



# **METALES PRECIOSOS PARA LA VIDA**

**DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO DE NÚMERO**

**Ilmo. Sr. D. Miguel Ángel de la Rosa Acosta**

**Y CONTESTACIÓN POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO**

**Excmo. Sr. D. Enrique Cerdá Olmedo**

**Sesión del 5 de Noviembre de 2015, Sevilla**

**REAL ACADEMIA SEVILLANA DE CIENCIAS**

A mi familia y amigos

A mis colaboradores  
del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis  
y del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja)

## **ÍNDICE**

### *PRIMERA PARTE*

I. Gratulatoria y Recuerdos

### *SEGUNDA PARTE*

Prólogo y Resumen

I. Introducción

II. El hierro y el cobre

III. Evolución convergente: citocromo  $c_6$  y plastocianina

IV. Evolución y geoquímica: biodisponibilidades de hierro y cobre

V. Citocromo *c*: una proteína clave para la vida y muerte celular

VI. Citocromo *c* en respiración

VII. Citocromo *c* en la muerte celular programada

VIII. Búsqueda de nuevas dianas del citocromo *c*

IX. Dianas del citocromo *c* análogas en plantas y humanos

Epílogo

Bibliografía

### *TERCERA PARTE*

I. Discurso de contestación

## *PRIMERA PARTE*

Excmo. Sr., Rector Magnífico de la Universidad de Sevilla

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Sevillana de Ciencias

Ilmo. Sr. Director General de Investigación y Transferencia de  
Conocimiento de la Junta de Andalucía

Excmo. Sr. Presidente del Instituto de Academias de Andalucía

Ilmo. Sr. Vicepresidente de la Real Academia Sevillana de Ciencias

Excmos. e Ilmos. Señores,

Compañeros, amigos y familiares,

Señoras y señores,

## **I. Gratulatoria y Recuerdos**

Para un profesor universitario que desempeña buena parte de su trabajo alternando el silencio de un despacho con el bullir de un laboratorio de investigación, un acto como el de hoy constituye la excepción que rompe el pasar rutinario de los días. Pero no se trata de una excepción cualquiera, pues el ingreso como académico en la Real Sevillana de Ciencias viene a reconocer y dar sentido a toda una vida de entrega a desentrañar los misterios de la ciencia y, por ende, a la búsqueda racional de la verdad.

Ciencia y Verdad, dos elementos selectivos de la vida entendidos como base para construir una visión poética de la sola razón de ser como individuo. Al etólogo y evolucionista Richard Dawkins, autor de *El gen egoísta*, le debemos una expresión, "*la ciencia es la poesía de la realidad*", que precisamente refleja el interés del hombre por adentrarse en el

estudio de su propia existencia con las armas de la poesía, entendiendo esta última en su más estricto sentido etimológico y aristotélico (del griego “ποίησις”, “creación”) como transformación del pensamiento en materia. Este mismo sentido se deja entrever en la belleza de los versos de Gustavo A. Bécquer, representante máximo del romanticismo sevillano del siglo XIX, en su *Rima IV*:

*Mientras la ciencia a descubrir no alcance  
Las fuentes de la vida,  
Y en el mar o en el cielo haya un abismo  
Que al cálculo resista;*

*Mientras la humanidad siempre avanzando  
No sepa a dó camina;  
Mientras haya un misterio para el hombre,  
¡Habrà poesía!*

No puedo menos, pues, que comenzar enhebrando estas primeras líneas pronunciando repetidas veces una sola palabra: gracias. El alto honor de ser reconocido y admitido en esta docta institución no me hace perder el horizonte. Como decía Miguel de Unamuno, el atormentado Rector Perpetuo de la Universidad de Salamanca, “*que no me ciegue la ceguera del honor*”. Y en absoluto el honor que me hacéis me ciega, antes al contrario, me ilumina hasta hacerme ver vuestra extrema generosidad y benevolencia al admitirme entre vosotros. Gracias a todos, muy en particular al presidente de la Academia, a los académicos de la sección de Biología que propugnaron mi candidatura y a mi hermano Diego.

La cita “*A hombros de gigantes*” se le atribuye al filósofo neoplatónico del siglo XII Bernardo de Chartres, quien quería significar así que podemos ver más y más lejos que los que nos precedieron, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos izados y sustentados por la magnitud de sus legados. En efecto, el progreso y desarrollo de la humanidad se basa en el continuo fluir de avances y

descubrimientos de unas generaciones a otras. En el caso particular de los científicos, la transmisión constante de saberes se basa en la *auctoritas* propia de la tan añorada relación maestro-discípulo más que en la *potestas* subyacente en el ahora imperante binomio profesor-alumno. Y fue la *auctoritas* de mi maestro, el excelentísimo académico co-fundador de esta corporación Manuel Losada Villasante, fundador también del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, la que me cautivó desde el inicio y la que me ha guiado a lo largo de muchos años. La perspicacia de su análisis, la profundidad de sus reflexiones, la capacidad para diferenciar el grano de la paja, como él mismo gusta decir, son cualidades innatas de todo un gigante de las ciencias biológicas.

Asimismo de gigante cabe calificar la obra del también excelentísimo académico co-fundador de esta institución Enrique Cerdá Olmedo, pionero en España y creador de la prestigiosa escuela sevillana de genética molecular, que generosamente ha aceptado pronunciar las palabras de contestación a este discurso. Como alumno del profesor Cerdá en los últimos cursos de la licenciatura en biología por la Universidad de Sevilla, años atrás, y como profesor compañero en la asignatura "*Bioquímica, Biotecnología y Sociedad*" del Grado en Bioquímica, en años recientes, pude y puedo admirar su envidiable rapidez y agilidad mental y aprender, en la medida de lo posible, de su agudeza inquisitiva excepcional.

De muchos otros también aprendí, tanto en lo científico como en lo personal, fuentes que generosamente me hicieron partícipe de su infinito y nutritivo manar. Numerosos y diversos en talante y carácter, en formación y conocimiento, varios y distantes en geografía y campos de acción, durante mayor o menor tiempo, todos me enriquecieron con su experiencia y dominio. Gracias, cronológicamente, a mis padres (QEPD), por inculcarme el afán por el buen saber y la ilusión por el bien hacer; a los RRPP Jesuitas, por educarme en un modelo de vida con el compromiso

social como exigencia diaria y última; a mi hermano Fernando, catedrático de la Hispalense, por despertarme el interés por las bases químicas de la vida; a José María Vega (Sevilla), por iniciarme, como director de tesis, en la arena científica; a Paul Heelis (Connah's Quay, Gales, Reino Unido), por adiestrarme en el uso del láser para estudios cinéticos; a David Hall (Londres, Reino Unido), por revelarme las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas; a Miguel García Guerrero (Sevilla), por animarme en las tareas de gestión y dirección; a Gordon Tollin (Tucson, AZ, USA), por descubrirme el mundo del nanosegundo y los electrones en biología; a António V. Xavier (Oeiras, Portugal), por contagiarme su capacidad de emocionarse con el descubrimiento científico; a Ivano Bertini (Florencia, Italia), por abrirme las puertas al mundo de la resonancia magnética nuclear; a Robert Huber (Múnich, Alemania), por dejarme aprender a su lado y disfrutar de la humanidad de un Nobel; a Joan J. Guinovart (Barcelona), Israel Pecht (Rehovot, Israel) y Angelo Azzi (Boston, MA, USA), por instruirme en la diplomacia científica internacional.

La ciencia hoy es más orquestal o coral que solitaria. La ciencia hoy no es batallar al libre albedrío, como antaño fue, sino que requiere el abordaje concertado y sinérgico desde múltiples puntos de vista, con métodos complementarios y técnicas especializadas. Así, el trabajo en red con colegas y laboratorios de todo el mundo nos ha permitido avanzar por terrenos ignotos y alcanzar cimas de otro modo inalcanzables. Gracias, pues, a todos ellos, con particular interés y amistad a Carlos Gómez-Moreno (Zaragoza), Miguel Teixeira y María Armenia Carrondo (Oeiras, Portugal), Lucia Banci y Claudio Luchinat (Florencia, Italia), Gerard Canters y Marcellus Ubbink (Leiden, Holanda), Peter Hildebrandt (Berlín, Alemania) y Rita Bernhardt (Saarbrücken, Alemania).

Y precisamente por esa necesidad de trabajar en equipo, la entrega, generosidad y esfuerzo de los colaboradores más cercanos en el diario



bregar del laboratorio son elementos esenciales para escalar montañas y cumbres elevadas, para conseguir el éxito de los proyectos planteados. Gracias a todos ellos y, en especial, a los que han asumido conmigo responsabilidades de coordinación y supervisión del grupo, a los que antes estuvieron y a los que ahora están, a José Antonio Navarro y Manuel Hervás entre los primeros y a Antonio Díaz Quintana entre los segundos. Particular mención quisiera hacer de Irene Díaz Moreno, quien en los últimos años ha sabido conformar y liderar un grupo bien cohesionado de jóvenes ilusionados gracias a su brillantez intelectual, sentido de equipo y capacidad para dar ejemplo de tesón y dedicación.

Como toda aventura de vanguardia y riesgo, la investigación científica requiere soporte financiero suficiente y sostenido en el tiempo, es decir, confianza y paciencia al margen de los vaivenes políticos del corto plazo y libres de la premura impuesta por la búsqueda de rentabilidades inmediatas. En este sentido debo agradecer a todos nuestros patrocinadores, instituciones públicas y empresas o fundaciones privadas, que de una u otra forma, en un tiempo u otro, han confiado en nuestro trabajo. Entre los primeros cabe destacar a la Unión Europea, la OTAN y los distintos departamentos ministeriales y consejerías responsables de la política científica en los Gobiernos central y autonómico. Entre los segundos, Solvay (Bélgica), Volkswagen-Stiftung (Alemania), Fundación Ramón Areces, Interlox Química, Ebro Foods, Bruker, Grupo Medina, etc.

Desde mi incorporación como profesor ayudante al Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Facultad de Biología de Sevilla, allá por el año 1977, mi actividad investigadora se ha venido desarrollando en el antes citado Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Ubicado entonces en la propia Facultad, el Instituto se trasladó en 1996 a su sede actual en el Parque Científico y Tecnológico de la Isla de la Cartuja, donde comparte edificios e instalaciones con los

Institutos de Investigaciones Químicas y de Ciencia de Materiales de Sevilla, todos ellos a su vez pertenecientes al Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja), que desde 2009 tengo el honor de dirigir. A las tres instituciones cotitulares del centro, el Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC), la Junta de Andalucía y la Universidad de Sevilla, les agradezco su apoyo continuo y confiado durante todos estos años, tanto durante las épocas de bonanza como durante los tiempos más austeros e inciertos.

La ciencia es una actividad enormemente absorbente. Estar en vanguardia, luchar por la primicia del descubrimiento, conocer en qué se afanan otros investigadores en cualquier rincón del planeta requieren una dedicación total y absoluta. Como si fuese una carrera deportiva, el objetivo en ciencia es llegar a la meta y, si es posible, llegar el primero. La única fórmula de éxito es, por tanto, el trabajo continuo y la capacitación, es decir, el desarrollo de las aptitudes tanto innatas como adquiridas hasta llegar a alcanzar el plus diferencial del ganador. Esfuerzo, vocación, constancia, entrega son palabras que asociamos con normalidad al éxito en el deporte, y no cabe duda de que son también los principios que imperan en el ámbito científico. Obvia decir que todo ello implica el sacrificio y la abnegación de los familiares y allegados más próximos, que con frecuencia padecen en silencio tanta urgencia y concentración. Gracias, pues, a Lola, a Miguel y Marta, a María José y José, a mis hermanos, y a los amigos de siempre –muchos de estos cual hermanos– por su cariño, paciencia y comprensión a lo largo de años y años.

Y mi agradecimiento, por último, al Sr. Rector, con especial cercanía y amistad en su condición de investigador del cicCartuja, por haber hecho un hueco en su apretada agenda a fin de presidir este acto y por su hospitalidad al acogernos en este Paraninfo para un acto como el de hoy, que presumo tan entrañable y familiar como universitario y académico.

## *SEGUNDA PARTE*

## Prólogo y Resumen

Una vez sobrepasada la fase inicial gratulatoria y de recuerdos, procede avanzar hacia la exposición de observaciones científicas originales que configuran el eje central de este discurso, lo que afronto con la modestia de Juan Ruiz, más conocido como Arcipreste de Hita, en *El Libro del Buen Amor*, obra miscelánea maestra de la narrativa medieval:

*Por lo mismo que quiero seriamente escribir  
tengo miedo de todo lo que debo decir,  
pues mi ciencia es escasa, y os tengo que pedir  
que vuestra ciencia logre mi ignorancia suplir.*

En el año 1992 tuve el honor de ser de los primeros en recibir el Premio a Jóvenes Investigadores de esta Real Academia, convocado de forma conjunta con la Real Maestranza de Caballería de Sevilla. El premio supuso el reconocimiento al trabajo de todo un grupo de investigación, cuya atención ya se centraba en el estudio de la relación entre la estructura y la función de las metaloproteínas que actúan como donadoras de electrones al fotosistema I, complejo clorofílico anclado en las membranas de los organismos fotosintéticos. En concreto, pretendíamos entender las bases estructurales del reconocimiento molecular e interacción que hacen posible que dos proteínas tan distintas, desde el punto de vista estructural, como el citocromo  $c_6$  (proteína con hierro) y la plastocianina (proteína con cobre) puedan intercambiarse y donar electrones indistintamente al fotosistema I.

