

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**SINTESIS *IN VITRO* DE CDSE  
EN APO-FERRITINA MUTANTE DE *CHLOROBIUM TEPIDUM***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CHRISTIAN ANDRES BRITO SILVA

TEMUCO – CHILE  
2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**SINTESIS *IN VITRO* DE CDSE  
EN APO-FERRITINA MUTANTE DE *CHLOROBIUM TEPIDUM***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CHRISTIAN ANDRES BRITO SILVA

PROFESOR GUIA: ALEJANDRO YÉVENES

TEMUCO – CHILE  
2012

**SINTESIS *IN VITRO* DE CDSE  
EN APO-FERRITINA MUTANTE DE *CHLOROBIVM TEPIDUM***

PROFESOR GUIA

: ALEJANDRO YÉVENES

Bioquímico, Ph.D. en Bioquímica

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Andrés Bello

PROFESOR CONSEJERO

: RICARDO NICOLAS FELMER DÖNER

Bioquímico, Ph.D. en Biología Celular y  
Molecular

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales

Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

## DEDICATORIA

*Con amor a mi abuela Aida  
y a mis padres  
Ivonne y Roberto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mi abuela Aida por todo su amor, cariño y cuidados que ha tenido conmigo desde siempre. Por su apoyo incondicional en todas las cosas que he emprendido y por todos sus sacrificios. También a mi madre que aunque no siempre hemos estado juntos me ama mucho y siempre me ha estado apoyando en todas las cosas y dándome mucho cariño y afecto, gracias por confiar tanto en mí. También a mi padre y amigo por todos sus consejos y por qué siempre estás ahí cuando te necesito. Me has enseñado muchas cosas importantes y siempre te estaré agradecido por ello. Además, quiero agradecer a mis hermanos que también han estado apoyándome y preocupándose por mí todo este tiempo.

Agradecer también, a mi tutor Alejandro Yévenes por todo el tiempo, confianza y recursos invertido en mí. Por los conocimientos adquiridos, sobretodo la experiencia y también la paciencia que tuvo conmigo. También agradecer a mi cotutor Ricardo Felmer por revisar mi trabajo, al Dr. Danilo Gonzáles por recibirme en el centro de bioinformática de la universidad de Talca, al Dr. Leonardo Santos por facilitarme el equipamiento de su laboratorio para los análisis de fluorescencia y a todos los que me acompañaron durante mi estadía en Talca y que hicieron más fácil el proceso de vivir en otra ciudad.

También quiero agradecer a los amigos que hice en la universidad a Eduardo, Charlotte y Paula, por todo el tiempo que compartimos juntos los buenos y los malos. Por los trabajos realizados, por las horas y horas en la universidad y el gran apoyo brindado durante todo el tiempo en lo personal y académico.

## INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Ferritina	3
2.1.1	Almacenamiento de hierro	3
2.1.2	Tipos de ferritina	5
2.1.3	Biom mineralización	9
2.2	Puntos cuánticos	14
2.2.1	Propiedades ópticas	14
2.2.2	Aplicaciones de los puntos cuánticos	15
2.3	Ferritina como nanoreactor para puntos cuánticos	18
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1	Hipótesis	23
3.2	Objetivo general	23
3.3	Objetivos específicos	23
4	MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1	Materiales	24
4.2	Métodos	24
4.2.1	Clonación, expresión y purificación de proteínas	24
4.2.2	Síntesis de CdSe	25
5	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	26
5.1	Síntesis de CdSe	26
6	DISCUSIÓN	36
7	CONCLUSIONES	39
8	RESUMEN	40
9	SUMMARY	41
10	LITERATURA CITADA	42



# 1. INTRODUCCIÓN

Ferritina pertenece a una súperfamilia de proteínas cuya función es el almacenamiento de Hierro y se encuentra ampliamente distribuida en procariontes y eucariontes. Posee una estructura multimérica constituida por 24 subunidades que pueden ser iguales o diferentes dependiendo del organismo. En mamíferos ferritina esta formada por las subunidades H y L cuya proporción varía según el tipo de célula y al órgano que esta pertenezca. Ferritina ha sido utilizada como nano-reactor debido a su gran tamaño molecular 500KDa, a sus propiedades termo resistentes y a la cavidad que posee la cual puede ser usada para la síntesis y almacenamiento de nanopartículas. El mecanismo de entrada de Hierro a ferritina es un proceso complejo que involucra: la entrada de este por canales conocidos como de 3 y 4 pliegues, su oxidación en el sitio ferroxidasa (subunidad H); y su translocación al sitio de nucleación (subunidad L), donde es mineralizado y luego almacenado en la cavidad interna de la proteína. En procariontes existen dos tipos de ferritina las bacterioferritinas (Bfr), y las ferritinas de bacteria (Ftn), ambas compuestas por un solo tipo de monómero. Sus mecanismos de incorporación de hierro son diferentes a lo ocurrido en mamíferos debido a diferencias estructurales. Estas propiedades han sido aprovechadas para sintetizar una gran variedad de nanopartículas incluyendo los llamados puntos cuánticos (PCs). Los PCs son nanocristales semiconductores que se caracterizan por poseer una alta eficiencia cuántica y vida media prolongada. Tienen un gran interés por su potencial aplicación para imágenes en medicina, fabricación de chips y placas solares. Los PCs son potencialmente tóxicos debido a la presencia de Cd lo cual complica su uso como marcador in-vivo, además los métodos tradicionales de síntesis son costosos, complejos y generan PCs insolubles en medio acuoso. Es por esto que se ha sintetizado los PCs en ferritina, en particular se ha informado la síntesis de PCs de CdSe al interior de ferritina de bazo de caballo utilizando un sistema de reacción lenta, donde el Cd es estabilizado con EDTA. De esta manera es posible la síntesis de PCs de CdSe soluble y estable. No existen informes de síntesis de CdSe bajo ferritina de procariontes las cuales según lo mencionado poseen mecanismos de incorporación diferentes a los mostrados en mamíferos. Es por esto que en este trabajo se realizó la reacción de síntesis *in*

*vitro* de nanopartículas de CdSe en el interior de ferritina silvestre de *Chlorobium tepidum* y su mutante con ausencia del extremo carboxilo terminal desde el residuo 166 (Mutante Ct 166), además se realizó la reacción en ferritina humana L para comparar como afectan las diferencias estructurales entre estas ferritinas en la incorporación y síntesis de nanopartículas de CdSe.

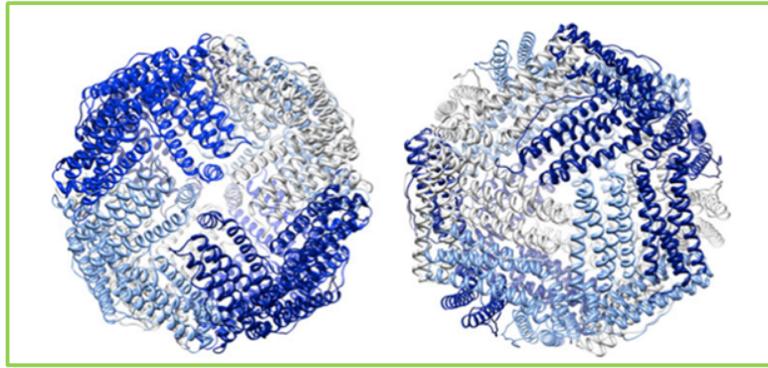
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ferritina

#### 2.1.1 Almacenamiento de hierro

Ferritina es una proteína globular perteneciente a la super familia de proteínas tipo ferritina las cuales tienen funciones diversas pero que comparten la presencia de un dominio de 4 alfa hélices y una quinta más corta en uno de sus extremos.

Para todas las proteínas su estructura tridimensional es esencial para su función. Normalmente las proteínas están construidas entorno a un sitio de unión a sustrato o a un canal de transporte, lo cual especifica el propósito de la proteína en particular, mientras el resto de las regiones de la proteína que rodean las zonas funcionales actúan generalmente como poco más que un andamio inerte para sostener los sitios reactivos. Sin embargo en ferritina su forma en tres dimensiones es muy importante y esencialmente define su función (Crichton y Declercq, 2010). Para explicar esto podemos decir que ferritina son conglomerados de subunidades idénticas o muy similares que actúan como bloques para el montaje de una gran proteína hueca que es más o menos de forma esférica. Este complejo proteico hueco está formado por 24 subunidades que ensamblan en una estructura esférica con un diámetro externo de 12-nm y una cavidad interna de 8-nm (Crichton y Declercq 2010). Sobre dicho complejo proteico se distribuyen distintos canales que atraviesan la estructura esférica y que de forma general son (Figura 1): 6 canales de ~0,4nm formados por residuos hidrofóbicos que se encuentran en la intersección de 4 subunidades conocidos como ejes de 4 pliegues (4-Fold chanel); 8 canales de ~0,4nm de diámetro caracterizados por la presencia de grupos carboxilos, estos canales son propuestos para el tráfico molecular desde el exterior al interior de ferritina y se forman en la intersección de 3 subunidades, la cual recibe el nombre de eje de 3 pliegues (3-Fold chanel) (Wardeska *et al.*, 1986; Theil *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Estructura de Ferritina. La imagen de la izquierda representa la estructura de un eje de 4 pliegues mostrando uno de los canales hidrofóbicos. La imagen de la derecha representa la estructura de un eje de 3 pliegues que muestra uno de los canales hidrofílicos. Fuente: Watt (2011).

