M. (2000). The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64(7), 1328–1336. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1328>.
- Hodgson, R., Kennedy, B. K., Masliah, E., Scarsee-Levie, K., Tate, B., Venkateswaran, A., et al. (2020). Aging: Therapeutics for a healthy future. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.021>.
- Hodroge, Rackowski, L., Lefebvre, T., Karim, Z., Vitry, S., Gonnet, F., et al. (2016). Alteration of cerebral iron metabolism in Sanfilippo syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 117(2), S97. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.12.413>.
- Hohnholt, M. C., & Dringen, R. (2013). Uptake and metabolism of iron and iron oxide nanoparticles in brain astrocytes. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1588–1592. <https://doi.org/10.1042/BST20130114>.
- Ingrassia, R., Garavaglia, B., & Memo, M. (2019). DMT1 expression and iron levels at the crossroads between aging and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 575. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00575>.
- Jeffrey, P. D., Bewley, M. C., MacGillivray, R. T. A., Mason, A. B., Woodworth, R. C., & Baker, E. N. (1998). Ligand-Induced conformational change in transferrins: Crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin $\uparrow \cdot \uparrow$. *Biochemistry*, 37(40), 13978–13986. <https://doi.org/10.1021/bi9812064>.
- Jiang, R., Hua, C., Wan, Y., Jiang, B., Hu, H., Zheng, J., et al. (2015). Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain. *Journal of Nutrition*, 145(5), 1003–1009. <https://doi.org/10.3945/jn.114.207316>.
- Joppe, K., Roser, A.-E., Maass, F., & Lingor, P. (2019). The contribution of iron to protein aggregation disorders in the central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, 13(15), 155–165. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00015>.
- Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>.
- Knutson, M. D. (2019). Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.413>.
- Kumari, A. (2018). Mucopolysaccharidoses. In *Sweet biochemistry* (pp. 75–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814453-4.00015-7>.
- Lambert, L. A. (2012). Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.002>.
- Leung, W., Singh, I., McWilliams, S., Stockler, S., & Ipsiroglu, O. S. (2020). Iron deficiency and sleep – a scoping review. *Sleep Medicine Reviews*, 51, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2020.101274>.
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., et al. (2020). Ferroptosis: Past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2), 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>.
- Licher, S., Darweesh, S. K. L., Wolters, F. J., Fani, L., Heshmatollah, A., Mutlu, U., et al. (2019). Lifetime risk of common neurological diseases in the elderly population. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 90(2), 148–156. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318650>.
- Li, H., & Qian, Z. M. (2002). Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Medicinal Research Reviews*, 22(3), 225–250. <https://doi.org/10.1002/med.10008>.
- Liu, J.-L., Fan, Y.-G., Yang, Z.-S., Wang, Z.-Y., & Guo, C. (2018). Iron and Alzheimer's disease: From pathogenesis to therapeutic implications. *Frontiers in Neuroscience*, 12(632), 10–23. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00632>.

- MacGillivray, R. T. A., Bewley, M. C., Smith, C. A., He, Q.-Y., Mason, A. B., Woodworth, R. C., et al. (2000). Mutation of the iron ligand His 249 to glu in the N-lobe of human transferrin abolishes the dilysine “trigger” but does not significantly affect iron release [†] · [‡]. *Biochemistry*, *39*(6), 1211–1216. <https://doi.org/10.1021/bi991522y>.
- MacGillivray, R. T. A., Moore, S. A., Chen, J., Anderson, B. F., Baker, H., Luo, Y., et al. (1998). Two high-resolution crystal structures of the recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release [†] · [‡]. *Biochemistry*, *37*(22), 7919–7928. <https://doi.org/10.1021/bi980355j>.
- McCarthy, R. C., & Kosman, D. J. (2015). Iron transport across the blood–brain barrier: Development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(4), 709–727. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1771-4>.
- McWhirter, L., Ritchie, C., Stone, J., & Carson, A. (2020). Functional cognitive disorders: A systematic review. *The Lancet Psychiatry*, *7*(2), 191–207. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30405-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30405-5).
- Mills, E., Dong, X., Wang, F., & Xu, H. (2010). Mechanisms of brain iron transport: Insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Medicinal Chemistry*, *2*(1), 51–64. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.140>.
- Möller, H. E., Bossoni, L., Connor, J. R., Crichton, R. R., Does, M. D., Ward, R. J., et al. (2019). Iron, myelin, and the brain: Neuroimaging meets neurobiology. *Trends in Neurosciences*, *42*(6), 384–401. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.03.009>.