En los años que siguieron extendimos nuestros estudios a un amplio abanico de organismos fotosintéticos, desde las cianobacterias más primitivas a las plantas superiores, pasando por las microalgas eucarióticas. De este modo pudimos comprobar que el citocromo  $c_6$  y la

plastocianina poseen similitudes estructurales a nivel de superficie y características fisicoquímicas idénticas de los centros metálicos que les permiten ser reconocidas por el fotosistema I y donar sus electrones con igual eficiencia. Se trataba, pues, de un ejemplo excelente de evolución convergente de proteínas, de evolución biológica a nivel molecular.

Teniendo en cuenta las disponibilidades relativas de hierro y cobre a lo largo de la vida del planeta, lanzamos una hipótesis evolutiva para explicar nuestros hallazgos: En la atmósfera primitiva, de carácter reductor, el hierro estaba mucho más disponible que el cobre para los seres vivos, ya que el hierro reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es soluble en tanto el cobre reducido ( $\text{Cu}^+$ ) precipita. A medida que la atmósfera fue tornándose oxidante debido a la emisión de dióxígeno por los organismos fotosintéticos, el hierro empezó a escasear y el cobre a hacerse disponible, ya que el hierro oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) precipita y el cobre oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) se solubiliza. En estas condiciones, la vida evolucionó acomodándose a la química cambiante del planeta, y viceversa. Al principio, cuando el hierro era mucho más abundante que el cobre, los organismos fotosintéticos aprendieron a utilizar citocromo  $c_6$ , hasta que empezaron a sustituirlo por plastocianina cuando el cobre se hizo mucho más accesible que el hierro. Estos trabajos culminaron, prácticamente, con la demostración en 2003 de que las plantas, en el curso de la evolución, perdieron la capacidad de sintetizar citocromo  $c_6$  y solo fabrican plastocianina.

Desde entonces, el grupo ha seguido trabajando con metaloproteínas, sobre todo de hierro, si bien en un contexto diferente. Hace poco conseguimos identificar toda una compleja red de proteínas en el citoplasma y en el núcleo de las células humanas y de plantas que interaccionan con el citocromo  $c$  en condiciones de muerte celular programada (conocida como PCD, del inglés "*Programmed Cell Death*"). El

citocromo *c* es una hemoproteína que se encuentra en la mitocondria, jugando un papel clave como transportador de electrones en la cadena respiratoria en condiciones homeostáticas, pero sale al citoplasma cuando la célula se prepara para morir y dispara la ruta de activación de caspasas, que son enzimas proteolíticas cuya función es dismantelar de manera ordenada el entramado molecular de las células. El carácter de las proteínas identificadas como dianas nucleocitoplásmicas del citocromo *c* nos ha permitido proponer una hipótesis unificada, en plantas y humanos, sobre el mantenimiento del equilibrio entre la vida y la muerte celular: El citocromo *c* extramitocondrial juega un doble papel al inducir la muerte de las células, no solo disparando las rutas apoptóticas, como está bien establecido, sino también bloqueando las rutas de supervivencia, lo que es un concepto original y relevante. Esta nueva visión del equilibrio metabólico entre la vida y la muerte podría ejemplificarse como sigue: Mientras los operarios están dismantelando una casa de manera ordenada para reutilizar muebles, puertas y ventanas, no tiene sentido que otros operarios estén instalando nuevos muebles, puertas y ventanas. De manera similar, mientras las caspasas están desestructurando la célula según un programa bien establecido, no tiene sentido que las rutas metabólicas normales (replicación del DNA, síntesis de proteínas, etc.) sigan fabricando nuevas macromoléculas y componentes celulares.

Las palabras que suceden están dedicadas, pues, al estudio de los metales, concretamente de aquellos que se consideran esenciales para los seres vivos, de ahí el título "Metales preciosos para la vida". Y es la poesía, no solo en el sentido "creativo" del término griego antes citado, sino también en el sentido "condensativo" de su etimología alemana ("*Dichtung*" significa "poesía", pero la raíz es "*dicht*", "denso"), la que marca la pauta de este discurso, en el que se resume casi cuatro décadas tratando de desvelar entresijos de la ciencia y su verdad.

## **I. Introducción**

De los más de cien elementos que componen la Tabla Periódica de elementos químicos, apenas un puñado de ellos se encuentran en los integrantes moleculares esenciales de los organismos vivos. De hecho, tan solo seis son los elementos mayoritarios de los cuatro grandes grupos de macromoléculas que constituyen la materia viva, como son los carbohidratos (o azúcares), los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estos seis elementos, denominados "elementos biogénicos primordiales", son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre (Losada *et al.* 1998-99).

Un segundo grupo de elementos propios de los seres vivos está integrado por dos metales alcalinos (sodio y potasio) y otros dos alcalino-térreos (calcio y magnesio). Estos cuatro elementos, junto con el cloro, son los responsables principales del mantenimiento de los equilibrios iónicos en los fluidos biológicos. De hecho, la sustancia más parecida al plasma sanguíneo es el agua de mar, reflejo de nuestro origen evolutivo hace miles de millones de años. Por otro lado, la continua creación y disipación de potenciales electroquímicos de calcio, potasio y sodio a un lado y otro de las membranas biológicas son la base de procesos fisiológicos clave, como la contracción muscular y la transmisión del impulso nervioso. El magnesio, a su vez, es el elemento metálico esencial de la clorofila, pigmento de color verde que absorbe la energía de la radiación electromagnética del sol para su transformación en energía química útil por los organismos vegetales.

Finalmente, un tercer grupo de elementos asociados a la vida está constituido por los "oligoelementos", o "elementos traza", denominados así por encontrarse en cantidades mucho más pequeñas que los anteriores. La mayoría pertenece al primer periodo de los metales de

transición. Suelen desempeñar una enorme diversidad de funciones, como corresponde al hecho de que se encuentren formando parte de hasta el treinta por ciento de las proteínas de un organismo. Como ejemplos representativos podemos citar el manganeso, elemento esencial del complejo de oxidación del agua en los organismos fotosintéticos, o el vanadio, constituyente de la hemovanadina, equivalente a la hemoglobina de los mamíferos, para el transporte de oxígeno en los animales tunicados. El molibdeno se encuentra en la mayoría de las enzimas que intervienen en el metabolismo del nitrógeno y el cinc es clave en el sitio catalítico de la anhidrasa carbónica, una de las enzimas más activas e importantes en el mundo vivo pues permite que el anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) sea transportado por la sangre de nuestro organismo desde las células, donde se produce, hasta los pulmones, donde se expulsa al exterior. Pero entre todos estos metales destacan el hierro y el cobre, como veremos a continuación, por su relevancia y distribución universal entre los seres vivos (Losada *et al.* 1998-99).

Los metales han jugado un papel primordial en los sistemas biológicos desde el origen de la vida en la Tierra. Al parecer, las primeras reacciones de la química pre-biótica condujeron a la formación de grandes moléculas complejas –e incluso de largos polímeros– gracias a la acción catalítica coordinada de moléculas orgánicas más sencillas con ciertos metales. La denominada “Teoría de la Arcilla”, en concreto, propone que los elementos de carácter metálico o metaloide presentes en las arcillas facilitaron la aparición de las primeras formas de vida en el fondo de los mares y océanos. Estos se caracterizaban por presiones y temperaturas elevadas, alto nivel de radiación nuclear, abundancia de sustancias ricas en energía y ausencia de oxígeno libre. En el curso de la evolución, muchos de estos metales quedaron integrados en las estructuras de las macromoléculas biológicas, como las proteínas, ácidos nucleicos, etc.



A pesar del papel clave, esencial, de los metales en biología, la percepción que tiene el hombre de la calle al oír hablar de los metales es más bien negativa ya que se les hace responsables de muchos de los graves problemas de contaminación que padecen las sociedades más desarrolladas. Se admite que los metales son fundamentales en el mundo de hoy, en el mundo moderno, ya sea en la propia industria del metal, o metalúrgica –por ejemplo, para la fabricación de automóviles–, o energética –por ejemplo, en las centrales nucleares–, pero con frecuencia se hace referencia a los metales pesados (mercurio, plomo, cadmio, talio) y a los metales radiactivos (uranio, plutonio) como fuentes de contaminación de la atmósfera, aguas y alimentos. Aparte los bien conocidos accidentes en centrales nucleares (Fukushima, Chernóbil, Three Mile Island, etc.), un ejemplo cercano de tales connotaciones negativas es el fatal accidente que ocurrió hace unos años no tan lejos de aquí, en las minas de Aznalcóllar, cuando se rompió el muro de contención de una balsa de desechos y el agua contaminada de metales fue a parar al río Guadiamar, lo que provocó una enorme mortandad de peces y plantas a lo largo de todo el cauce.

La percepción social es distinta si se habla de los conocidos como metales preciosos: oro, plata y platino. Son elementos que permanecen inalterables e inertes desde el punto de vista químico, que no cambian en sus propiedades a pesar de estar expuestos a la atmósfera oxidante. Son elementos muy codiciados y apreciados, de elevado valor comercial, símbolos de riqueza y nivel económico. Aparte el platino, cuyo descubrimiento se debe al español Antonio de Ulloa en el siglo XVIII, el uso del oro y la plata es ancestral y se haya extendido en todas las culturas desde tiempo inmemorial, ya fuera entre los gobernantes de las antiguas civilizaciones tartésicas o amerindias, ya fuera en las monarquías más recientes y otros grupos de poder. De ahí el calificativo de preciosos.

## II. El hierro y el cobre

También preciosos –o, quizá mejor,preciados– para los seres vivos son los elementos hierro y cobre. Y no son preciados por escasez o falta de inercia química, antes al contrario, son muy abundantes en el planeta, de amplio uso en biología y se deterioran fácilmente al contacto con la atmósfera. Lo que les confiere su valor es el hecho de ser elementos principales entre los metales que conforman el grupo de oligoelementos, esenciales para el funcionamiento de nuestras células. Se encuentran en cantidades pequeñas, pero son críticos para la vida.

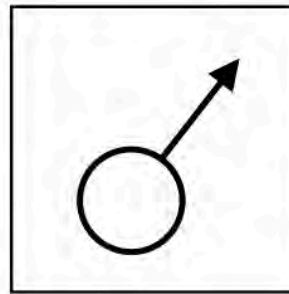
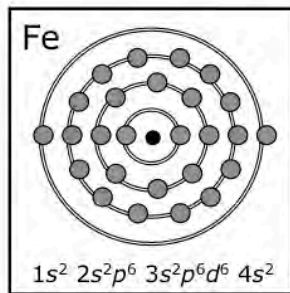
Tanto el hierro como el cobre son bien conocidos en la historia del hombre. Los alquimistas pronto los identificaron entre los distintos elementos naturales y, de hecho, así constan en sus primeras tablas. Se asociaban con dos dioses y sus respectivos planetas, Marte y Venus; el hierro con Marte por la fortaleza del metal y el cobre con Venus por su fragilidad y maleabilidad. En el famoso cuadro de Velázquez representando al dios Marte, este aparece como un soldado fuerte y vigoroso; y en el no menos famoso cuadro de Rubens representando a la diosa Venus, esta aparece mirándose a un espejo de cobre (Fig. 1). De hecho, los símbolos que usaban los alquimistas para representar el hierro y el cobre son los mismos que hoy utilizamos para representar los sexos masculino y femenino: el primero, un círculo con flecha en diagonal hacia arriba y a la derecha; el segundo, un círculo con cruz hacia abajo (De la Rosa *et al.* 2011).

Los dos elementos hierro y cobre se encuentran en los seres vivos formando parte de una enorme diversidad de proteínas. Las de hierro se pueden clasificar en dos grandes grupos: las proteínas hemínicas y las no-hemínicas. Las primeras alojan el grupo hemo o sirohemo y las segundas contienen asociaciones de hierro y azufre muy variadas.



Velázquez

### Marte / Hierro / Varón



♄	♄	♄	♄
Saturne	♄	♄	♄
Lead	♄	♄	♄
♃	♃	♃	♃
Jupiter	♃	♃	♃
Time	♃	♃	♃
♂	♂	♂	♂
Mars	♂	♂	♂
Iron	♂	♂	♂
♁	♁	♁	♁
Sol	♁	♁	♁
♁	♁	♁	♁
Venus	♁	♁	♁
Copper	♁	♁	♁
♁	♁	♁	♁
Mercury	♁	♁	♁
Quicksilver	♁	♁	♁
♁	♁	♁	♁
Luna	♁	♁	♁
Silver	♁	♁	♁
♁	♁	♁	♁
Acetum	♁	♁	♁
Acidissima	♁	♁	♁
Es	♁	♁	♁
Alcibius	♁	♁	♁
Altimon	♁	♁	♁
Anafano	♁	♁	♁
Aunac	♁	♁	♁
Antirama	♁	♁	♁
Aqua	♁	♁	♁
Aqua Fortis	♁	♁	♁
Aqua Regia	♁	♁	♁
Aqua Vita	♁	♁	♁
Arena	♁	♁	♁
Assentem	♁	♁	♁
Arumens	♁	♁	♁
Aurum chalc.	♁	♁	♁
Aurum purum	♁	♁	♁
Linon	♁	♁	♁
Lithum	♁	♁	♁
Calx	♁	♁	♁



Rubens

### Venus / Cobre / Hembra

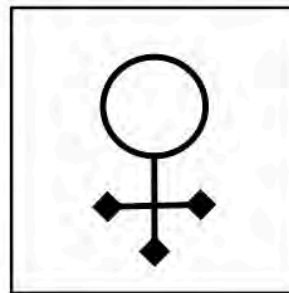
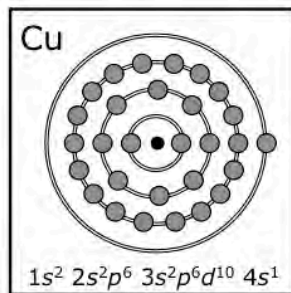


Figura 1. El hierro y el cobre son los dos elementos metálicos más frecuentes en las proteínas metalíferas. Bien conocidos por los alquimistas, el hierro se asociaba a la fortaleza masculina del dios Marte y el cobre a la fragilidad femenina de la diosa Venus.