Esta conformación sumado a otros factores que serán revisados mas adelante, son los responsables de la principal función de ferritina que es el almacenaje *in vivo* de hierro. Ferritina puede acomodar teóricamente más de 4.500 átomos de hierro mineralizados al interior de la cavidad. La cubierta de ferritina impide que otras moléculas biológicas en el citosol reaccionen con el hierro mineral (Arosio *et al.*, 2009). Para comprender la significancia de esto primero debemos entender que el hierro comúnmente se encuentra en estado de oxidación +2 o +3 los cuales pueden cambiar fácilmente entre si. Esta capacidad es clave en muchos procesos bioquímicos diferentes pero también significa que es potencialmente tóxico. Según esto podemos decir que el estado de oxidación +2 es termodinámicamente mas estable, pero de todas formas es fácilmente oxidable a  $Fe^{3+}$  por dioxígeno y otras especies reactivas de oxígeno, generando especies reducidas de oxígeno tales como superóxido, peróxido de hidrogeno y agua. El peróxido de hidrogeno que es un subproducto de la respiración aeróbica, fácilmente reacciona con  $Fe^{2+}$  en una reacción conocida como Fenton (Aisen *et al.*, 2001), para generar el extremadamente reactivo y, por tanto, tóxico, radical hidroxilo OH, el cual luego reacciona con todo tipo de macromoléculas biológicas perturbando su actividad o inactivándolas por completo. Además de esto, luego el  $Fe^{3+}$  puede ser reducido de vuelta a  $Fe^{2+}$  por varios reductantes que se pueden encontrar en el citoplasma incluyendo grupos de bajo peso molecular como tioles y superóxidos, resultando en un ciclo catalítico destructivo conocido como reacción Haber-Weiss. La facilidad

con que  $\text{Fe}^{2+}$  reacciona con dióxígeno para generar  $\text{Fe}^{3+}$  es la base de otro importante problema para la biología,  $\text{Fe}^{3+}$  es altamente insoluble y precipita bajo la forma cargada  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3$  (Aisen *et al.*, 2001), por lo tanto limitando la concentración de  $\text{Fe}(\text{OH}_2)_6^{3+}$  a pH 7 a valores aproximados de molaridad del orden de  $\sim 10^{-17}$ . Así, bajo condiciones aeróbicas y pH fisiológico, la biodisponibilidad del hierro es comúnmente pobre, de manera tal que se convierte en un nutriente limitante del crecimiento (Andrews *et al.*, 2003). Para hacer cara a las imposibilidades de la química del hierro los organismos vivos evolucionaron de manera tal de poder adquirir el hierro y mantenerlo en una forma no tóxica. Finalmente es aquí donde entra nuestra proteína Ferritina la cual según lo dicho anteriormente almacena el hierro dentro de su cavidad y en una forma solubilizada y estable como mineral férrico oxihidróxido (Chasteen 1998; Theil *et al.*, 2006).

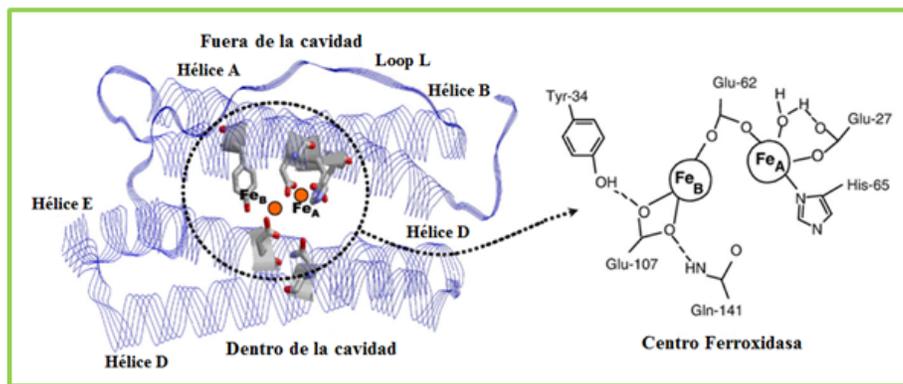
### 2.1.2 Tipos de Ferritina

Ferritina juega un papel fundamental para los organismos dependientes del fierro lo cual conlleva a su amplia distribución en todos los reinos de la vida (Crichton 2009). Dos cosas derivan de esta afirmación, primero: que la estructura esférica base de ferritina, la jaula proteica que otorga el microambiente aislado para el almacenamiento es conservado en todas las especies independiente de su baja similitud de secuencia; y segundo, que a pesar de lo conservada de la estructura tridimensional y su simetría, existen pequeñas diferencias estructurales entre las diferentes ferritinas dependiendo del organismo al que pertenezca lo cual se traduce en una gran diversidad de mecanismos de acción.

El primer tipo de ferritina descubierta fue de mamífero, la cual consta de 24 subunidades compuestas principalmente de hélices alfa de un peso molecular  $\sim 20$  KDa que ensamblan en una coraza hueca de 12 nm de diámetro exterior y 8 nm de interior (Harrison y Arosio, 1996; Chasteen 1998; Theil *et al.*, 2006). En mamíferos, las 24 subunidades que ensamblan a ferritina están compuestas por 2 tipos de cadenas polipeptídicas llamadas H y L. Estas dos subunidades ensamblan en varias proporciones con una distribución tejido específico para formar un

estructura con simetría 4,3,2 (Theil 1990; Harrison y Arosio 1996; Andrews 1998). La subunidad H contiene un núcleo de unión que consiste en los sitios A y B, el llamado centro ferroxidasa que une el hierro y que es donde se produce la oxidación rápida de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por dióxígeno (o peróxido de hidrógeno, figura 2) (Lawson et al., 1991). La subunidad L posee los residuos aminoácidos conocidos como sitios de nucleación que proveen de ligandos para la unión de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  que iniciarán el crecimiento del cristal al interior de ferritina (Santambrogio *et al.*, 1996). De esta forma, ferritina reconoce y une dos iones  $\text{Fe}^{2+}$  en el centro ferroxidasa donde son oxidados a  $\text{Fe}^{3+}$  por  $\text{O}_2$  (Lawson *et al.*, 1989). Los iones  $\text{Fe}^{3+}$  migran fuera del sitio ferroxidasa hacia el interior de la cavidad de ferritina donde se unen a los sitios de nucleación para la mineralización (Santambrogio *et al.*, 1996).

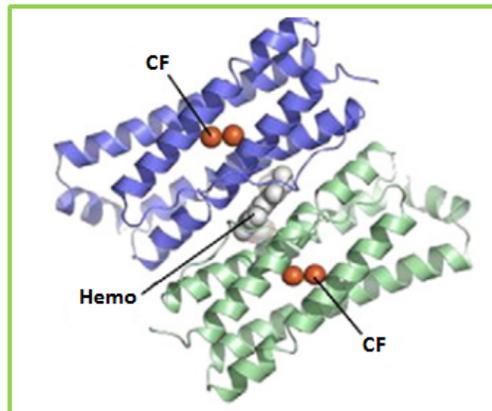
La distribución en la relación H/L es tejido específico, es posible encontrar ferritinas con hasta un 70% de subunidades H en tejidos que presentan una alta actividad ferroxidasa (por ejemplo corazón y cerebro), o también podemos hallar ferritinas con un máximo de 90% de subunidades L en tejidos con una mayor tasa de almacenamiento de hierro que actividad de oxidativa (por ejemplo bazo e hígado) (Harrison y Arosio 1996; Arosio *et al.*, 2009)



**Figura 2.** Diagrama esquemático de subunidad de ferritina H. A la izquierda, subunidad H donde en el centro se observa el sitio de unión diférrico. A la derecha se observa un diagrama de este lugar conocido como centro ferroxidasa, donde está el sitio A y B de unión a hierro. Fuente: Bou-Abdallah (2010).

