

Ferredoxinas

Daniela Franco Bodek y Silvia E. Cañillo Blum*

ABSTRACT (Ferredoxins)

Ferredoxins are soluble proteins that contain iron-sulfur clusters and have low redox potentials. They are present in bacteria, plants, algae and animals and function as electron carriers both in respiration and photosynthesis; and are found as: Type [2Fe-2S], Type [4Fe-4S] and Type [3Fe-4S]. Their ubiquitous presence especially in ancestral organisms has led to the idea that Fe-S proteins are very old proteins that appeared in early stages of evolution. They form a particularly versatile and useful, as well as modular and simple group of metalloproteins that achieve a vast number of functions. Here the characteristics of the different types of ferredoxins and their biological functions are discussed, together with an overview of the spectroscopic techniques employed for their study. Additionally, the result of kinetic studies of ferredoxins and inorganic compounds to learn about the reaction mechanisms are included.

KEYWORDS: ferredoxins, spectroscopy, functions, kinetic studies

Antecedentes

El nombre de ferredoxinas se ha usado para denominar a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre. Éstas son pequeñas, solubles, con bajos potenciales redox y funcionan como acarreadores de electrones en diversas rutas metabólicas, tanto en bacterias como en plantas, algas y animales (Beinert, 1997; Schmitter *et al.*, 1988; Fukuyama, 2004).

Este término se dio inicialmente a una proteína de hierro no-hemo aislada de la bacteria anaerobia *Clostridium pasteurianum* cuya función era la transferencia de electrones en el proceso de fijación de nitrógeno (Mortenson, Valentine, & Carnahan, 1962). Posteriormente se aisló una proteína de cloroplastos de espinaca que transfiere electrones de las reacciones fotoquímicas a dinucleótidos de piridina, a la que también se le dio el nombre de ferredoxina (Tagawa & Arnon, 1962).

El grupo prostético hierro-azufre confiere a la proteína propiedades de absorción en la región del visible, de manera que las disoluciones de ferredoxinas oxidadas son rojizas, y se decoloran en la reducción (Rawlings, Siiman, & Gray, 1974; Schmitter *et al.*, 1988).

Dependiendo de la organización de los átomos de hierro y azufre en el cúmulo, las ferredoxinas se organizan en tres tipos: [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S], figura 1. En las bacterias se encuentran una gran cantidad de ferredoxinas que difieren tanto en secuencia de aminoácidos, como en función y en tipo. En cambio, los eucariontes contienen apenas una o dos ferredoxinas del tipo [2Fe-2S], siendo las plantas una

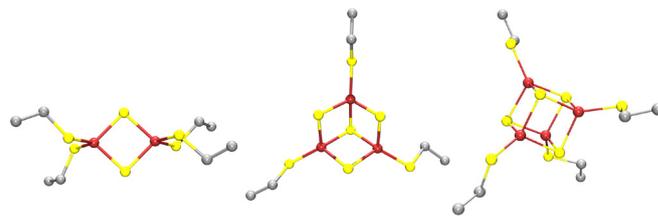


Figura 1. Cúmulos de hierro y azufre tipos: [2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S] respectivamente. Los átomos de azufre se representan con amarillo y los de hierro con rojo.

excepción pues contienen diversas isomorfas de este mismo tipo (Beinert, 1997; Kristensen, 2010).

El sueño de cualquier químico bioinorgánico que trabaja en sistemas biológicos es contar con una técnica sensible y selectiva con la cual sea posible identificar en forma clara y precisa los diferentes tipos de centros metálicos. En el caso de centros de hierro-azufre la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) puede tener este papel en gran medida, aunque con frecuencia se requieren técnicas complementarias (Guigoirelli & Bertrand, 1999).

Debido a los avances de los últimos 30 años, se ha podido mejorar considerablemente en el estudio de las propiedades electrónicas de los centros hierro-azufre. El punto clave que ha permitido esto es la relación fructífera de distintas aproximaciones, como son la síntesis de compuestos análogos, modelaje teórico y estudios espectroscópicos principalmente. Los estudios de modelaje han estado fuertemente estimulados por la información proporcionada en forma permanente proveniente de experimentos de resonancia paramagnética electrónica (RPE), espectroscopía de Mössbauer, ENDOR (doble resonancia electrón-núcleo, por sus siglas en inglés), dicroísmo circular magnético (DCM) y resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, la técnica básica para detectar, cuantificar y caracterizar las

* Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, DF.