La mayor parte de proteínas hemínicas poseen el grupo hemo típico, derivado de la ferro-protoporfirina IX, como son la hemoglobina de la sangre, cuya finalidad es transportar el oxígeno aspirado en los pulmones y distribuirlo entre las células de nuestro organismo, o la mioglobina, responsable de la contracción muscular. Este mismo grupo hemo se encuentra en los citocromos, que son de tipos muy distintos (a, b, c, d, f, P450, etc.) y realizan, por tanto, una enorme diversidad de funciones, la mayoría de óxido-reducción. El grupo hemo se encuentra, asimismo, en las oxigenasas, que son enzimas que usan el oxígeno para oxidar otros compuestos químicos, en las peroxidasas, que utilizan el peróxido de hidrógeno como oxidante, y en general en las enzimas de óxido-

reducción, u óxido-reductasas. El grupo sirohemo es un grupo hemo ligeramente modificado, constituyente de enzimas como las reductasas de sulfito y nitrito.

Las proteínas con hierro hemínico constituyen, sin lugar a dudas, el grupo más numeroso y diverso de proteínas metalíferas, tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Por ejemplo, los citocromos del tipo c, como los que se analizan en este trabajo, constituyen por sí mismos un variado grupo de hemoproteínas cuyo cofactor hemínico se encuentra covalentemente unido a la cadena polipeptídica por dos enlaces tioéteres. Estos enlaces se establecen entre los grupos vinilos del hemo y las cadenas laterales de dos residuos de cisteína próximos en la secuencia aminoacídica, en el típico dominio Cys-Xxx-Yyy-Cys-His. Se han descrito hasta tres mecanismos diferentes de modificaciones posteriores a la traducción, incluso dentro del mismo organismo, para ensamblar no solo uno, sino varios grupos hemos a la cadena polipeptídica del apocitocromo. Los citocromos multihémicos, por ejemplo, son frecuentes en las bacterias extremófilas y pueden llegar a albergar hasta dieciséis cofactores hemínicos. Todo ello da idea de la enorme diversidad génica y genómica que subyace detrás de este amplio grupo de proteínas, resultado de la presión evolutiva a lo largo de millones y millones de años.

Las agrupaciones sulfoférricas de las proteínas no-hemínicas son también muy variadas en número y relación de átomos de hierro y azufre, así como en geometría y disposición espacial. Ello explica que las proteínas no-hemínicas participen en una gran variedad de reacciones, la mayoría de transferencia de electrones. A este grupo pertenecen los transportadores ferredoxina y rubredoxina, y ciertas oxigenasas, hidrogenasas o nitrogenasas.

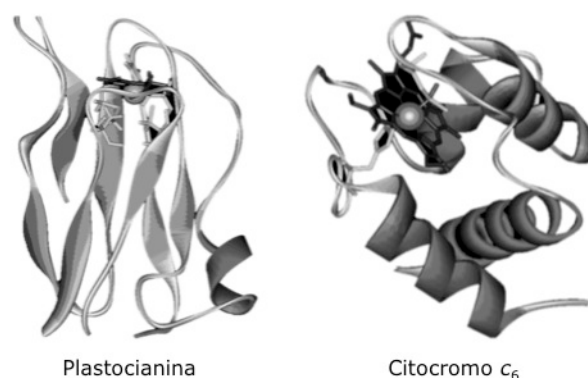
Entre las proteínas de cobre existe igualmente una enorme diversidad. Se agrupan en cinco tipos, según la arquitectura del centro metálico. Al tipo I, con cuatro ligandos de la cadena polipeptídica en disposición tetraédrica, pertenecen las denominadas proteínas azules de cobre, como son la plastocianina, la azurina o la rusticianina. El tipo II, con cuatro aminoácidos también actuando de ligandos si bien en forma de complejo plano cuadrado, se encuentra en enzimas como la reductasa de nitrito, la dismutasa de superóxido y las oxidasas de galactosa o grupos amino. El tipo III es un centro dinuclear, con dos átomos de cobre y una molécula de dioxígeno entre ellos, que se encuentra en la hemocianina, responsable del transporte de oxígeno en los caracoles, y en la tirosinasa, responsable de la hidroxilación de los fenoles. Al tipo IV pertenecen las cuproproteínas con tres centros mononucleares tipo I, como es la ceruloplasmina, principal proteína transportadora de cobre en la sangre, y enzimas como la oxidasa de ascorbato y la lacasa, responsable esta última del ennegrecimiento de la fruta cortada y expuesta al aire por oxidación de fenoles. Por último, el tipo V se caracteriza por ser una combinación de dos centros de cobre, a saber: el cobre A ( $Cu_A$ ) dinuclear y el cobre B ( $Cu_B$ ) mononuclear; este tipo V se observa en la oxidasa de citocromo c mitocondrial, o complejo IV, que es el último complejo de proteínas de membrana de la cadena respiratoria y el que cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua (Losada *et al.* 1998-99).

### **III. Evolución convergente: citocromo $c_6$ y plastocianina**

Entre las propiedades físico-químicas típicas del hierro y el cobre cabe destacar que ambos presentan un amplio abanico de valores de potencial de óxido-reducción en solución acuosa, dependiendo de los números de oxidación de las especies del par redox. En biología, cuando se encuentran formando parte integral de una metaloproteína, el hierro oscila entre los

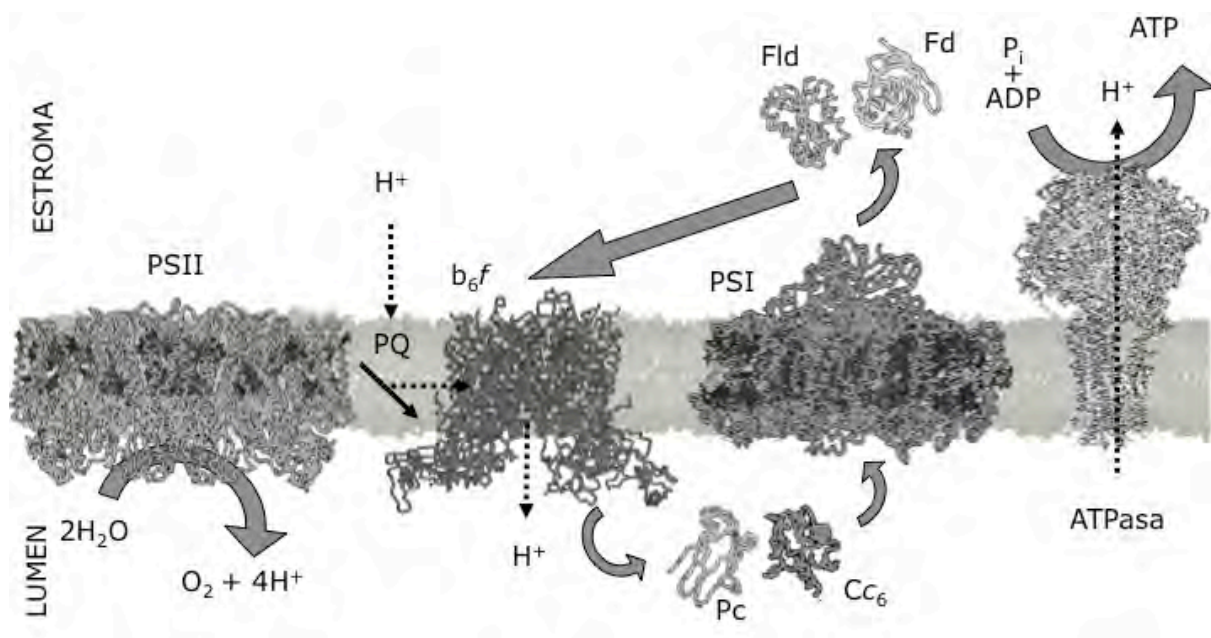
estados ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y el cobre entre los estados cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) y cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Los respectivos valores de potencial de reducción de estos dos pares en solución acuosa a 25 °C son bastante diferentes, 0,77 voltios para el hierro y 0,16 voltios para el cobre.

Sin embargo, cuando estos metales están inmersos en una matriz proteica, o cadena polipeptídica, sus propiedades físico-químicas se pueden ver afectadas de tal modo que los valores de potencial redox cambien de manera drástica. Precisamente esa capacidad que tiene la matriz proteica de alterar las propiedades redox del centro metálico es lo que permite que las metaloproteínas, en general, presenten una enorme diversidad de funciones en el interior de las células vivas. Así sucede, por ejemplo, en el caso del citocromo  $c_6$  y la plastocianina, dos proteínas de tamaño pequeño y masa molecular similar (ca. 10 kilodaltons), cuyos potenciales redox presentan un valor idéntico de 0,35 voltios a pH 7. La primera es una proteína de hierro, con un grupo hemo convencional inserto en una cadena polipeptídica de unos cien aminoácidos que se pliega conformando una estructura globular con cuatro hélices de tipo alfa. La segunda es una proteína azul de cobre tipo I, con un átomo del metal ligado a la cadena polipeptídica (también de unos cien residuos), que se pliega formando una lámina beta en forma de barril (Fig. 2).



**Figura 2.** *La plastocianina y el citocromo  $c_6$  constituyen un ejemplo excelente de evolución convergente: dos proteínas distintas para una misma función. La primera es una proteína con cobre y el segundo contiene hierro hemínico.*

Desde el punto de vista estructural, las dos proteínas son totalmente distintas, sin relación evolutiva aparente alguna y, sin embargo, exhiben el mismo valor de potencial redox, un parámetro que es clave en el gobierno termodinámico de la función y eficiencia de las proteínas que intervienen en reacciones de intercambio de electrones. Tal similitud en el valor de potencial redox significa que ambas proteínas poseen idéntica capacidad de óxido-reducción –es decir, de transferencia de electrones– y, por tanto, pueden participar *a priori* en una misma reacción redox e intercambiar su función. De hecho, ambas proteínas, el citocromo  $c_6$  y la plastocianina, intervienen como transportadores móviles de electrones entre los complejos proteicos de membrana de los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica (plantas, microalgas y cianobacterias) y pueden reemplazarse la una a la otra dependiendo de las condiciones cambiantes del medio, como se describe a continuación (De la Rosa *et al.* 2002; Hervás *et al.* 2003).



**Figura 3.** La cadena de transporte de electrones fotosintético está constituida por diversos complejos proteicos anclados en membrana. Gracias a la energía de la luz, los electrones fluyen, contra-gradiente de potencial redox, desde el agua hasta el nivel del electrodo de hidrógeno. Para más detalles, véase el texto.

La cadena fotosintética de transporte de electrones está compuesta por dos fotosistemas clorofílicos, el fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII), así como por el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*, todos ellos anclados en la membrana tilacoidal (Fig. 3).

Con los tres complejos conectados en serie, uno detrás de otro, e impulsados por la energía de los fotones absorbidos por los dos fotosistemas, los electrones fluyen desde el agua (H<sub>2</sub>O), que sirve como fuente primaria, hasta la ferredoxina (Fd), que actúa como sumidero y aceptor final de la cadena. Al oxidarse en el fotosistema II, el agua pierde electrones y forma oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), que se libera a la atmósfera. Los electrones extraídos al agua son transportados por la plastoquinona (PQ), que es una molécula de carácter hidrófobo y se mueve libremente dentro de la membrana, hasta el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*. Este, a su vez, transfiere los electrones al fotosistema I a través de una metaloproteína soluble de tipo redox que se encuentra en el lumen del tilacoide y que es, precisamente, una de las dos proteínas isopotenciales que acabamos de citar, el citocromo *c<sub>6</sub>* (Cc<sub>6</sub>) o la plastocianina (Pc). Al otro lado de la membrana, en el estroma, los electrones salen finalmente del fotosistema I hacia la ferredoxina, proteína con agrupación sulfoférica de dos átomos de hierro y otros dos de azufre; alternativamente, la ferredoxina puede ser sustituida como sumidero de electrones por la flavodoxina (Fld), que es una proteína con flavina como grupo prostético. En todo caso, esta última proteína reducida, ya sea la ferredoxina o la flavodoxina, actúa como centro distribuidor de electrones hacia el metabolismo reductor asimilatorio de elementos biogénicos, en particular de carbono, nitrógeno y azufre.

El transporte de electrones desde el agua a la ferredoxina o a la flavodoxina conlleva la creación de un gradiente de pH, o diferencia de concentración de protones (H<sup>+</sup>), a un lado y otro de la membrana. En



concreto, la acidulación del lumen tilacoidal tiene lugar por la liberación de protones al oxidarse el agua en el fotosistema II, así como por la translocación de protones del estroma al lumen en el ciclo redox de la plastoquinona asociado al citocromo *b<sub>6</sub>f*. El potencial electroquímico de protones así generado se disipa a través de la enzima ATP-sintetasa (ATPasa), que utiliza la energía liberada para energetizar el ortofosfato, o fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>), y sintetizar trifosfato de adenosina (ATP).