En bacterias podemos encontrar dos tipos de ferritina las cuales pueden encontrarse en la misma célula. Existen las Bacterioferritinas (BFRs), y las ferritinas de bacteria (Ftns). Ambos

tipos de ferritinas participan en el almacenaje de hierro, pero también pueden tener funciones más especializadas en el metabolismo del hierro o en su detoxificación. El rol preciso de cada proteína varía dependiendo del organismo en particular. Por ejemplo en *Escherichia coli*, Ftn cumple la función principal de almacenar hierro (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999), mientras que en *Salmonella enterica* sv. *typhimurium*, Bfr es la que cumple mayoritariamente esta función (Velayudhan *et al.*, 2007). De todas las ferritinas, Bfr es la única que contiene el grupo hemo en su estructura. La subunidad de Bfr está compuesta por cuatro alfa hélices y una quinta más corta en el extremo C terminal. Un bucle largo conecta las hélices B y C de tal manera que estas son paralelas y antiparalelas con las otras dos alfa hélices. Entre dímeros de estas subunidades se encuentra el grupo hemo según se ve en la figura 3 (Frolow *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Estructura Bfr de *E. coli* (AP 3E1M). Dímero de Bfr que muestra la posición del centro ferroxidasa (CF), intrasubunidad y el grupo hemo inter-subunidad. Fuente: Le Brun *et al.* (2010).

Todas las subunidades de Bfr son del tipo cadena H; ellas no son particularmente similares a las cadenas H de eucariontes en términos de similitud de secuencia (~20% de identidad), pero conserva en su interior algunos de los residuos claves que constituyen el centro ferroxidasa. Como se ha mencionado antes la simetría en que se organizan las subunidades otorga a ferritina de canales. En el caso de los mamíferos y como se dijo en primera instancia los canales de 3 pliegues son de carácter hidrofílicos y los de 4 pliegues son hidrofóbicos, constituyendo otra diferencia de las Bfrs, las cuales poseen en cambio todos sus canales con un comportamiento

hidrofílico. Además en Bfr existe otro tipo de canal conocido como canales  $\beta$  que ocurren entre dos subunidades de dímeros como se mostró en la figura 3, en total son 12 de estos canales (Carrondo 2003; Macedo *et al.*, 2003). La unión del grupo hemo a estos sitios está dada por un par de residuos Met uno de cada subunidad. Sin embargo, estos residuos no están completamente conservados en Bfr por lo tanto existen algunas Bfr que no tienen la capacidad de unión al grupo hemo (Grossman *et al.*, 1992; Cheesman *et al.*, 1993; Frolow *et al.*, 1993). El rol del grupo hemo en Bfr es todavía poco claro, pero se cree que sirve para liberar hierro desde la cavidad a través de un mecanismo de reducción (Weeratunga *et al.*, 2009).

Las ferritinas de bacteria fueron descubiertas a comienzos de los 90s en *E. coli* y fue llamada ferritina de bacteria (FtnA) (Hudson *et al.*, 1993). Ftn comparten sólo un ~10-15% de identidad con Bfrs. En general consisten en 24 subunidades del tipo H arregladas en un dodecahedro con una simetría de 4,3,2 al igual que Bfrs y las ferritinas de mamífero. Aunque se encuentran lejanamente emparentadas con las ferritinas eucariontes de cadena H, en términos de secuencia (~22% de identidad), poseen una sorprendente similitud estructural en cuanto a su conformación y por tanto también posee 8 canales de 3 pliegues y 6 canales de 4 pliegues. Sin embargo, los canales de 3 pliegues están revestidos por ambos residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y son significativamente menos polares que sus equivalentes eucariontes. En el caso de los canales de 4 pliegues, estos son polares en sus extremos de salida e hidrofóbicos en su parte central. También están presentes los canales beta como en Bfr (Macedo *et al.*, 2003). Estos canales  $\beta$  no se encuentran en eucariontes y se plantea la posibilidad de que sean funcionalmente equivalentes en Ftns y Bfrs a los canales de 3 pliegues de eucariontes.

Recientemente se han caracterizado estructuralmente otro tipo de ferritinas en dos arqueas. La primera fue de la arquea hipertermofila *Archaeoglobus fulgidus*, con un 37% de identidad con FtnA de *E. coli* (Johnson *et al.*, 2005). Esta ferritina presenta una estructura típica en su subunidad, pero reveló un arreglo cuaternario diferente, con una conformación tetrahédrica de simetría 3,2, recordemos que el resto de las ferritinas posee una simetría de 4,3,2. Como resultado de esto, la cubierta de proteína es más o menos esférica, es menos densa y posee 4 súper poros con un diámetro de 4,5nm. Los poros son hidrofílicos y poseen carga negativa. En ausencia del núcleo de hierro la proteína se encuentra en forma disociada y en forma de dímeros la estructura

de 24 subunidades aparece estabilizada por el núcleo de hierro. La diferencia en la simetría parece deberse a diferencias en los residuos de la región de la quinta alfa hélice E que impide la asociación de subunidades en los ejes de cuatro pliegues. Sin embargo, esta disposición no es común de todas las arqueas. Por ejemplo y en el segundo caso de ferritina de arquea tenemos a *Pyrococcus furiosus* (con un 51% de identidad con *A. fulgidus*), que exhibe la simetría clásica 4,3,2, con canales de 3 y 4 pliegues similares a los de FtnA de *E. coli* (Tatur *et al.*, 2007). También se encontraron canales beta en ferritina de arquea, pero tal como en las otras ferritinas, la función precisa de cada canal no ha sido aun claramente establecida.

### 2.1.3 Biomineralización

En mamíferos el proceso de mineralización del fierro comienza con el movimiento de este desde el exterior de ferritina en el citoplasma hasta los sitios activos de ferritina (centro ferroxidasa), para esto el hierro debe atravesar la cubierta de la proteína. Los iones metálicos que co-cristalizan son dirigidos por los canales en la superficie de la cubierta y luego a los poros sobre la cara interna de la cavidad. Como se menciono antes los canales propuestos para esta tarea son los llamados de 3 pliegues que poseen de forma general un carácter hidrofílico que atrae a los iones hacia su interior. Los 8 canales de 3 pliegues distribuyen el hierro hacia los 24 sitios activos (uno por subunidad que forma cada canal), estos iones son orientados hacia uno de los 3 centros ferroxidasa, por medio de uno de los 3 residuos de aspartato altamente conservados aportado por cada subunidad que crean el canal (Tosha *et al.*, 2010).

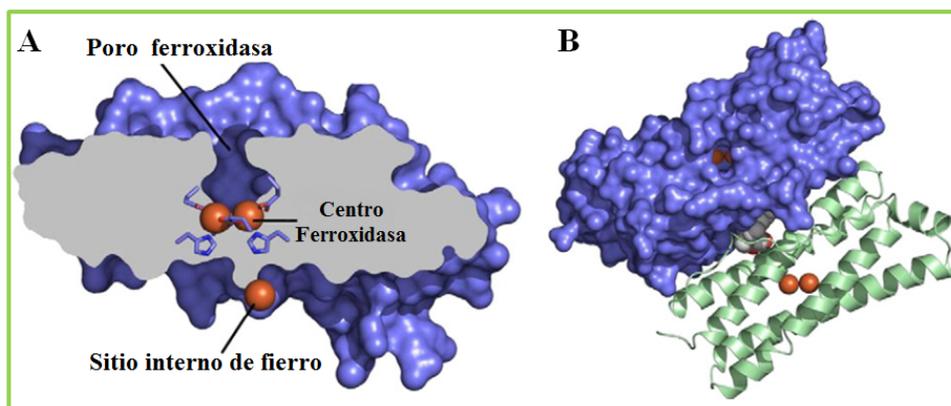
Al unirse el fierro al centro ferroxidasa se establece en forma de di-Fe<sup>2+</sup> el cual es oxidado, al mismo tiempo se produce la reducción de O<sub>2</sub> a peróxido de hidrogeno (un proceso de 2 electrones) (Jameson *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). La forma oxidada di-ferro, di-Fe<sup>3+</sup> no es estable y esta sujeta a un reacción de hidrólisis que produce el recambio el centro ferroxidasa liberando el Fe<sup>3+</sup> al interior de la cavidad de ferritina para su mineralización y dejando el centro ferroxidasa libre para otro ciclo de oxidación. La habilidad del centro ferroxidasa para regenerar su forma apo (sin hierro) y catalizar la oxidación nuevos Fe<sup>2+</sup> (Waldo *et al.*, 1993; Bou-Abdallah

*et al.*, 2005), indica que este sitio actúa como un poro cerrado que es controlado por la participación del hierro, de esta forma su transporte a la cavidad está acoplado a la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Este proceso es esencial para las etapas tempranas de la formación del núcleo cuando no existe hierro presente en la cavidad.