Correo electrónico: blum@unam.mx

Fecha de recepción: 28 de septiembre de 2012.

Fecha de aceptación: 29 de diciembre de 2012.

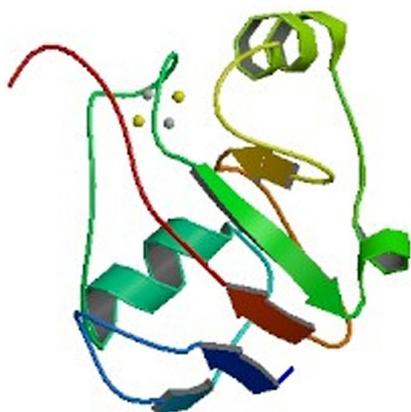


Figura 2. Estructura cristalina de ferredoxina [2Fe-2S] de *Escherichia coli*, tipo adrenoquina, PDB 1I7H.

propiedades redox de los centros hierro-azufre en los sistemas biológicos es la RPE (Beinert, 2000; Kristensen, 2010).

Tipo [2Fe-2S]

Las ferredoxinas de este tipo son proteínas ácidas de 11-15 kDa. Esta superfamilia de ferredoxinas, las cuales contienen un cúmulo [2Fe-2S] por molécula y un plegamiento peptídico similar, se organiza en dos subfamilias de ferredoxinas: las mitocondriales, de arqueobacterias halófilas, bacterias y vertebrados (llamadas adrenoquinas) y las de plantas. La ferredoxina aislada de cloroplastos de espinaca es representativa de esta última (Fukuyama, 2004), ver figura 2.

Tipo planta

Las ferredoxinas más típicas de esta superfamilia ([2Fe-2S]), se encuentran en plantas, principalmente funcionan en la fotosíntesis distribuyendo electrones del fotosistema I a diversas enzimas dependientes de ferredoxina, en las que los equivalentes reductores se emplean para la producción

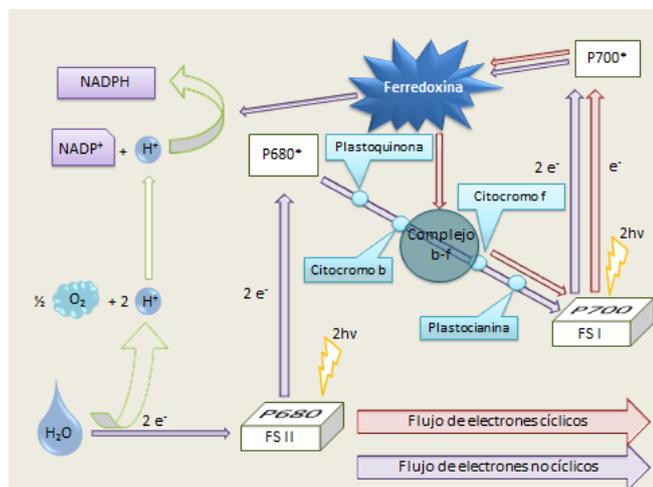


Figura 3. Transferencia de electrones en la fotosíntesis.

de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), asimilación de nitrógeno y azufre y para la fijación de nitrógeno (figura 3).

Algunas de las enzimas dependientes de ferredoxina son (Beinert, 2000):

- Nitrito reductasa, que reduce el nitrito a amonio (figura 4).
- Glutamato sintasa, que sintetiza ácido glutámico de glutamato y 2-oxo-glutamato.
- Sulfito reductasa, que reduce sulfito a sulfuro.
- Ferredoxina-tiorredoxina reductasa, que reduce los puentes disulfuro de la tiorredoxina.

Sin embargo, la función principal de la ferredoxina en plantas es la transferencia de dos electrones, en dos pasos sucesivos, del fotosistema I reducido a la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR), en donde se produce NADPH para la asimilación de dióxido de carbono.

Hay diversas isomorfas (de ferredoxinas) en las plantas tanto en las células fotosintéticas como en células no fotosintéticas. En células de frutas y raíces ocurre la reacción inversa al flujo de electrones de la fotosíntesis, donde la ferredoxina es reducida por la FNR usando NADP para luego transferir electrones a las enzimas dependientes de ferredoxina.

Los residuos de cisteína que se unen al cúmulo inorgánico están espaciados de manera característica C-X₄-C-X₂-C (donde C es cisteína y X cualquier otro aminoácido), lo cual confiere tres de los cuatro azufres orgánicos que coordinan a los dos átomos de hierro. El cuarto residuo se encuentra alejado 29 residuos en la estructura primaria. El plegamiento es parecido al de la ubiquitina, conocido como β-grasp (o asa-β en español). Se constituye de cuatro hojas beta antiparalelas y una hélice alfa perpendicular (Hase, Schurmann & Knaff, 2006).