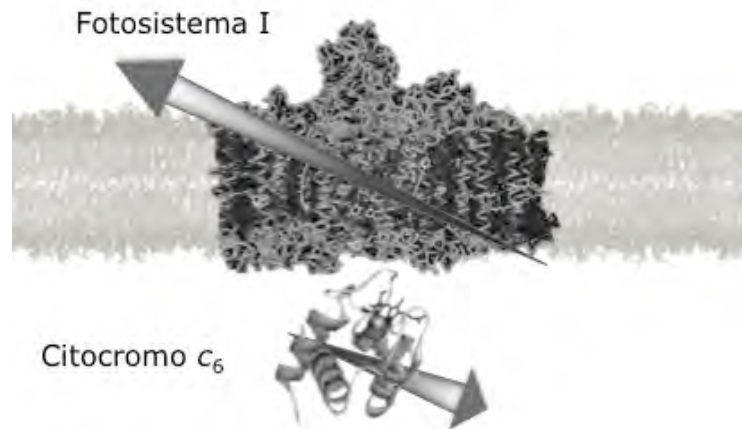
Centrando la atención sobre el citocromo *c<sub>6</sub>* y la plastocianina, veremos que ambos son transportadores móviles de electrones desde el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*, donde se reducen, hasta el fotosistema I, donde se oxidan. Las dos metaloproteínas son perfectamente intercambiables entre sí, pero nunca suelen coexistir en la misma célula sino que más bien se fabrica una u otra dependiendo de las disponibilidades relativas de los metales hierro y cobre. Así, las células fabrican citocromo *c<sub>6</sub>* si disponen de hierro en el medio o plastocianina si el cobre es más abundante. Estamos, pues, ante un claro ejemplo de evolución convergente a nivel molecular: dos estructuras diferentes para una sola función. El concepto es el mismo que el de la evolución convergente de las alas de los pájaros y murciélagos o las aletas de los peces y ballenas. Se trata, en todo caso, de estructuras ancestrales distintas, con un origen evolutivo absolutamente diferente, que van adaptándose en el tiempo para acabar desempeñando la misma función.

La evolución convergente de proteínas –y, en concreto, del citocromo *c<sub>6</sub>* y la plastocianina– promovida por las disponibilidades relativas cambiantes de los elementos químicos en el planeta –y, en concreto, de los metales hierro y cobre– ha sido el objeto principal de las investigaciones de nuestro grupo durante muchos años.

Uno de los primeros problemas que nos planteamos fue llegar a entender los mecanismos que gobiernan la interacción de estos dos transportadores móviles, el citocromo  $c_6$  y la plastocianina, con los complejos anclados en la membrana tilacoidal, a saber: el complejo de citocromos  $b_6f$  y el fotosistema I. Es decir, cómo se produce no solo el reconocimiento molecular entre el complejo de membrana y el transportador que se acerca hasta el punto de permitir el acoplamiento de este último sobre el primero en el sitio de unión especialmente diseñado para él, sino también el trasvase posterior del electrón de uno a otro.

En este punto es clave entender que las proteínas, ya sean móviles o formando complejos de membrana, tienen una determinada carga eléctrica global y cierta asimetría en la distribución local de la misma, como corresponde al contenido, distribución y variabilidad de residuos aminoacídicos de carácter ácido (aspartatos y glutamatos) o básico (lisinas y argininas) que componen sus respectivas estructuras. El citocromo  $c_6$  y la plastocianina, por ejemplo, tienen a pH fisiológico una carga eléctrica neta global determinada –positiva o negativa, según el organismo– en función del contenido en residuos de carácter ácido o básico. Así, la carga global de la proteína es negativa si predominan los residuos ácidos y positiva si predominan los básicos. Pero, además, esos residuos suelen situarse en la superficie, en contacto directo con la solución acuosa y lejos de los residuos hidrófobos del interior, y distribuirse de manera asimétrica, lo que genera un momento dipolar en la molécula. Pues bien, ese momento dipolar es crucial para facilitar la correcta orientación y posterior interacción de la molécula móvil con el complejo de la membrana, que a su vez también posee cierta asimetría en la distribución de cargas y, por consiguiente, su propio momento dipolar. Así, cuando la proteína móvil se encuentra en los alrededores de un complejo de membrana con carga electrostática global de signo contrario, se produce la atracción entre ambos y la proteína móvil se dirige hacia el

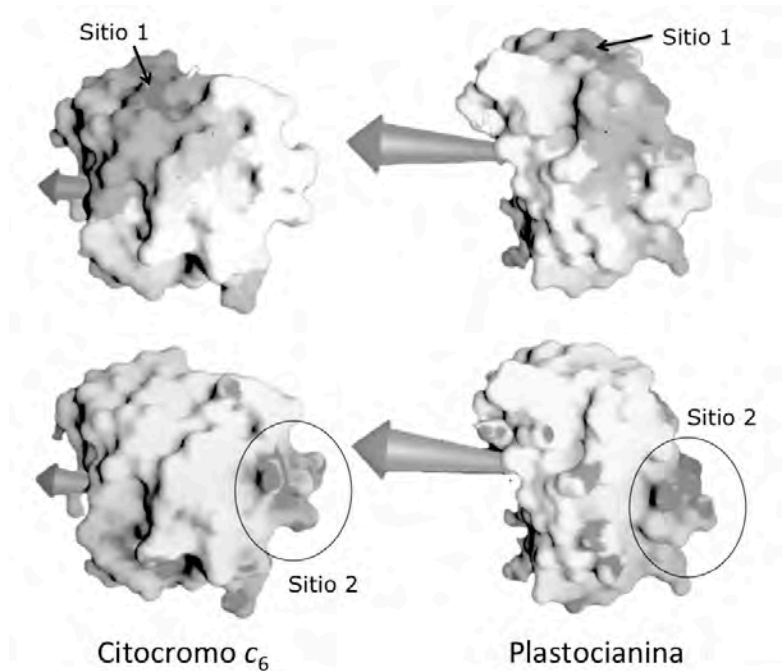
complejo. Cuando están a una distancia menor, la proteína móvil debe girar para acomodarse de manera correcta en su sitio de unión y anclaje en el complejo, lo que hace por alineación, o acoplamiento, de los momentos dipolares entre la proteína móvil y el complejo fijo anclado en la membrana, al igual que se repelen o atraen, según la orientación relativa, dos pequeñas barritas imantadas (Fig. 4).



*Figura 4. El alineamiento de momentos dipolares permite el correcto acoplamiento y anclaje del citocromo  $c_6$ , que es una proteína soluble y móvil, sobre el fotosistema I, que es un complejo proteico inmerso en la membrana tilacoideal.*

El razonamiento de partida, por tanto, fue tomar el momento dipolar del citocromo  $c_6$  y el de la plastocianina como eje de referencia común, es decir, como elemento inicial comparativo para buscar las bases estructurales que expliquen su analogía funcional. Así, procedimos a calcular el momento dipolar de las dos proteínas de origen cloroplástico, pues ambas presentan un claro carácter ácido en organismos eucarióticos. Orientando los respectivos momentos dipolares en dirección este(negativo)-oeste(positivo), se procedió a comparar el potencial electrostático a nivel de superficie de las dos proteínas, pudiéndose identificar una zona de carga electrostática negativa bien delimitada en cada molécula, tanto en el citocromo  $c_6$  como en la plastocianina. A esta región, situada en la cara "este", se le denominó sitio 2, responsable del

establecimiento de las fuerzas electrostáticas en la interfase de interacción con los complejos de membrana (Frazao *et al.* 1995) (Fig. 5).



*Figura 5. Con el momento dipolar como elemento de referencia, la similitud de áreas superficiales del citocromo c<sub>6</sub> y la plastocianina explica la analogía e intercambio funcional de ambas proteínas. El sitio 1, o cara norte, lo componen residuos hidrófobos; el sitio 2, o cara este, lo componen residuos electrostáticos. Para más detalles véase el texto.*

Por otra parte, se realizó un cálculo computacional para identificar el área con mayor probabilidad de salida del electrón situado en el átomo metálico del citocromo c<sub>6</sub> o en el de la plastocianina, es decir, para determinar por dónde llegaría a la superficie el electrón liberado por el hierro ferroso en el caso de la proteína hemínica o por el cobre cuproso en el caso de la cupredoxina. Esto permitió identificar las "zonas calientes" de las dos proteínas desde el punto de vista redox. En el caso concreto del citocromo c<sub>6</sub>, la zona con mayor probabilidad de salida del electrón corresponde al grupo hemo, concretamente al anillo C, pues el hemo se encuentra encajado en la proteína como si fuera una moneda en una ranura y, por tanto, ligeramente accesible a la superficie. Y en el caso de la plastocianina, el epicentro de la zona caliente corresponde a la histidina

87, uno de los cuatro ligandos del átomo de cobre. La zona más activa así identificada, tanto en el citocromo  $c_6$  como en la plastocianina, se caracteriza, además, por el predominio de los residuos de carácter hidrófobo. A esta región, situada en la cara "norte", se denominó sitio 1, responsable del establecimiento de la ruta de transferencia de electrones en la interfase de interacción con los complejos de membrana (Navarro *et al.* 1997; De la Rosa *et al.* 1999, 2002) (Fig. 5).

#### **IV. Evolución y geoquímica: biodisponibilidades de hierro y cobre**

Como hemos indicado antes, el elemento clave impulsor de la evolución convergente que han sufrido el citocromo  $c_6$  y la plastocianina ha sido la biodisponibilidad cambiante –es decir, su accesibilidad relativa a las células– de los dos elementos metálicos, el hierro y el cobre, a lo largo de la vida del planeta (De la Rosa *et al.* 2011).

Uno de los principios básicos de la biología evolutiva es que la adquisición de alimento es el motor principal conductor de la evolución de los seres vivos –ya sean bacterias, hongos, plantas o animales– con la consiguiente aparición de nuevas especies. A nivel celular, la norma sigue manteniendo todo su significado. Así, las células vivas luchan y se adaptan para conseguir del medio circundante los nutrientes primordiales, incluyendo los elementos químicos necesarios para fabricar sus propias moléculas. De hecho, la captación de los elementos y nutrientes necesarios para la vida celular puede llegar a ser un problema grave si aquellos escasean en determinadas condiciones, aunque sea de manera temporal. En el caso concreto de los elementos químicos, hay que tener en cuenta que su disponibilidad a lo largo de la historia del planeta se ha visto seriamente condicionada por la evolución de la atmósfera, que en sus inicios era muy reductora y en la actualidad es muy oxidante.

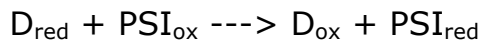
Cuando se origina la Tierra, hace 4.500 millones de años, no había oxígeno libre, todo el oxígeno estaba combinado. La atmósfera era, por tanto, muy distinta a la actual, que contiene un 21 por ciento de oxígeno molecular, o dióxígeno (O<sub>2</sub>). Los elementos químicos fueron respondiendo a esa atmósfera cambiante, lo que hizo que su estado redox y disponibilidad para las células fuera asimismo cambiando. En el caso del hierro y el cobre, por ejemplo, estos se encontraban reducidos en forma de sulfuros ferrosos y cuprosos en la atmósfera inicial, mientras que ahora suelen estar oxidados en hidróxidos férricos y óxidos cúpricos. Lo interesante de todo este proceso es que el hierro reducido es soluble en agua y, por consiguiente, estaba muy disponible en el planeta primitivo, mientras que el hierro oxidado actual precipita y no resulta, por tanto, accesible a las células. Lo contrario ocurre con el cobre, que precipita en estado reducido y es mucho más soluble en estado oxidado. En resumen, la oxidación del hierro y del cobre ha conllevado cambios contrapuestos en sus disponibilidades relativas para las células: al principio, el hierro era muy abundante y fácilmente accesible, pero no así el cobre; en la actualidad, el hierro escasea y el cobre se encuentra con facilidad.

Asumiendo, por tanto, que las disponibilidades relativas de hierro y cobre pudieron haber condicionado la evolución del citocromo *c*<sub>6</sub> y la plastocianina, nos planteamos llevar a cabo un estudio comparado sobre la funcionalidad de ambas proteínas en organismos fotosintéticos de complejidad creciente. Así, escogimos varias cianobacterias (*Nostoc*, *Phormidium*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena* y *Synechocystis*), microalgas verdes (*Monoraphidium*), helechos (*Dryopteris* y *Nephrolepsis*) y plantas (*Arabidopsis* y *Spinacia*). Las cianobacterias fueron los primeros organismos en realizar fotosíntesis oxigénica; se encuentran en ambientes naturales muy diversos y presentan una enorme diversidad.

Mediante la técnica de espectroscopia de excitación por láser, estudiamos las cinéticas y eficiencias de interacción del citocromo  $c_6$  y la plastocianina con el fotosistema I en los organismos indicados. Utilizando un láser de rubí pulsado de alta potencia, que excita las moléculas de clorofila del centro de reacción fotosintético, se consigue tener una elevada población de fotosistemas excitados, con la consiguiente oxidación del par especial de clorofilas (P700) del fotosistema I. A continuación, la vuelta al estado basal inicial se puede seguir registrando en un osciloscopio los cambios de absorbancia debidos a la reducción del P700 y, por tanto, analizar en cada caso las cinéticas de transferencia de electrones desde la proteína donadora, ya sea citocromo  $c_6$  o plastocianina, al fotosistema clorofílico. Fue una sorpresa observar que las cinéticas varían de manera drástica de unos organismos a otros, lo que revela diferencias significativas en sus eficiencias funcionales. En líneas generales, pudimos concluir que los organismos eucarióticos, con cloroplastos diferenciados, presentan cinéticas bifásicas, en tanto que la mayoría de las cianobacterias muestran cinéticas monofásicas. En las cinéticas bifásicas se puede apreciar con claridad una fase inicial muy rápida de oxidación de la proteína donadora, seguida por una segunda fase más lenta.

A fin de explicar las diferencias observadas, propusimos una serie de modelos cinéticos, de complejidad creciente, que debieron ir evolucionando con el tiempo (Hervás *et al.* 1995). Nuestra hipótesis era que las macromoléculas biológicas y, en particular, las proteínas redox deben "aprender" a reconocerse de manera específica e interaccionar unas con otras con eficiencia para el desarrollo y vida normal de la célula. Vendría a ser como los niños cuando empiezan a caminar, que no nacen sabiendo: al principio andan con torpeza, gatean y apenas se mantienen en pie, después se desplazan con equilibrio y rapidez, y con los años algunos hasta pueden correr y ganar competiciones deportivas.