Después de la formación de los precursores minerales, se propone que el hierro migra a través de los canales de 3 pliegues y es oxidado directamente sobre la superficie del mineral en crecimiento (Douglas *et al.*, 1998). La oxidación del hierro en la superficie del mineral preformado es mucho más rápida que la ocurrida en el sitio ferroxidasa, y aunque algunos estudios muestran que el sitio ferroxidasa sigue funcionando luego de que el núcleo mineral ha sido establecido, su contribución en oxidar  $\text{Fe}^{2+}$  es mucho menos significativa que la oxidación ocurrida en la superficie del núcleo del mineral (Chasteen y Harrison. 1999). Esto significa que a altos niveles de carga de hierro, el principal sitio de catálisis cambia desde el sitio ferroxidasa a la superficie del núcleo de mineral en crecimiento (Xu *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2003), y resulta en la completa reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (un proceso de 4 electrones). Adicionalmente en cantidades intermedias de  $\text{Fe}^{2+}$  (100-500  $\text{Fe}^{2+}$  por ferritina), resulta en el consumo de algunos de los peróxido de hidrogeno producidos en el sitio ferroxidasa en una reacción de oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  (Zhao *et al.*, 2003). Por lo tanto la oxidación en ferritinas eucariontes ocurre a través de la combinación de estas 3 vías, dependiendo de la cantidad de  $\text{Fe}^{2+}$  adicionado.

En el caso de los procariontes, el proceso es diferente debido a las diferencias estructurales, en primer lugar son mayoritariamente homopolímeros, lo que significa que están conformados por una misma y única subunidad. En el caso de las bacterioferritinas (Bfr), el mecanismo de mineralización está poco estudiado, hay poca información y mucha de ella es sólo estructural (Frolow *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Swartz *et al.*, 2006). Sin embargo, en *E. coli* existe información sustancial tanto estructural como del mecanismo en si y que junto al resto de la información nos permiten formar una posible imagen de como se lleva a cabo este proceso (Le brun *et al.*, 1993 y 1995; Yang *et al.*, 2000; Baaghil *et al.*, 2003; Crow *et al.*, 2009). La mineralización en Bfr de *E. coli* ocurre vía un mecanismo de 3 fases cinéticamente distintas. Primero en la fase 1, dos iones  $\text{Fe}^{2+}$  entran en cada uno de los 24 sitios ferroxidasa.

Según la estructura de Bfr de *Desulfovibrio desulfuricans* (Macedo *et al.*, 2003), cada centro ferroxidasa está ubicado bajo un poro que otorga acceso directo desde el exterior de la cavidad (Figura 4). El hecho de que este poro este en la estructura de apo Bfr (Crow *et al.*, 2009), sugiere fuertemente que esta es la ruta de entrada de  $\text{Fe}^{2+}$  para unirse al centro ferroxidasa. Luego en la fase dos el  $\text{Fe}^{2+}$  unido al centro ferroxidasa en forma de  $\text{di-Fe}^{2+}$  es oxidado en presencia de  $\text{O}_2$  para generar  $\text{di-Fe}^{3+}$ , con la concomitante reducción del dioxígeno a peróxido de hidrogeno. Esta reacción es una reducción de 2 electrones pero la proporción  $\text{Fe}:\text{O}_2$  del centro ferroxidasa es 4:1, indicando que la reducción es un proceso de 4 electrones. La implicancia estequiometrica de esto es que dos centros ferroxidasa actúan en conjunto para reducir una molécula de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , pudiendo ser el dímero la unidad funcional en este tipo de ferritina (Yang *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Poro del centro ferroxidasa en Bfr. A: corte longitudinal de una subunidad de Bfr de *E. coli*, mostrando el poro que une directamente el centro ferroxidasa con el exterior de la proteína. B: vista de superficie desde el exterior de Bfr, en lo profundo del poro se observa el centro ferroxidasa. La otra subunidad está en formato caricatura. Fuente: Le brun *et al.* (2010).

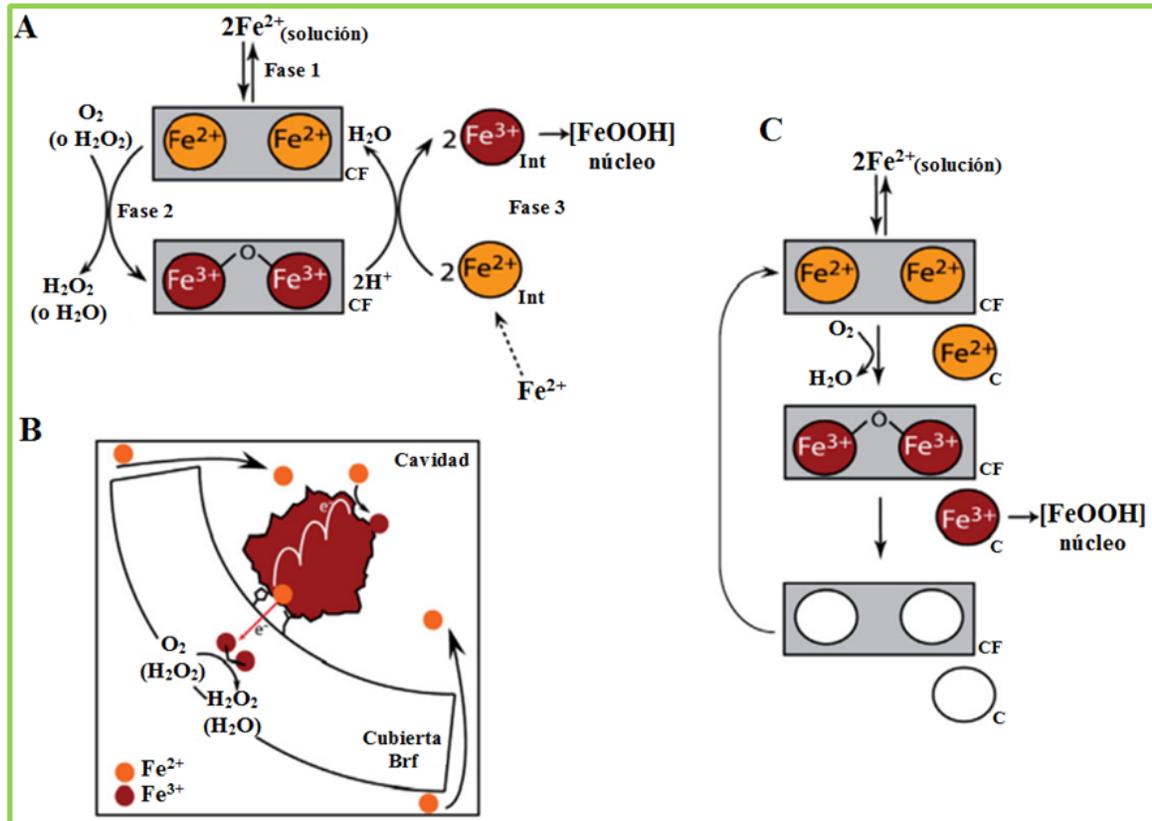
Subsecuentemente se detectó que la producción de peróxido de hidrogeno era mucho mejor oxidante de  $\text{Fe}^{2+}$  en el centro ferroxidasa que el dioxígeno (Yang *et al.*, 2000; Bou-Abdallah *et al.*, 2002). De esta forma, la reacción ocurrida en un centro ferroxidasa genera  $\text{di-Fe}^{2+}$  y peróxido de hidrogeno, el cual después reacciona en otro centro ferroxidasa para generar un segundo  $\text{di-Fe}^{2+}$  y agua.

La tercera fase es la formación del núcleo de fierro mineral en el interior de Bfr, según estudios recientes bajo un exceso de  $\text{Fe}^{2+}$ , lo suficiente para saturar todos los centros ferroxidasa,

el hierro entraría a la cavidad por uno o más de los canales que posee Bfr en los ejes de 4 pliegues, 3 pliegues y 2 pliegues (Frolow *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 2003). Una vez dentro, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  se unen a la cara interna de Bfr a sitios de nucleación. Uno de estos sitios que involucra los residuos de Asp50 y His46 de la subunidad fue recientemente identificado en estudios cristalográficos de Bfr (Crow *et al.*, 2009). Este sitio está localizado adyacente al centro ferroxidasa y es propuesto para unir el  $\text{Fe}^{2+}$  que entra por los canales, donde es oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  y luego sujeto a una reacción de hidrólisis donde el hierro pasa a ser parte del núcleo en formación y los electrones resultantes de la oxidación son dirigidos al sitio ferroxidasa donde el di- $\text{Fe}^{2+}$  es regenerado y puede volver a reaccionar con dióxígeno o peróxido de hidrógeno. Este fenómeno fue observado en estudios realizados en Bfr de *A. vinelandii* (Watt *et al.*, 1992). El proceso de mineralización propuesto para Bfr se encuentra resumido en la figura 5a y b.