- Muhoberac, B. B., & Vidal, R. (2019). Iron, ferritin, hereditary ferritinopathy, and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 1195. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01195>.
- Nasrabad, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018). White matter changes in Alzheimer’s disease: A focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0515-3>.
- Page, M. G. P. (2019). The role of iron and siderophores in infection, and the development of siderophore antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *69*(Suppl. ment_7), S529–S537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>.
- Pardridge, W. M. (2017). Delivery of biologics across the blood–brain barrier with molecular trojan horse technology. *BioDrugs*, *31*(6), 503–519. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0248-z>.
- Pardridge, W. M. (2020). Blood–brain barrier and delivery of protein and gene therapeutics to brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*, 373. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00373>.
- Piao, Y.-S., Lian, T.-H., Hu, Y., Zuo, L.-J., Guo, P., Yu, S.-Y., et al. (2017). Restless legs syndrome in Parkinson disease: Clinical characteristics, abnormal iron metabolism and altered neurotransmitters. *Scientific Reports*, *7*(1), 10547. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10593-7>.
- Picca, A., Mankowski, R. T., Kamenov, G., Anton, S. D., Manini, T. M., Buford, T. W., et al. (2019). Advanced age is associated with iron dyshomeostasis and mitochondrial DNA damage in human skeletal muscle. *Cells*, *8*(12), 1525. <https://doi.org/10.3390/cells8121525>.
- Pinheiro, R. G. R., Granja, A., Loureiro, J. A., Pereira, M. C., Pinheiro, M., Neves, A. R., et al. (2020). Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer’s disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *148*, 105314. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>.
- Prakash, A., Dhaliwal, G. K., Kumar, P., & Majeed, A. B. A. (2017). Brain biometals and Alzheimer’s disease – boon or bane? *International Journal of Neuroscience*, *127*(2), 99–108. <https://doi.org/10.3109/00207454.2016.1174118>.

- Puy, V., Darwiche, W., Trudel, S., Gomila, C., Lony, C., Puy, L., et al. (2018). Predominant role of microglia in brain iron retention in Sanfilippo syndrome, a pediatric neurodegenerative disease. *Glia*, *66*(8), 1709–1723. <https://doi.org/10.1002/glia.23335>.
- Qian, Z., & Ke, Y. (2019). Brain iron transport. *Biological Reviews*, *94*(5), 1672–1684. <https://doi.org/10.1111/brv.12521>.
- Ropele, S., Enzinger, C., & Fazekas, F. (2017). Iron mapping in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clinics of North America*, *27*(2), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2016.12.003>.
- Rouault, T. A. (2013). Iron metabolism in the CNS: Implications for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(8), 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrn3453>.
- Roy Sarkar, S., & Dutta, R. (2019). Neurological diseases associated with brain iron accumulation. *Acta Scientific Neurology*, *3*(1), 53–61. <https://doi.org/10.31080/ASNE.2020.03.neurological-diseases-associated-with-brain-iron-accumulation>.
- Sabbir, M. G. (2018). Loss of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 leads to aberrant transferrin phosphorylation and trafficking: A potential biomarker for Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *5*, 99. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00099>.
- Sánchez-Castañeda, C., Squitieri, F., Di Paola, M., Dayan, M., Petrollini, M., & Sabatini, U. (2015). The role of iron in gray matter degeneration in Huntington's disease: A magnetic resonance imaging study: The role of iron in gray matter loss in HD. *Human Brain Mapping*, *36*(1), 50–66. <https://doi.org/10.1002/hbm.22612>.
- Scassellati, C., Bonvicini, C., Benussi, L., Ghidoni, R., & Squitti, R. (2020). Neurodevelopmental disorders: Metallomics studies for the identification of potential biomarkers associated to diagnosis and treatment. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, *60*, 126499. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126499>.
- Sfera, A., Bullock, K., Price, A., Inderias, L., & Osorio, C. (2018). Ferrosenescence: The iron age of neurodegeneration? *Mechanism of Ageing and Development*, *174*, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.012>.
- Shamsi, A., Mohammad, T., Khan, M. S., Shahwan, M., Husain, F. M., Rehman, M. T., et al. (2019). Unraveling binding mechanism of Alzheimer's drug rivastigmine tartrate with human transferrin: Molecular docking and multi-spectroscopic approach towards neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, *9*(9), 495. <https://doi.org/10.3390/biom9090495>.
- Simpson, I. A., Ponnuru, P., Klinger, M. E., Myers, R. L., Devraj, K., Coe, C. L., et al. (2015). A novel model for brain iron uptake: Introducing the concept of regulation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *35*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.168>.