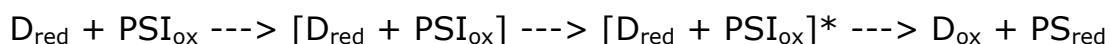
Sobre esta base, clasificamos nuestros modelos cinéticos en tres tipos. El tipo I, más primitivo o menos evolucionado, el menos eficiente, corresponde a un modelo colisional en el que la transferencia del electrón desde la proteína donadora (citocromo  $c_6$  o plastocianina) reducida ( $D_{red}$ ) al fotosistema I oxidado ( $PSI_{ox}$ ) se produce tras la colisión de la proteína móvil con el complejo anclado en la membrana:



El tipo II, más evolucionado y eficiente, corresponde a un modelo con formación de un estado intermediario transitorio entre la proteína donadora y el fotosistema I detectable cinéticamente:



Y el tipo III, el más desarrollado y eficiente, corresponde a un modelo en el que los dos componentes del estado intermediario transitorio se reajustan y acomodan para establecer una ruta bien definida de transferencia de electrones, mucho más rápida, desde el metal de la proteína donadora hasta el fotosistema I:



Así pues, las proteínas que interaccionan entre sí para transferirse electrones lo harían torpemente al principio, según un mecanismo sencillo basado en la probabilidad y frecuencia de colisión (tipo I). Con el tiempo evolucionarían para mejorar el reconocimiento molecular y prolongar la interacción entre ellos (tipo II). Y, por último, acabarían experimentando ligeros cambios conformacionales y reajustes internos en el intermediario formado a fin de acelerar la transferencia del electrón de uno a otro, lo que explicaría las cinéticas bifásicas y la mayor eficiencia (tipo III).



De considerarse general, este principio debería operar no solamente en la interacción del citocromo  $c_6$  y la plastocianina con el fotosistema I, sino también en la interacción de las dos metaloproteínas con el otro complejo de la membrana tilacoidal, con el complejo de citocromos  $b_6f$ . Puesto que el estudio era mucho más simple y, por ende, abordable, procedimos al análisis a fondo y en detalle de las bases estructurales responsables de la interacción entre la plastocianina y el dominio soluble del citocromo  $f$ , que es una de las subunidades integrantes del complejo  $b_6f$ . Para ello utilizamos dos cianobacterias, una mesófila (*Nostoc*) y otra extremófila (*Phormidium*), y comparamos los datos con los que había disponibles en la literatura para el álamo (género *Populus*), una planta superior.

Pudimos comprobar que la plastocianina y el citocromo  $f$  de la cianobacteria *Nostoc* se acoplan literalmente formando un complejo transitorio en cuya zona de interacción se puede identificar con nitidez toda una serie de residuos de carácter ácido o básico, negativos y positivos, que se acomodan formando una especie de cremallera de cargas complementarias en una y otra proteína. Los residuos con carga electrostática de la plastocianina cianobacteriana –en este caso, positivos, a diferencia de los residuos negativos de la plastocianina cloroplástica– se concentran, precisamente, en el denominado sitio 2 del que hablamos anteriormente. Por otro lado pudimos identificar la zona de interacción redox como el sitio 1 de la plastocianina, de carácter hidrófobo, que es el que permite el establecimiento de la ruta de transferencia de electrones. En otras palabras, la plastocianina se une al citocromo  $f$  de manera electrostática, por atracción de cargas de signo contrario de las dos proteínas, mediante su sitio 2 electrostático, si bien es la interacción de naturaleza hidrófoba a través del sitio 1 la responsable de que se establezca la ruta de transferencia de electrones; los aminoácidos hidrófobos del sitio 1 sirven, por otra parte, para eliminar moléculas de agua de la zona de interacción, facilitando así que el electrón pueda pasar

desde el átomo de hierro hemínico del citocromo *f* al átomo de cobre de la plastocianina (Fig. 6).

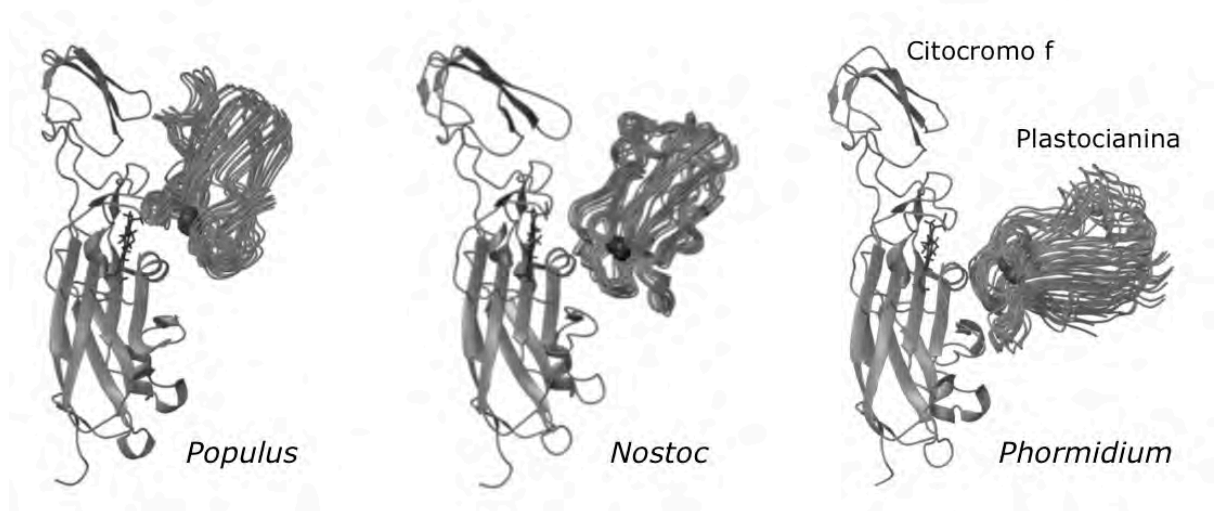


Figura 6. La orientación de la plastocianina al interactuar con el citocromo *f* varía de unos organismos a otros. El área más hidrófoba de la plastocianina (sitio 1, o cara norte) interviene tanto en cianobacterias como en el álamo, pero la zona electrostática (sitio 2, o cara este) participa en el reconocimiento en grado variable, según el organismo. Para más detalles, véase el texto.

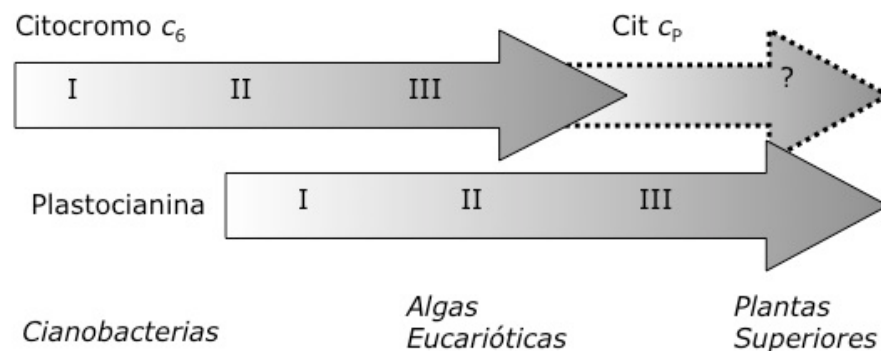
Al comparar la interacción de la plastocianina con el citocromo *f* de otros organismos se puede ver que hay una diferencia considerable entre el álamo y las dos cianobacterias, *Nostoc* y *Phormidium*. Así, la interacción hidrófoba a través del sitio 1 es evidente en los tres organismos, pero la interacción electrostática a través del sitio 2 solo se establece en la planta y en *Nostoc*, pero no en *Phormidium* (Díaz-Moreno *et al.* 2005).

Si tenemos en cuenta que *Phormidium* vive en ambientes naturales a temperaturas mucho mayores que *Nostoc* y asumimos que la vida se originó en ambientes extremos a temperaturas elevadas, las diferencias observadas en las formas de interacción de la plastocianina con el citocromo *f* tienen una fácil explicación teniendo en cuenta que la temperatura no es más que la manifestación de la energía cinética y velocidad de traslación de las moléculas. Así pues, en los organismos termófilos, menos evolucionados, las moléculas en el interior de las células se mueven a una velocidad elevada y, por tanto, la frecuencia de

colisión es suficiente para permitir el encuentro redox entre la plastocianina móvil y el citocromo *f* integrado en el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*, a su vez anclado en la membrana tilacoidal. Al pasar a ocupar nichos a menor temperatura, los organismos resultantes – denominados mesófilos– tuvieron que desarrollar mecanismos complementarios que facilitaran la atracción, pues la frecuencia de colisión por sí misma no era suficiente, y recurrieron a las interacciones electrostáticas. En este sentido, las interacciones electrostáticas tendrían una aparición evolutiva posterior a las hidrófobas y su finalidad sería facilitar la atracción y reconocimiento molecular entre las moléculas cuando se han colonizado nichos a temperaturas más bajas, es decir, cuando las moléculas se mueven a menor velocidad y la frecuencia de colisión es tan baja que no permite una transferencia de electrones eficiente para mantener la vida celular. Como decíamos antes, las proteínas necesitan tiempo, tiempo para adaptarse y aprender a desarrollar su función en la célula, exactamente igual que nosotros en la vida diaria al comenzar una actividad de la que no tenemos conocimiento.

Finalizamos, pues, esta parte de la presentación con la hipótesis evolutiva que desarrollamos a lo largo de varios años y culminamos en 2005 (De la Rosa, 2003; Hervás *et al.* 2003; Molina-Heredia *et al.* 2003; Díaz-Moreno 2005): Al principio, en un planeta con atmósfera reductora y hierro abundante, la primera proteína que utilizaron las cianobacterias para transferir electrones entre el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f* y el fotosistema I fue el citocromo *c<sub>6</sub>*. A medida que el oxígeno fotosintético fue acumulándose en la atmósfera y el cobre fue haciéndose accesible, al tiempo que las disponibilidades de hierro soluble fueron disminuyendo, el citocromo *c<sub>6</sub>* fue dando paso a la aparición creciente de plastocianina. Y en la atmósfera oxidante actual, con cobre en abundancia y hierro limitado, la plastocianina ha llegado a ser el único transportador de electrones entre el complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f* y el fotosistema I en plantas. De hecho, el

citocromo  $c_6$  en plantas ha desaparecido tras evolucionar hacia un nuevo tipo de citocromo, denominado  $c_p$  (o también " $c_6$ -like", en inglés), de función aún desconocida. Por otra parte, y al margen de la transición desde el citocromo  $c_6$  a la plastocianina, cada una de estas proteínas habría ido evolucionando a lo largo de muchos millones de años a fin de optimizar su propia eficiencia cinética. Las interacciones seguirían al principio el modelo colisional de tipo I, pasarían después a desarrollar una mayor eficiencia cinética con el mecanismo de tipo II y finalmente alcanzarían la máxima eficiencia con el mecanismo de tipo III (Fig. 7).



*Figura 7. Las primeras cianobacterias utilizaron citocromo  $c_6$  como transportador redox fotosintético, cuando el hierro era más abundante que el cobre en el planeta. En el curso de la evolución, la plastocianina fue sustituyendo al citocromo  $c_6$  a medida que el cobre fue haciéndose más disponible que el hierro. Las plantas actuales sintetizan plastocianina pero no citocromo  $c_6$ , que ha evolucionado hasta dar lugar a un nuevo citocromo, el citocromo  $c_p$ , cuya función aún no se conoce.*

En conclusión, el citocromo  $c_6$  y la plastocianina constituyen un ejemplo excelente de evolución convergente a nivel molecular impulsada por las limitaciones en las biodisponibilidades relativas de los elementos químicos constituyentes, lo que demuestra que la vida ha ido evolucionando en sintonía con la química cambiante del planeta y, por tanto, que la evolución biológica está gobernada por la geoquímica.

## **V. Citocromo c: una proteína clave para la vida y muerte celular**

Al hablar de los metales y, en concreto, del hierro, hemos visto que existen distintos tipos de proteínas hemínicas, como los citocromos de tipo *c*, de los que a su vez existe una enorme diversidad. Así, el citocromo *c* respiratorio posee una estructura parecida al citocromo *c*<sub>6</sub> fotosintético, que acabamos de describir. Ambos son proteínas globulares, de pequeño tamaño, de unos cien residuos aminoacídicos y un solo grupo hemo. En ambos, los dos ligandos axiales del átomo de hierro, dispuestos perpendicularmente al plano del hemo, son una histidina y una metionina de la cadena polipeptídica. Asimismo interesante es su analogía funcional, como se detalla a continuación.

El citocromo *c* es una proteína bien conocida desde hace décadas. Se encuentra en la mitocondria, orgánulo responsable de la respiración celular, y lleva a cabo una función esencial en la cadena de transporte de electrones. En los últimos años, sin embargo, ha conseguido despertar de nuevo enorme interés debido al descubrimiento de su papel clave en los inicios de la muerte celular programada. Se denomina así al proceso de "suicidio" en el que entran las células tras recibir un estímulo específico, ya sea externo o interno, a fin de poner sus componentes celulares a disposición de las células vecinas. El citocromo *c*, por tanto, es una proteína bifuncional pues lleva a cabo dos funciones distintas. En condiciones homeostáticas, o de funcionamiento normal de la célula, transporta electrones en la mitocondria. Y en condiciones apoptóticas, o de muerte celular programada, interviene en el desmantelamiento organizado de las estructuras celulares (Díaz-Moreno *et al.* 2011; González-Arzola *et al.* 2015a).