En las ferritinas bacterianas (Ftn), una de las más caracterizadas es FtnA de *E. coli* (Treffry *et al.*, 1998a; Bauminger *et al.*, 1999 y 2000; Stillman *et al.*, 2001; Bou-Abdallah *et al.*, 2005). La vía de mineralización propuesta es similar al mecanismo descrito para las ferritinas eucariontes pero se diferencia en la presencia del llamado sitio C (Stillman *et al.*, 2001). La oxidación del hierro ocurre en el centro ferroxidasa en presencia de dióxígeno. Esta reacción procede en una relación hierro:dióxígeno 3:4 comparada con la de 2 en ferritinas eucariontes (Treffry *et al.*, 1998b). Esta observación se debe probablemente a la presencia del sitio C y además se propone la existencia de un cuarto sitio no caracterizado, donde se realizaría oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  que llevaría a la reducción de dióxígeno a agua en lugar de peróxido de hidrógeno. De acuerdo con esta observación la proporción hierro:dióxígeno bajó a 2 cuando el sitio C fue sustituido. Una vez oxidado el hierro en el centro ferroxidasa, se propone su migración hacia la cavidad central donde la mineralización del núcleo es llevada a cabo. Estudios bioquímicos y estructurales en Ftn de *H. pylori*, reportaron que a niveles bajos de hierro la mineralización es liderada por el centro ferroxidasa, mientras que a niveles elevados la mineralización es mayoritariamente autocatalítica por la superficie del núcleo mineral en formación (Cho *et al.*, 2009). Por otra parte, basado en la observación de un ion de hierro unido a residuos His149 ubicados en los canales de cuatro pliegues (un residuo por subunidad participando del canal), los

autores sugieren que este canal es la ruta de ingreso de hierro a la cavidad central. El mecanismo de mineralización en Ftn esta resumido en la figura 5c.



**Figura 5.** Mecanismos de mineralización en ferritinas procariontes. **A** y **B**: representación esquemática de mineralización en Bfr de *E. coli*. El modelo muestra en **A** el mecanismo de formación del núcleo mineral desarrollado en 3 distintos pasos o fases. En la fase 1, iones de Fe<sup>2+</sup> se unen al centro ferroxidasa (CF), y son oxidados en la fase 2. En la fase 3, Fe<sup>2+</sup> unido al sitio de la cara interna de la cavidad (Int), es oxidado y los electrones canalizados al centro ferroxidasa, que es reducido. Este mecanismo continua operando a través de la formación del núcleo ilustrado en **B**, donde los iones de Fe<sup>2+</sup> entrantes son oxidados en la superficie del núcleo y los electrones resultantes son canalizados al sitio ferroxidasa por medio del sitio de unión a hierro ubicado en la cara interna de Bfr. **C**: representación esquemática de mineralización en FtnA de *E. coli*, iones de Fe<sup>2+</sup> se unen al centro ferroxidasa y al sitio C (C), y son oxidados en presencia de oxígeno, generando una forma inestable de di-Fe<sup>3+</sup> en el centro ferroxidasa. Los iones de Fe<sup>3+</sup> del sitio C y el centro ferroxidasa son transferidos a la cavidad interna donde pueden ser incorporados al núcleo. La forma Apo del centro ferroxidasa y el sitio C ahora están libres para aceptar nuevos iones Fe<sup>2+</sup>. Fuente: Le brun *et al.* (2010).

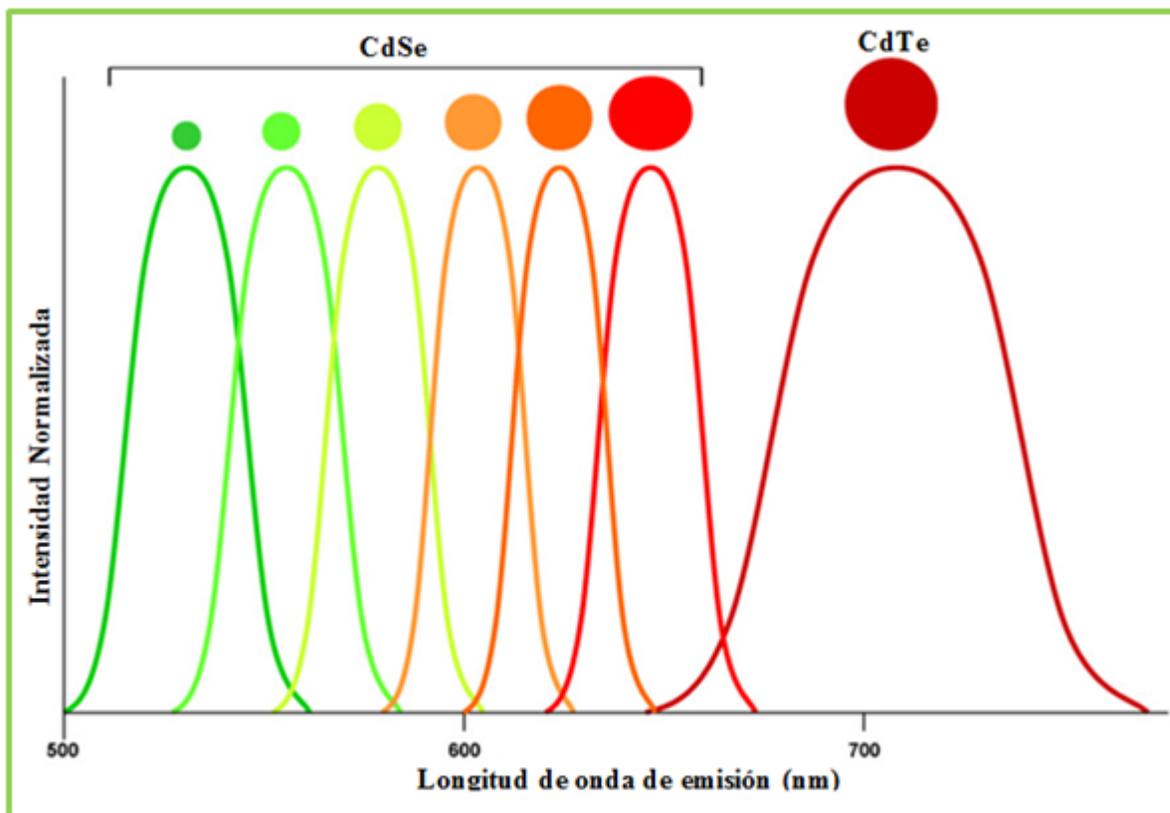
## 2.2 Puntos cuánticos (PCs)

Los puntos cuánticos (PCs), recientemente han llamado la atención como novedosos fluoróforos. Estos son nano cristales semiconductores de forma semiesférica compuestos típicamente por un núcleo de CdSe, CdS o CdTe, recubierto por un escudo de ZnS. Usualmente son manufacturados por inyección de sus precursores en solventes orgánicos a altas temperaturas (300°C), y es posible manipular su tamaño alterando la cantidad de precursor y el tiempo de crecimiento del cristal, lo que es importante para las propiedades fluorescentes ya que la longitud de onda de emisión de los PCs depende del tamaño del cristal (Murray *et al.*, 1993; Dabbousi *et al.*, 1997; Bruchez *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Peng y Peng, 2001).

### 2.2.1 Propiedades ópticas

PCs son nano cristales semiconductores semiesféricos compuestos por elementos pertenecientes a los grupos II-IV (CdSe), o III-V (InP), de la tabla periódica (Schmidt *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2000; Peng y Peng, 2001). Además son altamente fluorescentes, debido al hecho que sus estados de excitación/espacio de banda (Band gap), están espacialmente confinados, lo cual resulta en propiedades físicas y ópticas intermedias entre compuestos y moléculas únicas. El confinamiento cuántico permite la emisión de luz a diferentes longitudes de onda dependiendo de qué tamaño tenga el núcleo del PC (Wilson *et al.*, 1993)(Figura 6). PCs mas grandes poseen espacios de banda mas pequeño, resultando en la emisión de luz roja, mientras que PCs más pequeños emiten luz azul de más alta energía. Además, debido a su pequeño tamaño todo el cristal actúa como una sola molécula con todos sus átomos constituyentes siendo excitados y emitiendo luz al mismo tiempo dando como resultado una señal de alta intensidad (Dahan *et al.*, 2003). Además de esto, los PCs exhiben ausencia de photobleaching o fotoblanqueo que es cuando un fluoróforo es destruido como tal, producto de la exposición a la luz (Bruchez *et al.*, 1998; Chan and Nie, 1998; Wu *et al.*, 2003), esto debido a su composición inorgánica, y a su prolongado tiempo de vida de entre 10 a 40ns muy superior a los fluoróforos orgánicos. Adicionalmente, Tienen también un alto coeficiente de extinción molar (Leatherdale *et*

*al.*, 2002), una medida de la absorción de luz a una longitud de onda dada, y una mucho mejor fotoestabilidad comparada con fluoróforos orgánicos de aproximadamente 1000x (Wu *et al.*, 2003). Estas características hacen de los PCs perfectos marcadores fluorescentes y superiores a fluoróforos orgánicos.