El espectro electrónico de absorción en la región UV-visible de ferredoxina de espinaca se obtuvo tanto para la forma oxidada como para la reducida entre 600 y 1200 nm (Rawlings *et al.*, 1974), figura 5. Para la ferredoxina oxidada se observaron bandas de absorción relativamente débiles

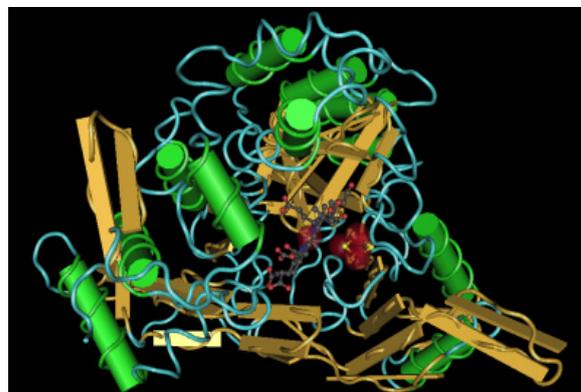


Figura 4. Estructura de nitrito reductasa de espinaca. Ec 1.7.7.1 (Swamy *et al.*, 2005).

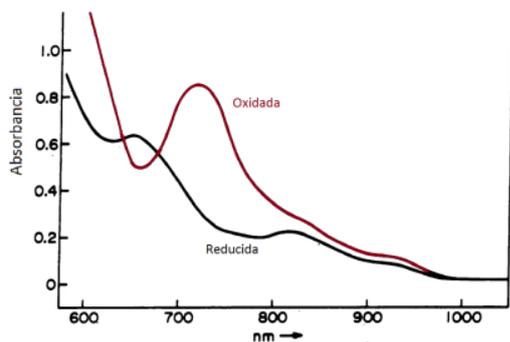


Figura 5. Espectros electrónicos de ferredoxina de espinaca, oxidada y reducida en una mezcla de D₂O: etilenglicol 1:1, T = 77 K. La concentración de la proteína es 1×10^{-3} M. Celda de 1 cm de trayectoria óptica (Rawlings *et al.*, 1974).

en 720, 820 y 920 nm, mientras que para la reducida en 652, 820 y 920 nm. Estos resultados espectroscópicos muestran que los dos centros de Fe(III) en la ferredoxina oxidada no son equivalentes y que las bandas en 820 y 920 nm están asociadas al sitio no reducible de Fe(III) tetraédrico, debido a que éstos no cambian. La banda en 720 nm presente en el espectro de ferredoxina oxidada se atribuye a una transición *d-d*, asignada a la transición ${}^4T_1 \leftarrow {}^6A_1$, mientras que la que se observa en 652 nm en el espectro de la ferredoxina reducida puede asignarse ya sea a una transición ${}^3T_1 \leftarrow {}^5E$ en Fe(II)S₄ tetraédrico o a una excitación de intervalencia Fe(II) → Fe(III).

Por otro lado, mediante estudios magnéticos a temperatura variable se estableció que existe un acoplamiento anti-ferromagnético entre los dos centros de Fe(III), en estado basal 6A_1 . La interpretación de los datos magnéticos para la ferredoxina reducida indicó acoplamiento anti-ferromagnético entre un Fe(II) (5E) – Fe(III) (6A_1); experimentos de Mössbauer y ENDOR son consistentes con esta interpretación (Rawlings *et al.*, 1974).

Los espectros de RPE de ferredoxinas tipo [2Fe-2S]^{2+,1+} de plantas, en su forma reducida, son de tipo rómbico, con un valor de $g_{\text{prom}} = (g_x + g_y + g_z) \approx 1.96$, y son semejantes a los observados para estas especies en una variedad de organismos vivos, de bacterias a mamíferos.

Discriminar entre estos dos tipos de centros generalmente representa un reto para los espectroscopistas de RPE (Guigoiarelli & Bertrand, 1999; Hearshen *et al.*, 1986; Gibson, Hall, Thornley, & Whatley, 1966).

Tipo mitocondriales

Las andredoxinas, ferredoxinas de vertebrados, se encuentran en la corteza suprarrenal y en la placenta humana. Transfieren electrones de la ferredoxina-NADPH dependiente-reductasa al citocromo P450, donde se sintetizan la bilis, esteroides y vitamina D.