En respiración, el citocromo *c* transfiere electrones entre dos de los complejos proteicos anclados en la membrana mitocondrial, desde el

complejo de citocromos  $bc_1$  (o complejo III) a la citocromo  $c$  oxidasa (o complejo IV). Su función es equivalente, por tanto, a la del citocromo  $c_6$  en fotosíntesis, es decir, actúa como proteína móvil transportadora de electrones entre dos complejos de membrana. De hecho, el complejo de citocromos  $b_6f$  fotosintético y el de citocromos  $bc_1$  respiratorio funcionan de manera similar y presentan una gran semejanza estructural, como corresponde a su origen evolutivo común (Fig. 8).

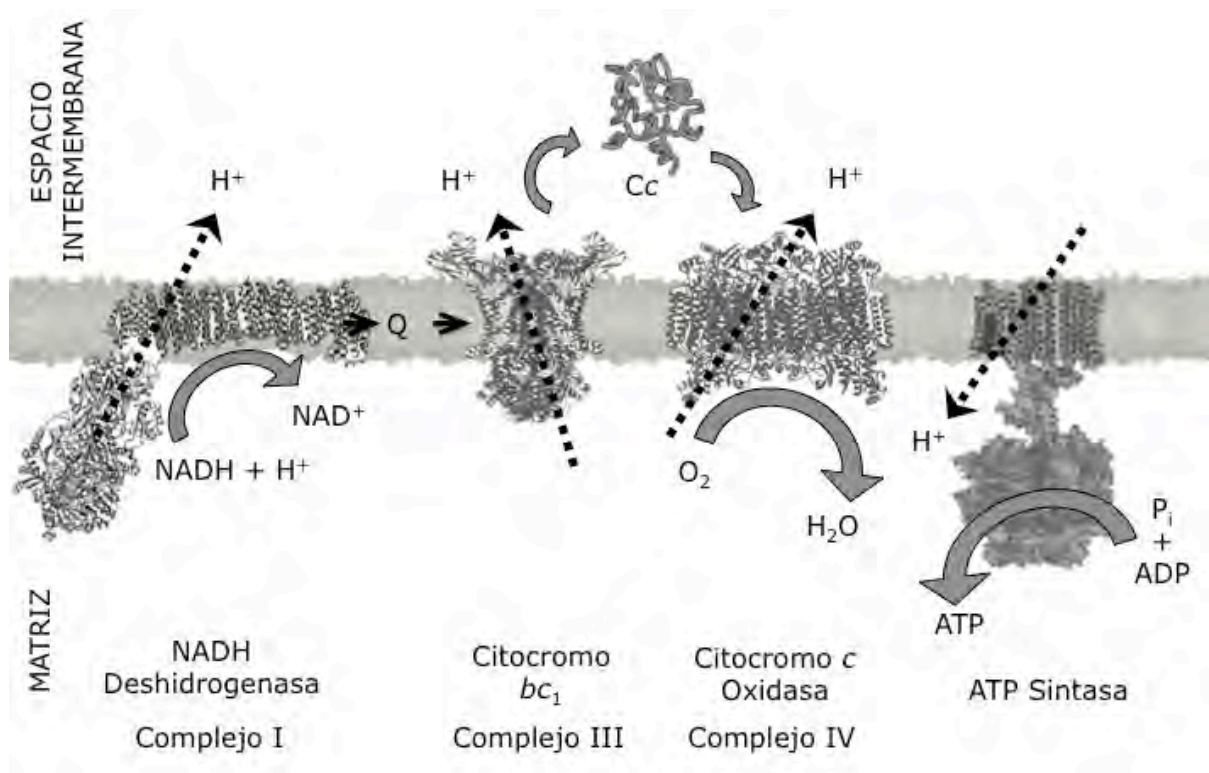


Figura 8. Al igual que la cadena redox fotosintética, la cadena de transporte de electrones respiratoria está constituida por complejos proteicos anclados en membrana. En este caso, los electrones fluyen a favor de gradiente, con liberación de energía, desde el nivel del electrodo de hidrógeno hasta reducir el oxígeno a agua. Para más detalles, véase el texto.

En mamíferos, cuando la célula entra en apoptosis, el citocromo  $c$  sale de la mitocondria y se une en el citoplasma al factor inductor de proteasas apoptóticas, de manera abreviada conocido como Apaf-1 (del inglés, "Apoptosis protease-activating factor-1"). Apaf-1 se encuentra normalmente en estado plegado pero se abre cuando el citocromo  $c$  interacciona con él –en concreto con el dominio WD40, sitio de

reconocimiento del citocromo *c* en Apaf-1-. En su conformación abierta, siete unidades de Apaf-1, cada una con una molécula de citocromo *c* asociada, se unen para formar una superestructura denominada apoptosoma. Este, finalmente, promueve la activación de la ruta de caspasas (del inglés, "*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*"), que son enzimas proteolíticas para la degradación de los componentes celulares.

En base a nuestra experiencia en citocromos, decidimos abordar el estudio de las bases estructurales que pudieran explicar la diversidad funcional del citocromo *c*, tanto en respiración como en muerte celular programada.

## **VI. Citocromo *c* en respiración**

En los últimos años se ha abierto un fuerte debate sobre el mecanismo y modo de acción del citocromo *c* en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, habiendo surgido dos hipótesis contrapuestas.

Según el modelo de "mosaico fluido", asumido sin discusión hasta hace poco, los cuatro complejos de la cadena (complejos I, II, III y IV) se disponen en la membrana mitocondrial de forma aislada e independiente. La conexión entre ellos se realiza de manera secuencial y ordenada mediante transportadores móviles y en el caso concreto de los complejos III y IV, por el citocromo *c*. Ello implica que el citocromo *c* oxidado interacciona con el complejo III, toma un electrón, se reduce, se desplaza en busca del complejo IV, interacciona con este, le cede el electrón antes recibido y se disocia del complejo IV una vez oxidado para volver al complejo III y empezar un nuevo ciclo. De manera análoga, por tanto, a como realiza su tarea el citocromo *c*<sub>6</sub> fotosintético. El modelo de "mosaico sólido", mucho más reciente, asume que los

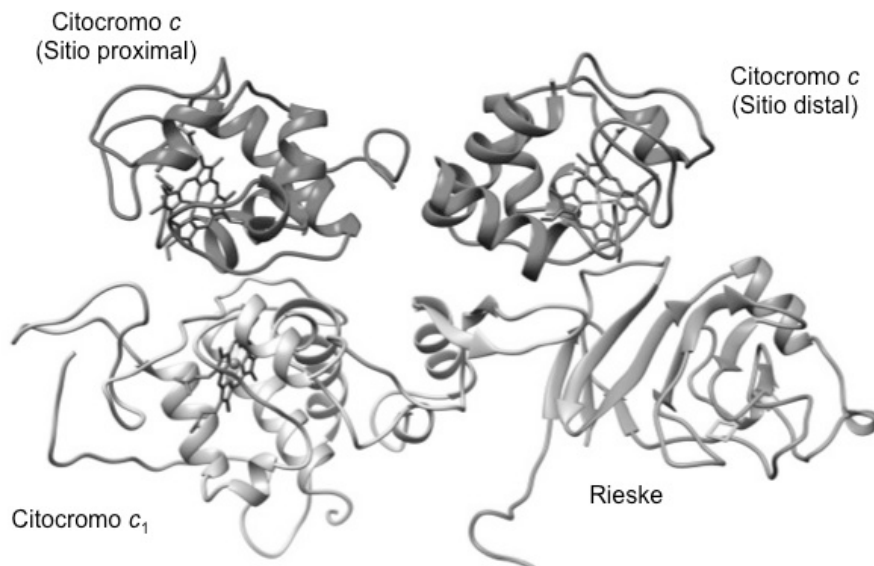
complejos no se encuentran aislados individualmente sino asociados en estructuras de orden superior denominadas supercomplejos. De hecho, se ha demostrado que los complejos I, III y IV pueden asociarse formando lo que se ha dado en llamar "respirasoma", típico supercomplejo del modelo sólido. Al parecer, ambos modelos pueden coexistir en la mitocondria.

Una pregunta que inmediatamente se plantea en el modelo de mosaico sólido es cómo se produce el transporte de electrones entre los complejos III y IV mediado por citocromo *c*. A fin de abordar esta cuestión en nuestro laboratorio, centramos la atención sobre la interacción del citocromo *c* con el citocromo  $c_1$ , que es la subunidad integrante del complejo III que actúa como donador inmediato de electrones al citocromo *c*. Además, la estructura cristalográfica del complejo III con el citocromo *c* en levaduras estaba resuelta desde hacía años.

Procedimos a trabajar con el dominio globular del citocromo  $c_1$ , al que se le había truncado la hélice alfa hidrófoba que lo mantiene anclado al complejo III, y analizamos su interacción con el citocromo *c*. A diferencia de lo que se había observado en la estructura cristalográfica, nuestro análisis inicial reveló, no sin cierta sorpresa, que el citocromo  $c_1$  posee dos sitios de unión de citocromo *c* y puede, por tanto, alojar simultáneamente dos moléculas de citocromo *c*. A uno lo denominamos "sitio proximal" y al otro, "sitio distal". El sitio proximal, como el nombre indica, permite un mayor acercamiento del grupo hemo del citocromo *c* al grupo hemo del citocromo  $c_1$ , mientras que el citocromo *c* alojado en el sitio distal se encuentra a mayor distancia del grupo hemo del citocromo  $c_1$ . La molécula de citocromo *c* en el sitio proximal podría recibir directamente electrones del citocromo  $c_1$ , en tanto que la molécula en el sitio distal estaría en situación de espera para poder pasar al sitio proximal y recibir electrones.



La simulación computacional de la interacción del citocromo *c* con el citocromo *c*<sub>1</sub> en presencia de la proteína de Rieske, que es el componente del complejo *bc*<sub>1</sub> más próximo a los sitios de unión de citocromo *c*, reveló que las dos moléculas del citocromo *c* se pueden alojar simultáneamente en los sitios proximal y distal, sin que haya ningún impedimento estérico. Asimismo, se pudo comprobar que la única molécula de citocromo *c* asociada al complejo *bc*<sub>1</sub> de levaduras en la estructura cristalográfica descrita en la literatura solapa plenamente con la molécula de citocromo *c* alojada en el sitio proximal de nuestro modelo, quedando sin ocupar el sitio distal en la estructura cristalográfica (Fig. 9).



**Figura 9.** El citocromo *c*<sub>1</sub>, componente del complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, puede asociar dos moléculas de citocromo *c* sin que haya impedimento estérico entre ellas ni con la proteína de Rieske, otra subunidad del complejo III. Para más detalles, véase el texto.

El complejo de citocromos *bc*<sub>1</sub>, o complejo III, suele encontrarse en forma dimérica, asociado a los complejos I y IV en el respirasoma. Nuestros datos sugieren, por tanto, que cada unidad integral del respirasoma podría albergar al mismo tiempo hasta cuatro moléculas de citocromo *c* unidas al complejo III, a su vez estrechamente asociado al complejo IV. De este modo la conexión redox entre los complejos III y IV tendría lugar por canalización de electrones a través de las moléculas de citocromo *c*

unidas de forma estable y no por el transporte de electrones convencional mediado por moléculas móviles de citocromo *c*. Vendría a ser como una especie de puente de barcas flotante que facilitaría la conexión entre los complejos III y IV, lo que haría mucho más fácil y rápida la transferencia de electrones y, por consiguiente, aumentaría la eficiencia de la cadena de transporte respiratorio (Moreno-Beltrán *et al.* 2014). Además, se reduciría el desarrollo de enfermedades relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno.

## **VII. Citocromo *c* en la muerte celular programada**

La otra función que hemos comentado para el citocromo *c* concierne a su intervención en la muerte celular programada, que, como el nombre indica, es un mecanismo de degradación controlada que tiene lugar al final de la vida celular, cuando los componentes integrantes de las células pasan a disposición de las células vecinas. La muerte programada es crucial para el gobierno de la proliferación celular y, por ende, de la regulación de procesos biológicos como la diferenciación y el desarrollo en organismos multicelulares. Su falta de control, por consiguiente, es causa de innumerables enfermedades, como el cáncer o el envejecimiento.

Existen dos rutas de muerte celular programada, una extrínseca y otra intrínseca, según la naturaleza del factor inductor. Los estímulos externos pueden ser radiaciones ultravioletas o moléculas exógenas que interaccionan con receptores específicos transmembrana en la superficie de la célula. De esta forma se inicia la cascada de señalización en el interior celular, disparando la ruta de las caspasas degradativas. Alternativamente, ciertos procesos internos, como el estrés oxidativo, pueden desencadenar la ruta intrínseca, que asimismo acaba disparando la activación de las caspasas.

El estrés oxidativo, en concreto, resultante de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (ROS, del inglés "*Reactive Oxygen Species*") o el estrés a nivel de retículo endoplásmico provocan la salida del citocromo *c* mitocondrial. Este, como decíamos antes, interacciona en el citoplasma con el factor inductor de apoptosis Apaf-1, formando el apoptosoma y activando la ruta de degradación de caspasas.

El papel del citocromo *c* en muerte celular programada es objeto de amplio debate desde hace ya algunos años, pues parece que existen otras muchas interacciones entre distintos orgánulos de la célula y todo un mecanismo orquestado para provocar la muerte. Por ejemplo, el citocromo *c*, tras ser liberado de la mitocondria, interfiere con los receptores del inositol trifosfato en la membrana del retículo endoplásmico, lo que promueve una salida masiva de calcio al citoplasma, que a su vez estimula la salida del citocromo *c* de la mitocondria al citoplasma en un proceso que se retroalimenta y amplifica. En todo caso, la liberación masiva del citocromo *c* permite la unión de este a Apaf-1 y la formación del apoptosoma.