**Figura 6.** Longitud de onda de emisión de puntos cuánticos. Después de la excitación, la emisión es estrecha, simétrica e incluso puede llegar al infrarrojo cercano. Fuente: Tholouli *et al.* (2008).

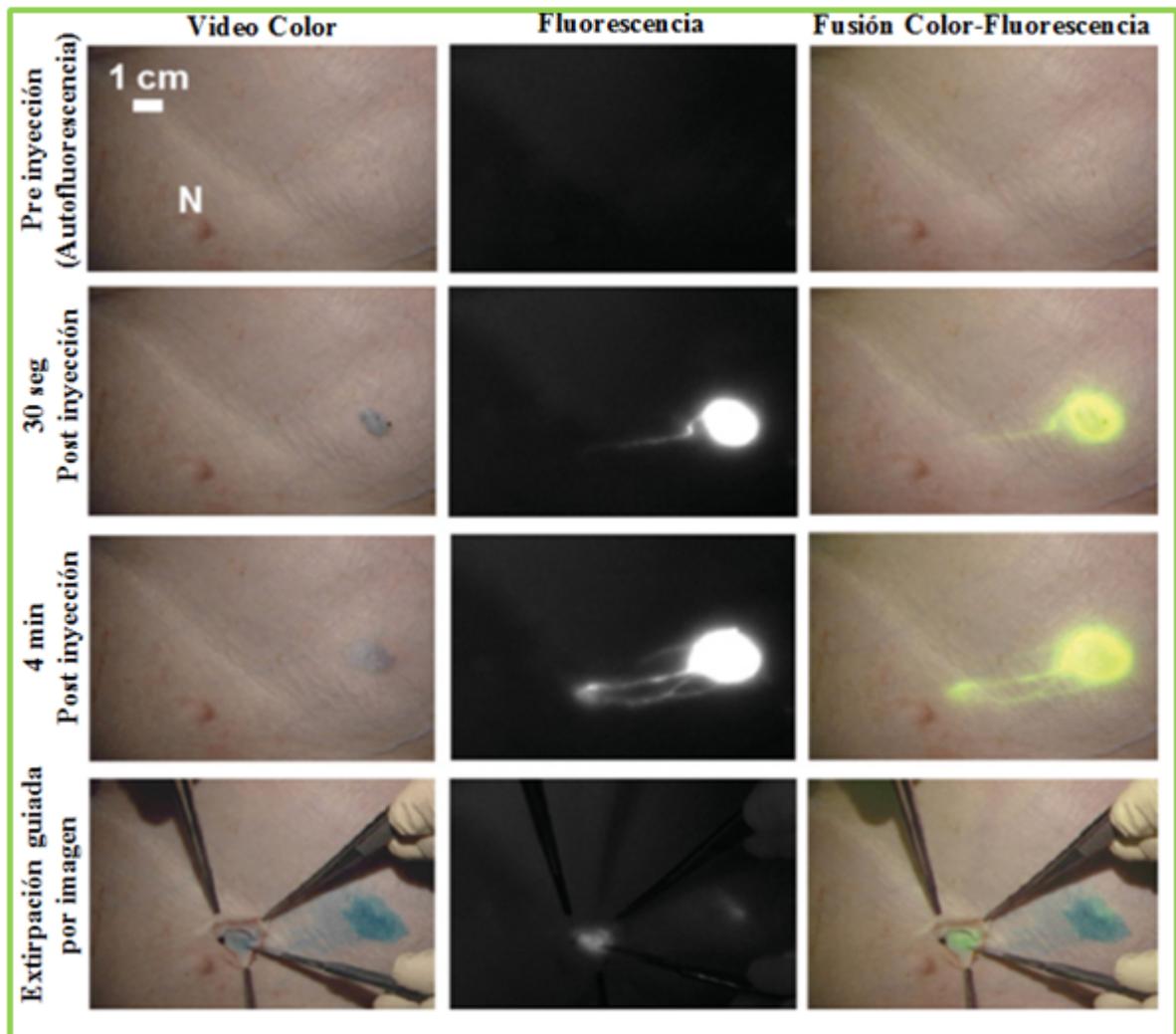
## 2.2.2 Aplicaciones de los puntos cuánticos

Uno de los principales campos de aplicación de los PCs es en biomedicina donde como fluoróforo sus posibilidades son múltiples. Por ejemplo en inmunofluorescencia Bruchez *et al.* (1998), fue el primero en reportar la detección de filamentos de actina en fibroblastos de ratón; luego de esto han sido utilizados para detectar una vasta gama de proteínas en tejido fijado (Akhtar *et al.*, 2007; Ornberg and Liu, 2007; Zhou *et al.*, 2007), fluoroinmuno ensayos (Wei *et*

*al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007), y en citometría de flujo (Wu *et al.*, 2007). La contribución de los PCs como fluoróforos ha permitido una detección más sensible de biomarcadores, incluso al nivel de detección de moléculas individuales, gracias a propiedades como: elevado brillo, espectro de emisión simétrico y la posibilidad de ser fabricados bajo diferentes parámetros (Tuneability), lo cual va de la mano con el hecho de que diferentes PCs pueden ser excitados bajo una misma longitud de onda (Bostick *et al.*, 2006; Fountaine *et al.*, 2006; Byers *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007). Esta última propiedad es una de las más ventajosas para realizar detección múltiples de señales, esto ha sido mostrado por Fountaine *et al.* (2006), quien usó PCs para medir de manera simultánea 5 marcadores basándose en el marcaje secuencial de cada anticuerpo utilizado y pudiendo detectar correctamente CD20, IgD, Ki67 (clon MIB-1), CD3 y CD68 en ganglios linfáticos humanos.

Los PCs han permitido la detección de proteínas a través de su uso en inmuno ensayos, sin embargo no siempre hay disponibles anticuerpos para todas las proteínas y también se hace necesario el análisis de expresión de ARN mensajero por hibridación *in situ*. Pathak *et al.*, (2001), ha utilizado sondas de oligonucleótidos marcados con PCs para identificar mutaciones en muestras de esperma humano a través de hibridación *in situ* de fluorescencia. Con el tiempo los métodos de conjugación han ido mejorando y también han permitido la detección de señales múltiples (Chan *et al.*, 2005; Byers *et al.*, 2007). El uso de PCs también se ha incrementado para el estudio de interacciones a escala molecular, por ejemplo Lidke *et al.* (2004), utilizó PCs para estudiar la localización celular de EGF, lo cual se puede extender a la localización y seguimiento de moléculas en células vivas ya sea *in vitro* o *in vivo*. Muchos estudios se han dedicado a poder expandir esta aplicación. En este campo Dahan *et al.* (2003), reportó el seguimiento en tiempo real de moléculas conjugadas con PCs en neuronas. Otra poderosa aplicación es la de poder marcar moléculas para visualizarlas en animales *in vivo*, a través de su observación incluso a través de tejidos, esto es posible debido a la poderosa emisión de los PCs y su fotoestabilidad, además que son capaces de emitir en el rango infrarrojo cercano e infrarrojo, lo cual no es posible con fluoróforos convencionales. Por ejemplo Kobayashi *et al.* (2007), utilizó PCs para el mapeo de ganglios linfáticos en cáncer y a su vez Kim *et al.* (2004), utilizó PCs que emiten en el infrarrojo cercano para mapear ganglios centinelas en cirugías de cáncer. En estos casos, los PCs

se inyectan por vía intradérmica en extremidades distales y luego se puede seguir su movimiento a lo largo de los canales linfáticos hasta la identificación del ganglio centinela. Estos experimentos demostraron un alto contraste entre la autofluorescencia y la señal de emisión, lo que permitió realizar la incisión quirúrgica para la extracción del ganglio centinela positivo (Figura 7)



**Figura 7.** Mapeo *in vivo* de ganglios linfáticos centinelas. PCs que emiten en el infrarrojo cercano del espectro fueron inyectados en la ingle derecha de un cerdo y capturadas las imágenes en video color (Izquierda), y fluorescencia (medio). Desde arriba de la figura se puede observar los siguientes tiempos: antes de la inyección, 30 seg después de la inyección, 4 min después de la inyección y durante la extirpación guiada por imagen del ganglio linfático centinela. A la derecha, la imagen fusionada del video a color y la fluorescencia Tholouli *et al.* (2008).