Se estudió el cúmulo reducido [2Fe-2S] de adrenodoxina y ferredoxina de *Arthrospira plantensis* mediante ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*, por sus siglas en inglés)

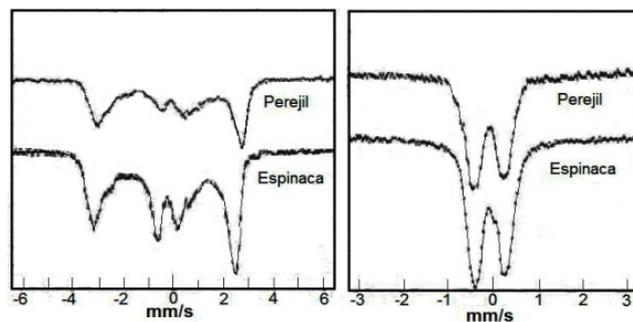


Figura 6. Espectros de Mössbauer. A la izquierda ferredoxinas reducidas y a la derecha oxidadas de espinaca y de perejil (Dunham *et al.*, 1971).

en banda X. Al emplear una técnica en dos dimensiones (HYSCORE, *Hyperfine Sub-level Correlation*, por sus siglas en inglés) se mostró que el cúmulo participa en interacciones magnéticas débiles con varios nitrógenos en cada una de las proteínas. Los datos de ESEEM indican que existe una posible influencia de cambios estructurales relacionados con procesos redox, cuando se emplearon datos de estructuras disponibles para proteínas relacionadas en dos estados redox diferentes (Dikanov, *et al.*, 2009).

Estudios de espectroscopia Mössbauer de seis ferredoxinas del tipo [2Fe-2S] tanto de plantas como de mamíferos a diversas temperaturas proporcionaron los parámetros espectroscópicos con los que se pudo determinar:

- Que en las formas oxidadas de las proteínas los estados de oxidación y de espín de los átomos de hierro son Fe^{III} de alto espín ($S = 5/2$), los espines se encuentran acoplados dando como resultado especies diamagnéticas a temperaturas menores a 100 K.
- En el estado reducido de las proteínas el centro activo contiene un sitio férrico de alto espín, acoplado con un sitio ferroso de alto espín ($S = 2$), produciendo una especie paramagnética ($S = 1/2$) a bajas temperaturas.

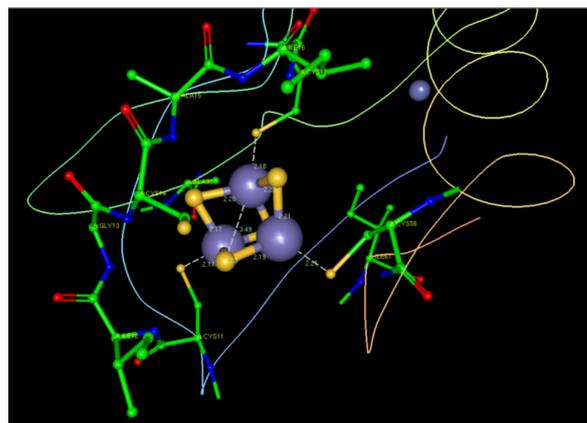


Figura 7. Sitio activo de ferredoxina de *Pyrococcus furiosus*. PDB 3PNI.

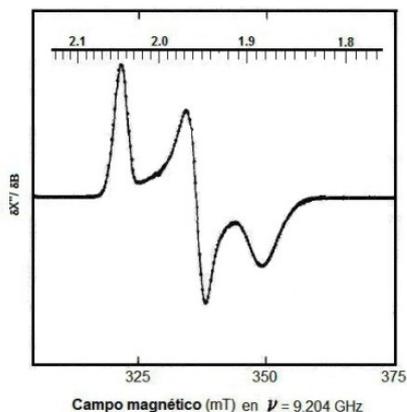


Figura 8. Espectros de RPE de ferredoxina reducida [2Fe-2S] de *Synechococcus idus* (Hearshen *et al.*, 1986).

- En las ferredoxinas de espinaca y perejil, la simetría de los ligantes alrededor del sitio activo de las proteínas reducidas es tetraédrico.
- Los sitios de hierro tanto en las formas oxidadas como reducidas de todas las proteínas es semejante (Dunham *et al.*, 1971).

Como ejemplo, en la figura 6 se muestran espectros de Mössbauer de ferredoxina.