Un aspecto intrigante desde hace décadas es que la concentración de citocromo *c* en el interior de la mitocondria es bastante mayor que la que se requiere para su funcionamiento redox, en condiciones homeostáticas, en la cadena respiratoria. De hecho, la concentración de citocromo *c* en el espacio intermembrana puede llegar hasta 5 milimolar, esto es, del orden de diez veces superior a la concentración que se considera necesaria y suficiente para el transporte de electrones.

Existen otras cuestiones enigmáticas al comparar la función del citocromo *c* extramitocondrial en diversos animales. En mamíferos está muy bien establecido y definido el reconocimiento del citocromo *c* por Apaf-1 que acabamos de describir, pero no así en otros organismos, como el gusano

*Caenorhabditis elegans* o la mosca *Drosophila melanogaster*. En ambos se produce la salida del citocromo *c* mitocondrial, pero no parece que este sea necesario para la formación del apoptosoma. En el caso de *C. elegans*, por ejemplo, la proteína equivalente a Apaf-1, denominada CED-4, no presenta dominios WD40 de unión a citocromo *c*. Y en *Drosophila*, la proteína homóloga a Apaf-1, denominada Dark, sí contiene dominios WD40 pero la formación del apoptosoma es independiente de citocromo *c*.

En plantas, el papel del citocromo *c* en muerte celular programada es aún más desconocido. Las células vegetales responden a infinidad de estímulos que provocan la muerte de manera programada, sobre todo hormonas como el etileno, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, el ácido giberélico, etc. Cuando la célula pierde el control de respuesta a estos agentes tiene lugar una producción excesiva de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y, al igual que ocurre en células animales, el estrés oxidativo resultante provoca la salida del citocromo *c* mitocondrial. Sin embargo, nuevamente aquí nos encontramos con que se desconoce el "interlocutor" del citocromo *c* liberado al citoplasma; en plantas, de hecho, no se ha encontrado caspasas propiamente dichas ni estructuras análogas a Apaf-1 o al apoptosoma.

En el grupo de investigación nos planteamos, por consiguiente, toda una serie de interrogantes. ¿Es la liberación del citocromo *c* en muerte celular programada una coincidencia evolutiva o hay piezas que aún faltan en el puzle interactómico del citocromo *c*? ¿Por qué las células eucarióticas acumulan cantidades tan elevadas de citocromo *c* en la mitocondria? ¿Tal exceso de citocromo *c* es inútil o tiene una función aún desconocida? ¿La función del citocromo *c* extramitocondrial es solo interactuar con Apaf-1 en el citoplasma para formar el apoptosoma o el citocromo *c* juega un papel más amplio y diverso como desencadenante de la muerte celular programada? ¿Y por qué la presencia del citocromo *c* en el núcleo?

### **VIII. Búsqueda de nuevas dianas del citocromo c**

La hipótesis de trabajo inicial fue que el citocromo c es un elemento metabólico determinante del tránsito de la vida a la muerte de las células y, por tanto, que el citocromo c extramitocondrial debe interactuar con otras proteínas en el citoplasma y/o en el núcleo aún desconocidas (Martínez-Fábregas *et al.* 2013, 2014a).

El proyecto se abordó desde un punto de vista evolutivo, comparando células humanas y vegetales y combinando los análisis proteómicos con las técnicas de cromatografía de afinidad. De este modo, se identificaron hasta un total de veinticuatro proteínas humanas y nueve de la planta *Arabidopsis* como potenciales nuevas dianas del citocromo c. La significación biológica real de la mayor parte de las nuevas interacciones se pudo verificar en el interior de las células por complementación bimolecular de fluorescencia (conocida como BiFC, del inglés "*Bimolecular Fluorescent Complementation*"). De hecho, harto interesante fue observar la localización específica de cada interacción, pues tanto en las células humanas como en las células de la planta, la mayoría de las nuevas dianas interactuaron con el citocromo c en el citoplasma, otras lo hicieron en el núcleo, y algunas formaron complejos nucleocitoplásmicos con el citocromo c.

En la Tabla I se relacionan los dos grupos de proteínas, humanas y vegetales, cuya interacción con el citocromo c se pudo demostrar experimentalmente mediante técnicas biofísicas diversas, como la resonancia magnética nuclear, la calorimetría de titulación isotérmica, la resonancia de plasmones de superficie e incluso la modelización computacional.

Tabla I. *Proteínas que conforman la red de interacciones del citocromo c extra-mitocondrial en condiciones de muerte celular programada.*

<i>Proteínas diana en células humanas</i>		
<i>Acrónimo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Localización</i>
ALDOA	Aldolasa A	Citoplasma
ANP32B	Fosfoproteína nuclear ácida 32B	Nucleocitoplasma
eIF2-alfa	Factor de iniciación de la traducción 2-alfa eucariótico	Citoplasma
hnRNP C1/C2	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear C1/C2	Núcleo
HSPA5	Proteína 5 de choque térmico de 70 kDa	Citoplasma
MCM6	Complejo de mantenimiento del minicromosoma 6	Citoplasma
NCL	Nucleolina	Nucleocitoplasma
SET	Proteína oncogénica nuclear SET	Núcleo
STRAP	Proteína asociada al receptor de la quinasa de serina/treonina	Nucleocitoplasma
YWHAE	14-3-3 epsilon	Citoplasma
<i>Proteínas diana en células de planta</i>		
<i>Acrónimo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Localización</i>
BiP1	Proteína 1 de unión luminal	Citoplasma
BiP2	Proteína 2 de unión luminal	Citoplasma
eIF2-gamma	Factor de iniciación de la traducción 2-gamma	Citoplasma
GAPC1	Deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato C, subunidad 1	Citoplasma
GLY2	Hidrolasa del hidroxiacilglutión	Citoplasma
NRP1	Proteína 1 relacionada con la proteína 1 del ensamblaje del nucleosoma NAP1	Núcleo
RD21	Proteínasa de cisteína RD21	Citoplasma
Sm/D1	Ribonucleoproteína nuclear pequeña D1	Núcleo
TCL (o AtALY1)	Factor homólogo al coactivador de la transcripción (o AtALY1)	Núcleo

Teniendo en cuenta las funciones descritas en la literatura para las nuevas proteínas que interactúan con el citocromo c, pudimos forjar toda una serie de interacciones del citocromo c con sus dianas proteicas y también de estas con sus dianas respectivas. Es decir, definimos toda una red de señales centrada en el citocromo c, con proteínas que interactúan

directamente con el citocromo c y de estas, a su vez, con otras proteínas de la célula (Fig. 10). Al agrupar las nuevas dianas atendiendo a sus funciones principales pudimos observar que la mayoría participa en procesos idénticos en células humanas y vegetales, como son la traducción de señales, la regulación transcripcional, el metabolismo energético, la regulación de la traducción o el metabolismo del ARN mensajero. Otras, las menos, intervienen en procesos específicos de cada organismo, como son el estrés oxidativo y la degradación dependiente de cisteín-proteinasas en células humanas o el ensamblaje del citoesqueleto y la homeostasis del calcio en células de plantas.

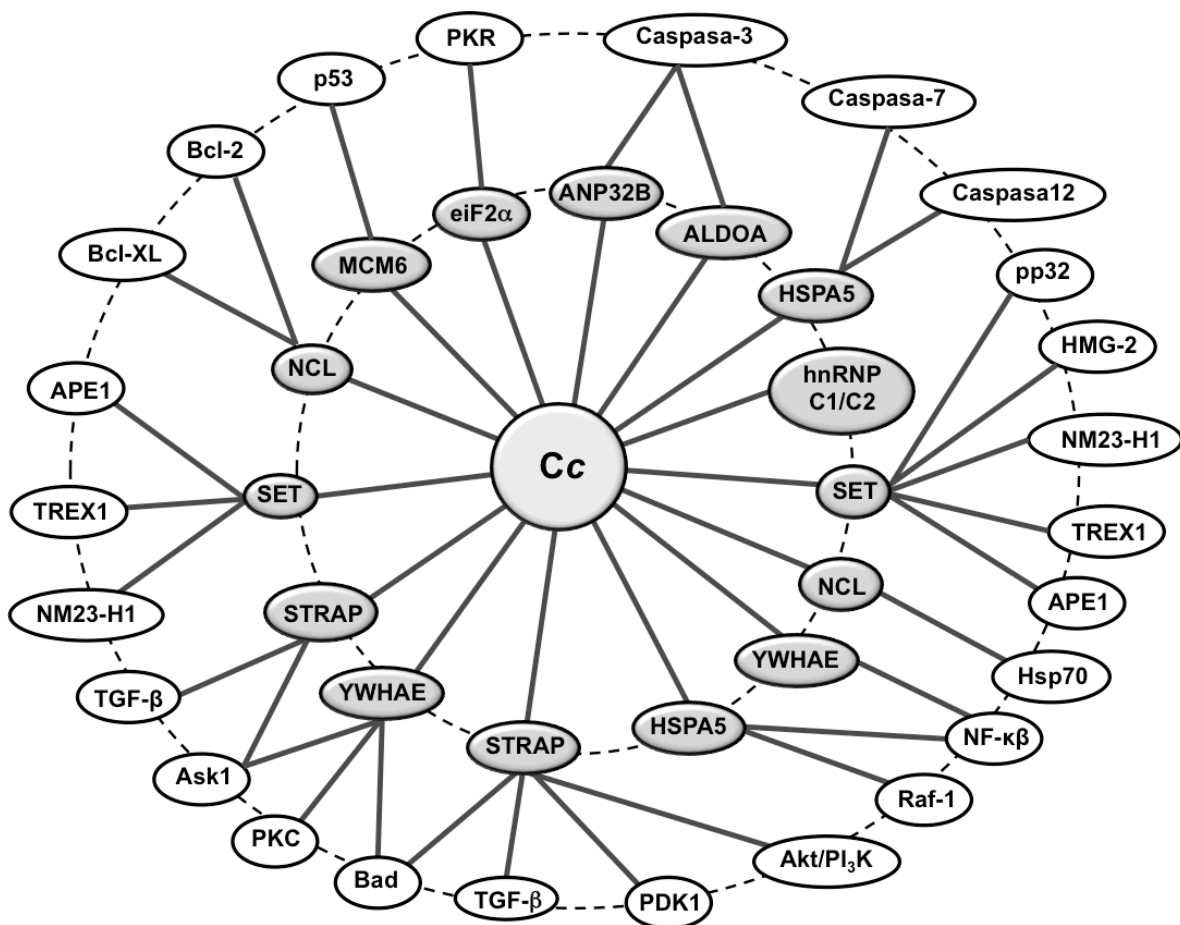


Figura 10. El citocromo c humano interactúa con una amplia red de proteínas, tanto en el citoplasma como en el núcleo, cuando las células se programan para morir de forma ordenada. De manera similar sucede en las células de planta. Para más detalles, véase el texto.

A raíz de los resultados obtenidos, se hizo un análisis funcional comparado de las nuevas dianas a fin de conseguir su integración en una red de señalización común en células humanas y vegetales. Aparte los procesos específicos ya indicados en células de uno u otro tipo, pudimos observar que buena parte de las dianas son análogas funcionales, es decir, hay una serie de proteínas diana que cumplen exactamente la misma función en células humanas y en células de plantas. En concreto, identificamos el factor eIF2-alfa en células humanas y el eIF2-gamma en células de planta, que son análogos funcionales en el proceso de síntesis de proteínas; las proteínas HSPA5 humana y BiP1/2 vegetales, responsables del plegamiento de proteínas; la ALDOA humana y la GAPC1 vegetal, enzimas del metabolismo del glicerol 3-fosfato; y, por último, las chaperonas de histonas SET humana y NRP1 de plantas, ambas localizadas en el núcleo.

Todo esto indica que hay una analogía funcional entre las células vegetales y animales y, por tanto, un paralelismo y origen evolutivo común de los mecanismos, hasta ahora desconocidos, que conducen a la muerte celular programada inducida por citocromo c en plantas y humanos.

## **IX. Dianas del citocromo c análogas en plantas y humanos**

Al observar la sorprendente analogía funcional de dianas en células humanas y vegetales centramos la atención sobre dos de ellas y, en concreto, sobre SET y NRP1, que son las primeras proteínas de localización nuclear de las que se describe su interacción con el citocromo c. SET es una proteína multifuncional de células humanas, cuyas actividades principales se relacionan con el ensamblaje del nucleosoma y con la inhibición de fosfatasas y agentes supresores de tumores. NRP1 es



una proteína típica de células vegetales, homóloga de SET, que asimismo participa en el ensamblaje del nucleosoma y presenta actividad inhibidora de fosfatasa.

Puesto que el citocromo *c* de células humanas y vegetales posee una enorme homología estructural, utilizamos diversas técnicas biofísicas a fin de encontrar las bases estructurales que pudieran explicar la analogía funcional de SET y NRP1. La resonancia magnética nuclear, en particular, permitió identificar los residuos de superficie del citocromo *c* situados en la zona de interacción con SET y NRP1. Observamos que los aminoácidos de contacto configuran un área bien delimitada, con el grupo hemo en el centro, tanto en el citocromo *c* humano al interactuar con SET como en el citocromo *c* de plantas al interactuar con NRP1. El grupo hemo, como hemos visto anteriormente, se encuentra inserto en la matriz proteica del citocromo como si fuera una moneda en una ranura, exponiendo ligeramente a la superficie el anillo C del núcleo tetrapirrólico. Interesante fue observar no solo la similitud entre las zonas de contacto de los citocromos *c* humano y vegetal, sino también y, sobre todo, que dichas zonas de interacción con SET y NRP1 coinciden exactamente con el área de carácter hidrófobo que contacta con el citocromo  $c_1$  en el complejo III mitocondrial para la transferencia de electrones.