También se ha llevado a cabo el seguimiento de fluorescencia de PCs emitiendo en el infrarrojo cercano del espectro, inyectados subcutáneamente en la pata anterior de ratones demostrándose la acumulación de estos en los ganglios linfáticos dentro de los 5 minutos posteriores y con una concentración máxima a las 4 horas, que poco a poco decayó en los 10 días siguientes, con un nivel bajo de captación por otros órganos. Estos experimentos fueron realizados en ratas y cerdos demostrando su aplicabilidad en mamíferos, lo cual genera buenas expectativas para usar esta técnica en seres humanos (Soltész *et al.*, 2005).

### **2.3 Ferritina como nanoreactor para puntos cuánticos**

Según lo anteriormente expuesto los PCs son nanocristales semiconductores con propiedades ópticas únicas que los hacen excelentes para una gran gamma de aplicaciones entre ellas su uso como fluoróforos de larga duración, alta eficiencia cuántica, una distribución estrecha de emisión y un espectro de absorción continuo (Chan *et al.*, 2002). Sin embargo, sus aplicaciones en medicina como marcador *in vivo* están limitadas por su composición de Cadmio altamente citotóxico, de esta forma y en condiciones *in vivo* los PCs tenderían a descomponerse parcialmente y liberar iones de Cd al medio (Lewinski *et al.*, 2008). Por otra parte, los procedimientos estándares para la manufactura de PC's están asociados al uso de solventes orgánicos a altas temperaturas lo que le otorga un carácter insoluble (Chang *et al.*, 2006). Por esta razón, se han realizado reiterados intentos para lograr hacerlos solubles y biológicamente inertes. En los últimos años se han desarrollado muchas estrategias para explicar esto, la mayoría de ellas consisten en el recubrimiento de los PC's con moléculas aislantes, tales como fosfolípidos (Dubertret *et al.*, 2002), polímeros amfifílicos (Gao *et al.*, 2004), dendrímeros (Guo *et al.*, 2003), oligos de fosfinas (Kim y Bawendi, 2003), ligandos hidrofílicos multidentados (Medintz *et al.*, 2005), lo que va en beneficio de dar un carácter soluble y químicamente más estable de los PCs (Aldana *et al.*, 2004). No obstante, se ha demostrado que el uso de estos ligandos alteran el estado químico y físico de los átomos de la superficie del PC y en muchos casos disminuyendo dramáticamente la eficiencia cuántica del PC (Guo *et al.*, 2003).

Muchas otras estrategias se han evaluado para el recubrimiento de los PC entre los que destacan el uso de ligandos basados en grupos tiol, los que pueden llegar a formar disulfuros con el tiempo, retirándose de la superficie del PC y causando la agregación y precipitación de este (Aldana *et al.*, 2004). Dentro de la misma temática se ha intentado exitosamente la generación de un escudo alrededor del PC, basado en el uso de una capa de sílice la cual fue muy efectiva en otorgar estabilidad química, pero los procedimientos para lograr construir de manera controlada una capa de sílice alrededor de un PC hidrofóbico es muy complicado y costoso (Gómez *et al.*, 2005).

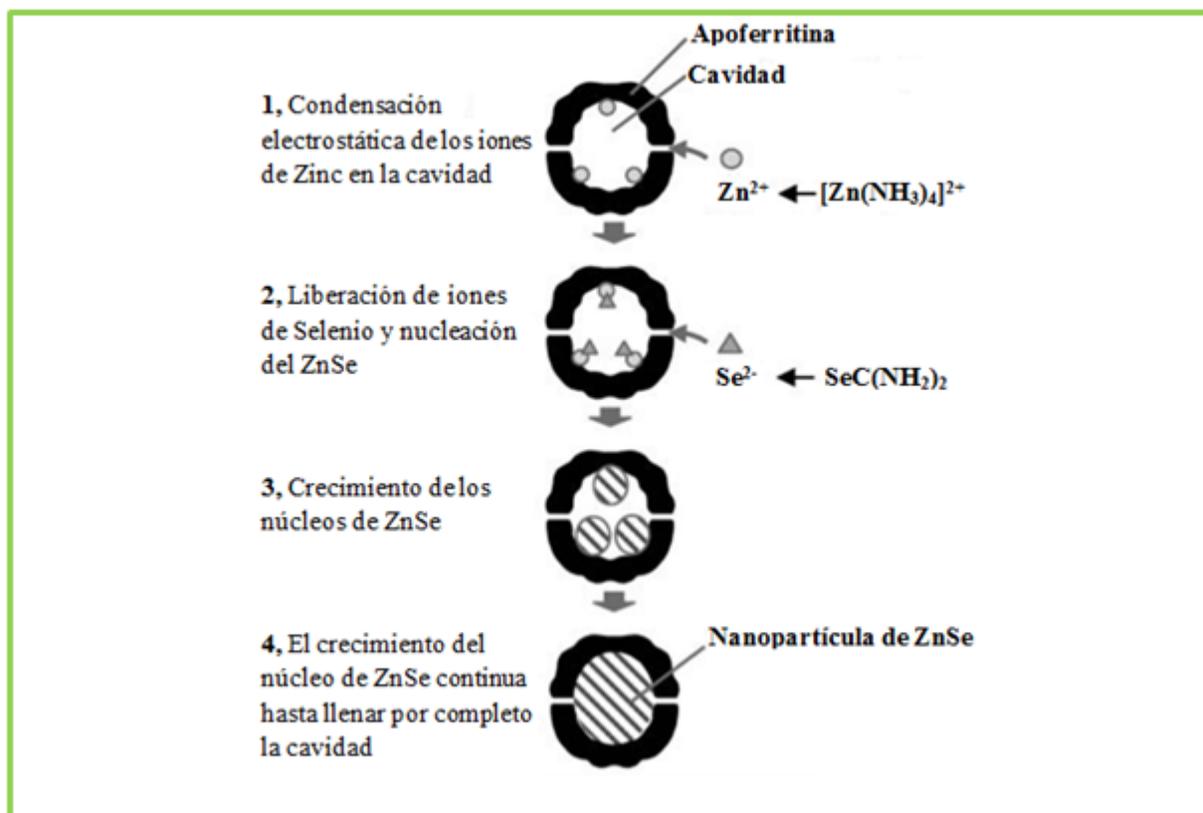
Apo ferritina (AFt), es la forma desmineralizada de la proteína ferritina y presenta características estructurales semejantes a la de una jaula que funciona como almacén para el hierro en la célula. El hierro entra de forma natural a la cavidad por medio de canales, sitios de oxidación y sitios de nucleación utilizando distintas vías para la formación de hierro mineral en el interior (Ueno *et al.*, 2004). Estas mismas vías se han utilizado para la incorporación de elementos no nativos de ferritina como Ag, Cu, Au entre otros (Uchida *et al.*, 2007). Las principales apuestas van dirigidas al paso de iones metálicos por los 8 canales de 3 pliegues que posee ferritina, además se postula que el interior rico en aspartatos y glutamatos promueve la formación de nano cristales en la cavidad la cual además delimita el tamaño máximo alcanzado por dichos cristales (Xing *et al.*, 2009). Una de las estrategias utilizada es la incorporación de iones metálicos divalentes al interior de ferritina para luego incorporar un agente reductor como el  $\text{NaBH}_4$ , estrategia que se conoce como reducción *in situ*. Se ha reportado el uso de ferritina como nano reactor en diferentes preparaciones de nano partículas, incluyendo el PC CdSe (Yamashita *et al.*, 2004). Las ventajas de esta aproximación para la síntesis de PCs son la de permitir la fabricación de nano cristales solubles en medio acuoso y además de manera inocua ya que la cubierta de ferritina mantendría aislado el nano cristal del medio externo, de la misma manera en que ferritina protege a la célula almacenando el fierro evitando sus posibles repercusiones negativas según lo ya visto anteriormente en la química y bioquímica del hierro. Otra gran ventaja es que ferritina es factible de modificaciones a través de mutaciones que adapten sus canales, su superficie interna/externa y su conformación de manera tal de obtener la mejor configuración posible para la síntesis de nano partículas

En este contexto se han desarrollado dos estrategias utilizando ferritina para hacer PCs biocompatibles, la primera consiste en la encapsulación del PC previamente preparado aprovechando la propiedad que posee ferritina de desarmarse en subunidades a pH inferior a 2 y luego poder restablecerse ajustando el pH sobre 5. Siguiendo esta estrategia Turyanska 2009, realizó el encapsulamiento del PC PbS en medio acuoso con un rango esférico del nano cristal manejable entre 3 a 12nm dependiendo de la proporción de  $Pb^{2+}$  y  $S^{2-}$ . Las preparaciones obtenidas mostraron emisión en un rango de entre los 1000 nm y 1300 nm y fueron estables por un periodo superior a 3 meses, además reporto baja o nula citotoxicidad en pruebas realizadas con líneas celulares.