Tipo [4Fe-4S] y [3Fe-4S]

Por otra parte, las ferredoxinas de bacterias representadas por la ferredoxina aislada de *C. pasteurianum*, son distintas de las presentes en plantas, no solo en los cúmulos de hierro y azufre, pueden tener uno o dos cúmulos de [4Fe-4S] o [3Fe-4S], sino también en el plegado de las cadenas polipeptídicas. En muchos casos, estos tipos son interconvertibles (Beinert, 1997).

Los cúmulos son tipo cubano, con átomos de hierro y azufre alternados en los vértices de un cubo distorsionado. El motivo de coordinación de cisteína en estos tipos está dado en una cadena polipeptídica de 60-100 aminoácidos y es C-X₂-C-X₂-C, donde la cisteína central se sustituye por ácido aspártico en el caso de los cúmulos con 3Fe, ver figura 7.

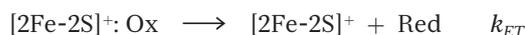
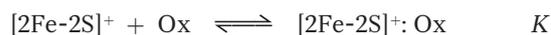
Puede parecer sorprendente que las características específicas de los espectros de las especies de [3Fe-4S]¹⁺ se hayan probado hasta fines de 1980. Inicialmente el espectro (centrado en $g \approx 2.01$) se pensó que correspondía a un radical o al centro [4Fe-4S]¹⁺. A partir de 1980, la baja anisotropía de la señal de RPE ha facilitado la detección de estos complejos unidos a membranas de las cadenas respiratorias o de otras metaloenzimas.

Los centros [4Fe-4S]^{3+/2+} muestran un espectro de RPE centrado en aproximadamente $g \approx 2$ en la forma oxidada, no obstante los valores de g y la forma del espectro difieren de aquellos que contienen solo tres átomos de Fe. En la figura 8 se presenta como ejemplo un espectro de ferredoxina [2Fe-2S] en su forma reducida.

Estudios cinéticos

Los estudios de reacciones redox entre reactivos inorgánicos de peso molecular pequeño y metaloproteínas han ayudado a entender los patrones de reactividad en los sistemas biológicos encargados de la transferencia de electrones. Una de las ventajas de utilizar compuestos de coordinación como sensores redox incluye la posibilidad de controlar el potencial redox, la reactividad intrínseca, la hidrofobia, la carga global, al manipular el conjunto de ligantes. Este tipo de trabajos ha permitido identificar diferentes sitios de transferencia de electrones en la superficie de las proteínas (Armstrong, Hill, & Walton, 1982), que son empleados por las proteínas para unirse a sus socios redox. Sykes estudió ampliamente las reacciones de transferencia de electrones entre ferredoxinas [2Fe-2S] de plantas y reactivos inorgánicos (Adzamlı, *et al.*, 1983; Adzamlı, *et al.*, 1984).

Mecanismo de oxidación de la ferredoxina



Los potenciales redox de ferredoxinas de plantas [2Fe-2S] a pH 8 varían entre -390 y -425 mV, mientras que para algas azul-verdes entre -325 y -390 mV (Cammack *et al.*, 1977). Aquéllos para ferredoxinas bacterianas del tipo 2[4Fe-4S] varían entre -385 y -460 mV a pH 8 y 25°C (Smith & Feinbergs, 1990).

El desarrollo en el área de las proteínas hierro-azufre da testimonio de la vitalidad y enorme expansión de este campo científico: la química bioinorgánica y de la gran diversidad de los inventos de la naturaleza que encontramos en este campo. Se considera que las proteínas Fe-S se encontraron entre los primeros catalizadores. Warburg presentó en 1949 la primera evidencia definitiva de que los compuestos Fe-S tienen un papel significativo en lo que actualmente llamamos hidrogenasa; sin embargo, no prosiguió con este trabajo y durante muchos años las proteínas Fe-S permanecieron ocultas, hasta que el desarrollo tecnológico permitió su aislamiento y caracterización.

Es importante hacer énfasis en que la naturaleza desarrolló a partir de estos cúmulos de Fe-S un sistema admirablemente versátil, útil, modular y en principio simple para lograr una amplia gama de funciones (Beinert, 2000).

Su presencia ubicua, especialmente en organismos ancestrales, ha llevado a la idea de que las proteínas de Fe-S son proteínas muy viejas que aparecieron en las etapas tempranas de la evolución (Meyer, 2008).