El análisis computacional de la interacción del citocromo *c* humano con SET, cuya estructura cristalográfica está resuelta y disponible en el Banco de Datos de Proteínas, reveló que la forma dimerica SET, que es la fisiológica, dispone de dos sitios para la unión del citocromo *c*. El sitio más poblado se encuentra en el centro geométrico del dímero de SET, entre los dos dominios globulares, mientras que la otra población de moléculas de citocromo *c* se sitúa en un extremo del dímero. Además, el sitio más poblado coincide exactamente con el sitio de unión de histonas descrito en la estructura del complejo de interacción de SET con histonas;

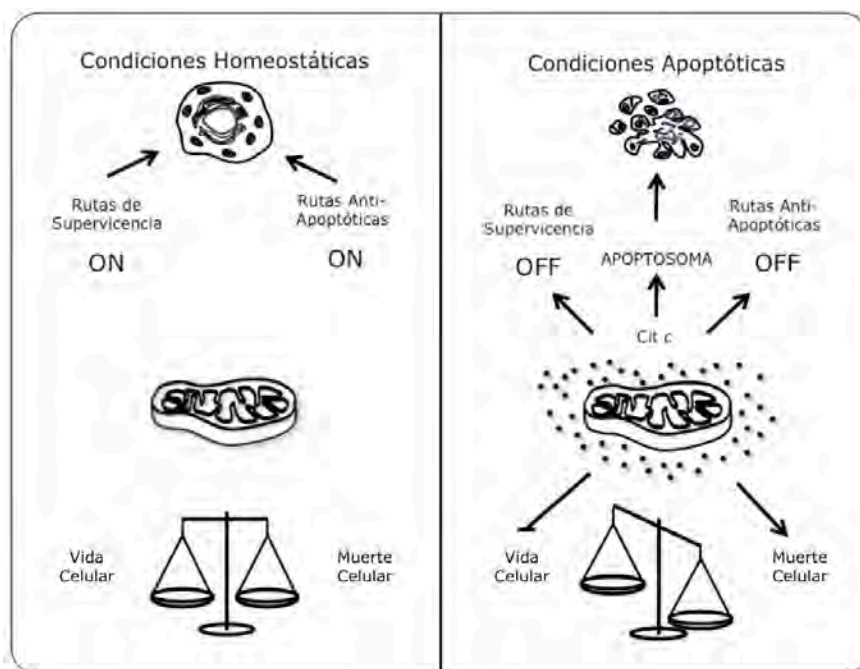
de hecho, una de las más funciones más conocidas de SET es la actividad chaperona de histonas, clave para el ensamblaje del nucleosoma.

En un trabajo reciente hemos podido demostrar que, efectivamente, el citocromo *c* viaja desde la mitocondria hasta el núcleo en células humanas tratadas con diversas drogas que generan roturas en la doble cadena del ADN. Una vez en el núcleo celular, el citocromo *c* es capaz de interaccionar con SET e inhibir su capacidad para ensamblar nucleosomas mediante el bloqueo de los dominios de SET que participan en la unión a las histonas (González-Arzola *et al.* 2015b). Los resultados descritos en este artículo revelan las bases moleculares del bloqueo de la oncoproteína SET por el citocromo *c* en respuesta al daño al ADN, abriendo así las puertas al diseño de nuevos fármacos para silenciar el efecto oncogénico de su actividad chaperona de histonas.

El análisis computacional se extendió al conjunto de proteínas de la red de señalización del citocromo *c* antes descrita con objeto de identificar la zona de interacción de la hemoproteína con sus dianas, ya sean de tipo redox en la mitocondria o no redox en el núcleo y citoplasma. Con todas las proteínas diana observamos que el citocromo *c* utiliza siempre la misma zona de interacción: la ya descrita con el grupo hemo en el centro. Con los complejos de transporte de electrones III y IV en la mitocondria, con el factor de inducción de apoptosis Apaf-1 en el citoplasma, con todas las nuevas dianas en el núcleo o en el citoplasma, siempre, el citocromo *c* interacciona usando el mismo área. Estos resultados se pueden explicar en base al rol esencial que juega el momento dipolar, antes citado para el citocromo  $c_6$ , en la orientación de las moléculas durante el reconocimiento y ensamblaje.

El cálculo de constantes cinéticas y parámetros termodinámicos derivados de los estudios biofísicos reveló que la totalidad de las interacciones del

citocromo *c* con las nuevas dianas, ya sean nucleares y/o citoplásmicas, al igual que con Apaf-1, tienen vidas medias muy largas (superiores a centenas de microsegundos), en tanto que las interacciones del citocromo *c* en el interior de la mitocondria con el citocromo *bc*<sub>1</sub> (complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) presentan vidas medias mucho más cortas (inferiores a diez microsegundos), como corresponde a los complejos de transferencia de electrones. En otras palabras, las interacciones del citocromo *c* con otras proteínas son de carácter transitorio en condiciones homeostáticas, es decir, cuando se encuentra en la mitocondria y la célula está desarrollándose normalmente. Las interacciones, en cambio, son de carácter estable en condiciones apoptóticas, cuando el citocromo *c* sale al citoplasma e incluso llega hasta el núcleo a cumplir su misión de conducir la célula, de manera ordenada, a la muerte. El citocromo *c*, por tanto, en su doble faceta de Dr. Jekyll y Mr. Hyde, vendría a representar el tránsito del equilibrio dinámico de la vida a la estabilidad prolongada de la muerte (Fig. 11).



**Figura 11.** La muerte celular programada, tanto en células humanas como vegetales, conlleva la salida masiva del citocromo *c* de la mitocondria y el consiguiente desequilibrio metabólico.

El equilibrio dinámico del metabolismo celular en condiciones homeostáticas implica que las rutas de supervivencia y las rutas antiapoptóticas están perfectamente compensadas, con el citocromo *c* recluido en la mitocondria desarrollando su función redox. Al recibir algún estímulo apoptótico, ya sea externo o interno, la célula reacciona con la expulsión masiva del citocromo *c* hacia el citoplasma, donde interacciona con Apaf-1 (en mamíferos) para inducir la formación del apoptosoma y activar la ruta degradativa de las caspasas; además, el citocromo *c* interacciona con otras muchas proteínas, como las nuevas dianas descritas, tanto en el citoplasma como en el núcleo, y rompe el equilibrio entre las rutas de supervivencia y las rutas antiapoptóticas, con el consiguiente bloqueo del metabolismo celular y, por último, la muerte.

Para cerrar esta segunda y última parte del discurso podemos concluir que todas las células comparten una misma forma de morir y, en particular, que existe una red de señalización común, en células humanas y de plantas, centrada en el citocromo *c*, que de manera similar y programada conduce a la muerte. El citocromo *c* extramitocondrial juega, además, un doble papel en este tránsito final, no solo activando la cascada de caspasas, lo que está bien descrito y establecido en la literatura, sino también bloqueando las rutas de supervivencia, lo que constituye una hipótesis original y novedosa (Martínez-Fábregas *et al.* 2014b).

## **Epílogo**

En resumen, dos elementos de la química, el hierro y el cobre, han focalizado la mayor parte de mi quehacer en la ciencia, dos metales que son preciosos para la vida de las células y, sin embargo, ampliamente denostados por la opinión pública de las sociedades más desarrolladas al

considerarlos agentes contaminantes. ¿Manifestación indubitada de la sempiterna dualidad dubitativa del hombre?

La relatividad de nuestra percepción del individuo y del medio ambiente, la subjetividad de nuestro propio ser integrado en el mundo que nos rodea quedan bellamente evocadas en un inteligente poema ancestral de los indios americanos, en el que sorprende la coincidente esencialidad vital de otros elementos, los cuatro elementos primordiales de los griegos: fuego, tierra, agua y aire. ¿Reflejo de una profunda preocupación existencial del hombre por la naturaleza, allá donde el hombre sea y esté?

El viejo poema indio canta así:

*Puedo perder mis manos, y vivo.  
Puedo perder mis piernas, y vivo.  
Puedo perder mis ojos,  
el pelo, las cejas, la nariz, los brazos  
y muchas otras cosas, y todavía estoy vivo.  
Pero si pierdo el aire, muero.  
Si pierdo el sol, la tierra o el agua, muero.  
Si pierdo las plantas y los animales, también muero.  
Todas estas cosas son más parte de mí,  
más esenciales e imprescindibles cada vez que respiro,  
que es lo que dicen que es mi cuerpo.  
¿Cuál es mi cuerpo real?*

Muchas gracias.

## **Bibliografía (por orden cronológico)**

*Laser flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome  $c_6$  to photosystem I. Experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism*

M Hervás, JA Navarro, A Díaz, H Bottin y MA De la Rosa  
*Biochemistry* (1995) 34, 11321-11326

*Ab initio determination of the crystal structure of cytochrome  $c_6$  from the green alga *Monoraphidium braunii* and comparison with plastocyanin*

C Frazao, CM Soares, MA Carrondo, E Pohl, Z Dauter, KS Wilson, M Hervás, JA Navarro, MA De la Rosa y GM Sheldrick  
*Structure* (1995) 3, 1159-1169

*Co-evolution of cytochrome  $c_6$  and plastocyanin, mobile proteins transferring electrons from cytochrome  $c_6$  complex to photosystem I*

JA Navarro, M Hervás y MA De la Rosa  
*Journal of Biological Inorganic Chemistry* (1997) 2, 11-22

*Los elementos y moléculas de la vida*

M Losada, MA Vargas, MA De la Rosa y FJ Florencio  
Editorial RUEDA, Madrid, 1998 (vol. 1) y 1999 (vol. 2)

*From cytochrome  $c_6$  to plastocyanin. An evolutionary approach*

MA De la Rosa, M Hervás, A Díaz-Quintana, B De la Cerda, FP Molina-Heredia, A Balme, C Cavazza y JA Navarro  
En: *Photosynthesis. Mechanisms and Effects* (G Garab, ed), Vol III, pp 1499-1504, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 1999

*An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome  $c_6$  and plastocyanin*

MA De la Rosa, JA Navarro, A Díaz-Quintana, B De la Cerda, FP Molina-Heredia, A Balme, PS Murdoch, I Díaz-Moreno, RV Durán y M Hervás  
*Bioelectrochemistry* (2002) 55, 41-45

*A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome  $c_6$  as alternative electron donors to Photosystem I*

A Díaz-Quintana, JA Navarro, M Hervás, F Molina-Heredia, B De la Cerda y MA De la Rosa  
*Photosynthesis Research* (2003) 75, 97-110

*Photosynthesis: A new function for an old cytochrome?*

FP Molina-Heredia, J Wastl, JA Navarro, DS Bendall, M Hervás, C Howe y MA De la Rosa  
*Nature* (2003) 424, 33-34

*Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis*

M Hervás, JA Navarro y MA De la Rosa  
*Accounts of Chemical Research* (2003) 36, 798-805

*De la estructura a la función*

MA De la Rosa  
En: *Estructura y Función de Proteínas* (J Sancho y C Gómez-Moreno, eds), pp. 435-461, Ariel, Madrid, ES, 2003

*Different modes of interaction in cyanobacterial complexes of plastocyanin and cytochrome f*

I Díaz-Moreno, A Díaz-Quintana, MA De la Rosa, PB Crowley y M Ubbink  
*Biochemistry* (2005) 44, 3176-3183

*The convergent evolution of cytochrome  $c_6$  and plastocyanin has been driven by geochemical changes*

MA De la Rosa, JA Navarro y M Hervás  
En: *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria – From Evolutionary Singularity to Ecological Diversity* (G Peschek, C Obinger y G Renger, eds), pp. 607-630, Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, NL, 2011

*Cytochrome c signalosome in mitochondria*

I Díaz-Moreno, JM García-Heredia, AJ Díaz-Quintana y MA De la Rosa  
*European Biophysics Journal* 40 (2011) 1301-1315

*New Arabidopsis thaliana cytochrome c partners: A look into the elusive role of cytochrome c in programmed cell death in plants*

J Martínez-Fábregas, I Díaz-Moreno, K González-Arzola, S Janocha, JA Navarro, M Hervás, R Bernhardt, A Díaz-Quintana y MA De la Rosa  
*Molecular and Cellular Proteomics* 12 (2013) 3666-3676

*Structural and functional analysis of novel protein targets of human cytochrome c in apoptosis*

J Martínez-Fábregas, I Díaz-Moreno, K González-Arzola, S Janocha, JA Navarro, M Hervás, R Bernhardt, A Velázquez-Campoy, A Díaz-Quintana y MA De la Rosa  
*Molecular and Cellular Proteomics* 13 (2014a) 1439–1456

*A common signalosome for programmed cell death in humans and plants*

J Martínez-Fábregas, I Díaz-Moreno, K González-Arzola, A Díaz-Quintana y MA De la Rosa  
*Cell Death & Disease* (Nature Publishing Group) (2014b) 5, e1314

*Cytochrome c<sub>1</sub> exhibits two binding sites for cytochrome c in plants*  
B Moreno-Beltrán, A Díaz-Quintana, K González-Arzola, A Velázquez-Campoy, MA De la Rosa y I Díaz-Moreno  
*BBA – Bioenergetics* 1837 (2014) 1717–1729

*Cytochrome c-based signalosome*  
K González-Arzola, B Moreno-Beltrán, J Martínez-Fábregas, I Díaz-Moreno y MA De la Rosa  
En: *Redox Proteins in Supercomplexes and Signalosomes* (R Louro e I Díaz-Moreno, eds) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2015a

*Structural basis for inhibition of the histone chaperone activity of SET/TAF-I $\beta$  by cytochrome c*  
K González-Arzola, I Díaz-Moreno, A Cano-González, A Díaz-Quintana, A Velázquez-Campoy, B Moreno-Beltrán, A López-Rivas y MA De la Rosa  
*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2015b) 112, 9908-9913