- Singh, Y. P., Pandey, A., Vishwakarma, S., & Modi, G. (2019). A review on iron chelators as potential therapeutic agents for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular Diversity*, *23*(2), 509–526. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9878-4>.
- Siotto, M., Filippi, M. M., Simonelli, I., Landi, D., Ghazaryan, A., Vollaro, S., et al. (2019). Oxidative stress related to iron metabolism in relapsing remitting multiple sclerosis patients with low disability. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(86), 174–182. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00086>.
- Sokolov, A. V., Voynova, I. V., Kostevich, V. A., Vlasenko, A. Y., Zakharova, E. T., & Vasilyev, V. B. (2017). Comparison of interaction between ceruloplasmin and lactoferrin/transferrin: To bind or not to bind. *Biochemistry*, *82*(9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1134/S0006297917090115>.
- Stankiewicz, J. M., Neema, M., & Ceccarelli, A. (2014). Iron and multiple sclerosis. *Neurobiology of Aging*, *35*, S51–S58. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.039>.
- Sun, Y., Pham, A. N., Hare, D. J., & Waite, T. D. (2018). Kinetic modeling of pH-dependent oxidation of dopamine by iron and its relevance to Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(859), 68–85. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00859>.

- Taniguchi, M., Okayama, Y., Hashimoto, Y., Kitaura, M., Jimbo, D., Wakutani, Y., et al. (2008). Sugar chains of cerebrospinal fluid transferrin as a new biological marker of Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 26(2), 117–122. <https://doi.org/10.1159/000147479>.
- Testi, C., Boffi, A., & Montemiglio, L. C. (2019). Structural analysis of the transferrin receptor multifaceted ligand(s) interface. *Biophysical Chemistry*, 254, 106242. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106242>.
- Todorich, B., Zhang, X., Slagle-Webb, B., Seaman, W. E., & Connor, J. R. (2008). Tim-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 107(6), 1495–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05678.x>.
- Uranga, R. M., & Salvador, G. A. (2018). Unraveling the burden of iron in neurodegeneration: Intersections with amyloid beta peptide pathology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/2850341>.
- Vellieux, G., & d'Ortho, M.-P. (2020). Le syndrome des jambes sans repos. *La Revue de Médecine Interne*, 41(4), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.01.001>.
- Wally, J., Halbrooks, P. J., Vonnrhein, C., Rould, M. A., Everse, S. J., Mason, A. B., et al. (2006). The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24934–24944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604592200>.
- Wang, M., Lai, T. P., Wang, L., Zhang, H., Yang, N., Sadler, P. J., et al. (2015). “Anion clamp” allows flexible protein to impose coordination geometry on metal ions. *Chemical Communications*, 51(37), 7867–7870. <https://doi.org/10.1039/C4CC09642H>.
- Wang, L., Yin, Y.-L., Liu, X.-Z., Shen, P., Zheng, Y.-G., Lan, X.-R., et al. (2020). Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00189-z>.
- Wawer, A. A., Jennings, A., & Fairweather-Tait, S. J. (2018). Iron status in the elderly: A review of recent evidence. *Mechanism of Ageing and Development*, 175, 55–73. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.07.003>.
- White, K. N., Conesa, C., Sánchez, L., Amini, M., Farnaud, S., Lorvorlak, C., et al. (2012). The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.006>.
- Yanase, K., Uemura, N., Chiba, Y., Murakami, R., Fujihara, R., Matsumoto, K., et al. (2020). Immunoreactivities for hepcidin, ferroportin, and hephaestin in astrocytes and choroid plexus epithelium of human brains. *Neuropathology*, 40(1), 75–83. <https://doi.org/10.1111/neup.12611>.
- Yang, N., Zhang, H., Wang, M., Hao, Q., & Sun, H. (2012). Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. *Scientific Reports*, 2(1), 999. <https://doi.org/10.1038/srep00999>.
- Yu, S., Cao, C., Zuo, L., Chen, Z., Lian, T., Wang, F., et al. (2018). Clinical features and dysfunctions of iron metabolism in Parkinson disease patients with hyper echogenicity in substantia nigra: A cross-sectional study. *BMC Neurology*, 18(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1016-5>.
- Zanella, I., Filosto, M., & Biasiotto, G. (Eds.). (2020). *Iron and neurodegeneration*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/978-2-88963-451-4>.
- Zuo, L.-J., Yu, S.-Y., Hu, Y., Wang, F., Piao, Y.-S., Lian, T.-H., et al. (2016). Serotonergic dysfunctions and abnormal iron metabolism: Relevant to mental fatigue of Parkinson disease. *Scientific Reports*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0018-z>.