Referencias

Adzamlı, K., Henderson, R., Sinclair-Day, J., & Sykes, A. G. Kinetic studies on reactions of iron-sulfur proteins. 8. Inner-sphere reductions of parsley [2Fe-2S] and *Clostridium pasteurianum* 2[4Fe-4S] ferredoxins with a chromium

- (II)-macrocycle complex, *Inorganic Chemistry*, **23**(20), 3069–3073, 1984.
- Adzamli, K., Petrou, A., Sykes, A. G., Rao, K., & Hall, D., Kinetic studies on reactions of iron-sulphur proteins, *Biochemistry Journal*, **211**, 219–226, 1983.
- Armstrong, F. A., Hill, H. A. O., & Walton, N. J. Direct electrochemical oxidation of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin, *FEBS Letters*, **150**(1), 214–218, 1982.
- Beinert, H. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multi-purpose Structures, *Science*, **277**(5326), 653–659, 1997.
- Beinert, H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, **5**(1), 2–15, 2000.
- Cammack, R., Rao, K. K., Barger, C. P., Hutson, K. G., Andrew, P. W., & Rogers, L. J., Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins, *The Biochemical Journal*, **168**(2), 205–9, 1977.
- Dikanov, S. A., Samoilova, R. I., Kappl, R., Crofts, A. R., & Hüttermann, J. The reduced [2Fe-2S] clusters in adrenodoxin and *Arthrospira platensis* ferredoxin share spin density with protein nitrogens, probed using 2D ESEEM, *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, **11**(31), 6807–19, 2009.
- Dunham, W. R., Bearden, A. J., Salmeen, I. T., Palmer, G., Sands, R. H., Orme-Johnson, W., & Beinert, H., The two-iron ferredoxins in spinach, parsley, pig adrenal cortex, *Azotobacter vinelandii*, and *Clostridium pasteurianum*: studies by magnetic field Mössbauer spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **253**(1), 134–152, 1971.
- Fukuyama, K., Structure and function of plant-type ferredoxins, *Photosynthesis research*, **81**(3), 289–301, 2004.
- Gibson, J. F., Hall, D. O., Thornley, J. H., & Whatley, F. R. The iron complex in spinach ferredoxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **56**(3), 987–90, 1966.
- Guigoiarelli, B., & Bertrand, P., Applications of EPR Spectroscopy to the Structural and Functional Study of Iron-Sulfur Proteins. In: A. G. Sykes (ed.), *Advances in Inorganic Chemistry*, **47**, 421–497, 1999. San Diego: Academic Press.
- Hase, T., Schurmann, P., & Knaff, D. B. The interaction of ferredoxin with ferredoxin-dependent enzymes. (J. Golbeck, ed.), *Advances in Photosynthesis and Respiration*, **24**, 477–498, 2006.
- Hearshen, D., Hagen, W., Sands, R., Grande, H., Crespi, H., Gunsalus, I., & Dunham, W., An analysis of g strain in the EPR of two [2Fe-2S] ferredoxins. Evidence for a protein rigidity model, *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **69**(3), 440–459, 1986.
- Kristensen, J., *Synthesis, Purification and Characterization of Ferredoxins with Re-Designed Active Sites. Sites The Journal of 20th Century Contemporary French Studies*. Technical University of Denmark, Department of Chemistry, 2010.
- Meyer, J., Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution, *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, **13**(2), 157–70, 2008.
- Mortenson, L. E., Valentine, R. C., & Carnahan, J. E., An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **7**(6), 448–452, 1962.
- Rawlings, J., Siiman, O., & Gray, H. B., Low Temperature Electronic Absorption Spectra of Oxidized and Reduced Spinach Ferredoxins. Evidence for Nonequivalent Iron(III) Sites, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**(1), 125–7, 1974.
- Schmitter, J. M., Jacquot, J. P., De Lamotte-Guéry, F., Beauvallet, C., Dutka, S., Gadai, P., & Decottignies, P., Purification, properties and complete amino acid sequence of the ferredoxin from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *European Journal of Biochemistry/FEBS*, **172**(2), 405–12, 1988.
- Smith, T., & Feinbergs, A. Redox Properties of Several Bacterial Ferredoxins Using Square Wave Voltammetry, *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(24), 14371–14376, 1990.
- Swamy, U., Wang, M., Tripathy, J. N., Kim, S.-K., Hirasawa, M., Knaff, D. B., & Allen, J. P., Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur:siroheme cofactor, *Biochemistry*, **44**(49), 16054–63, 2005.
- Tagawa, K., & Arnon, D. Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas, *Nature*, **195**, 537–543, 1962.