En otro estudio se realizó el encapsulamiento de partículas de Au en ferritina de la arquea *Archaeoglobus fulgidus*, esta proteína tiene una conformación estructural diferente a las demás ferritinas ya que posee 4 súper poros con un diámetro de 4,5 nm (Swift *et al.*, 2009). Su aproximación fue distinta a otros estudios ya que se basaron en que el ensamblado de ferritina de *A. fulgidus* es mediado por sal, lo cual significa que a bajas concentraciones de sal la proteína existe como dímeros y cuando la concentración de sal se incrementa a aproximadamente 600 mM, la proteína esta mayoritariamente ensamblada en su forma de 24 subunidades (Johnson *et al.*, 2005), lo cual se aprovechó para encerrar partículas de oro en su interior sin necesidad de realizar cambios de pH como en otros estudios.

La segunda estrategia es la de síntesis de la nanopartículas en el interior de ferritina, esta aproximación requiere que los elementos constituyentes de la nanopartícula entren primero a la cavidad de ferritina y luego reaccionen en su interior. En este contexto Iwahori 2005, informó la síntesis del PC ZnSe en Apoferritina de bazo de caballo (Horse spleen apoferritin, HsAFr), utilizando un sistema de reacción lenta. El principio de la reacción lenta está dado por el hecho de que los iones de zinc y selenio reaccionan rápidamente fuera de la cavidad, es por esto que se combinan con otras moléculas que estabilicen los iones y permitan su entrada a la cavidad y que reaccionen dentro de ferritina. En este estudio la síntesis se realizó en una solución con amonio el cual forma con el zinc el tetra ion  $[Zn(NH_3)_4]^{2+}$ , este se incorpora primero y libera los iones  $Zn^{2+}$  los cuales entran a ferritina por los canales de 3 pliegues. Una vez llenado el interior se adiciona el selenio en forma de selenourea. Este compuesto se descompone lentamente liberando iones

$\text{Se}^{2-}$  gradualmente al interior de ferritina donde luego reacciona con los iones de  $\text{Zn}^{2+}$  y forman el PC ZnSe (Figura 8) (Iwahori *et al.*, 2005).



**Fig. 8** Esquema de síntesis de ZnSe por sistema de reacción lenta: (1) Condensación electrostática: Apoferritina es incubada con iones de zinc los cuales se condensan en la cavidad. (2) después de la incubación, se adicionan iones de selenio en forma de selenourea que se degrada lentamente en solución acuosa. Los núcleos de ZnSe son producidos preferencialmente en la cavidad de Apoferritina debido a que los iones de zinc altamente condensados reaccionan rápidamente con los iones de selenio. (3) Una vez que los núcleos de ZnSe son formados, la nanopartícula de ZnSe continúa creciendo de manera autocatalítica. (4) ZnSe continúa creciendo hasta llenar la cavidad. Fuente: Iwahori *et al.* (2005).

En otro estudio, realizado también por Iwahori *et al.* (2006), optimizaron el sistema de reacción lenta para la síntesis del PC CdSe en ferritina de bazo de caballo (Horse spleen apoferritin, HsAFr). Al igual que con ZnSe se estabilizó los iones de  $\text{Cd}^{2+}$  con amonio,

formándose el tetra ion  $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ , y el  $\text{Se}^{2-}$  por su parte se liberó progresivamente a partir de selenourea. Estos investigadores establecieron que el pH más adecuado debía ser 9,5 que fue el que más aumento la eficiencia de la incorporación presuntamente al hacer más estable el tetra ion de  $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ , haciéndolo mas disponible de entrar a la cavidad de ferritina. La concentración óptima de amoníaco quedó en 5 mM y finalmente optimizaron la síntesis aplicando burbujas de  $\text{N}_2$  para purgar el oxígeno de la reacción ya que la selenourea es inestable por auto-oxidación. Este estudio logró finalmente la síntesis de nanopartículas de CdSe solubles en agua y estables en el tiempo, dentro de la cavidad de HsAFr, demostrando junto a los otros estudios presentados la factibilidad del uso de ferritina como nanoreactor en la síntesis de nanopartículas diferentes del hierro utilizando las características estructurales que posee para la incorporación y fabricación de nuevos nano materiales incluyendo los puntos cuánticos. Además, la gran diversidad de ferritinas y sus diferentes mecanismos de biomineralización son un recurso importante para la búsqueda de nuevas vías de síntesis y la generación de nuevas ferritinas modificadas en laboratorio que abrirá paso al desarrollo de nuevas tecnologías basadas en nanopartículas.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

“Las diferencias estructurales encontradas en Ferritinas bacterianas afectan la formación y propiedades de nanocristales de CdSe en el interior de su cavidad”

#### 3.2 Objetivo general

- Evaluar como afectan las diferencias estructurales entre ferritina salvaje de *C. tepidum*, su mutante 166 y ferritina humana L en la formación de nanocristales de CdSe en su interior.

#### 3.3 Objetivos específicos

- Expresar y purificar ferritina silvestre y mutante de *C. tepidum*, y ferritina humana L.
- Evaluar la síntesis de nanocristales de CdSe en ferritina silvestre y mutante de *C. tepidum*, y ferritina humana L.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

Acetato de Cadmio, Selenourea, fenilmetil sulfonil fluorido (PMSF), ácido tioglicolico fueron obtenidos de química SIGMA Co. Ampicilina fue obtenida de Fisher Biotech, Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosidasa (IPTG), de Promega. Triptona y extracto de levadura de DIFCO.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Clonación, expresión y purificación de proteínas

Ftn de *C. tepidum* fue clonada en un vector pET3a (Novagen), al igual que el mutante 166 y ferritina humana L. El mutante fue obtenido por la introducción de un codón de termino en la posición 166 de ferritina de *C. tepidum* mediante mutagénesis sitio-dirigida. Los plasmidos recombinantes fueron transformados en *E. coli* BL21(DE3). Las cepas recombinantes fueron crecidas en medio Luria-Bertani (10 g de triptona por litro, 10 g de NaCl por litro y 5 g de extracto de levadura por litro), con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina a 37 °C toda la noche y luego fueron inducidas con 0,5 mM de IPTG por 4 horas a temperatura ambiente. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en 4 ml de buffer de lisis (100 mM MOPS, pH 7; 0,2 mM PMSF), y sonicadas cuatro veces por 10 segundos seguidos de 20 segundos en hielo. El sonicado fue centrifugado a 5000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue calentado a 75°C por 10 minutos y luego centrifugado a 13 mil g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante con las proteínas solubles que no fueron precipitadas por el shock de calor fue analizado por SDS-PAGE al 15% de gel separador y 6% de gel concentrador. Usando este procedimiento, la homogeneidad electroforética alcanzada fue de entre un 85 y 95% no necesitando más pasos de purificación. Antes de ser usadas las muestras de ferritina fueron tratadas para obtener su forma Apo según Treffry y Harrison (1978), y cuantificadas por el método de Folin de Lowry.

### 4.2.2 Síntesis de CdSe

Las muestras de ferritina fueron cargadas para la síntesis de CdSe usando como base el procedimiento de Iwahori *et al.* (2006). Se realizó la preparación de las reacciones (volumen final de 500  $\mu\text{L}$ ), de forma aeróbica con una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  de ferritina (Ct, Ct-166 y L humana), 40 mM de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 5 mM de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y se ajustó el pH a 9,5 con hidróxido de sodio. Se incubó cada reacción con cadmio acetato a una concentración final de 0,8 mM por 1 hora y luego se adicionó selenourea (recientemente preparada), a una concentración final de 4mM. Se dejaron reaccionando toda la noche a temperatura ambiente, se centrifugó a 13.000 g y se midieron los espectros a los sobrenadantes en un espectrofotómetro UV-Vis T80+. Luego las muestras fueron dializadas toda la noche a 4°C contra 2 litros de buffer MOPS 100mM pH 7. Se centrifugo a 13.000 g y se midieron los espectros nuevamente.

Alternativamente se realizo la preparación de las reacciones (volumen final de 2mL), en condiciones anaeróbicas en atmósfera de  $\text{N}_2$  con una concentración de 1 $\mu\text{M}$  de ferritina (Ct, Ct-166 y L), 40mM de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 5mM de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y se ajustó el pH a 9,5 con hidróxido de sodio. Se incubó cada reacción con cadmio acetato a una concentración final de 0,8mM por 1 hora y luego se adicionó selenourea (preparada fresca), a una concentración final de 4mM. Se dejaron reaccionando toda la noche en atmósfera de  $\text{N}_2$  y a temperatura ambiente. Se centrifugo a 13000 g y se midieron los espectros a los sobrenadantes en un espectrofotómetro UV-Vis T80+. Luego las muestras fueron dializadas toda la noche a 4°C contra 2 litros de buffer MOPS 100mM pH 7. Se centrifugo a 13.000 g y se midieron los espectros nuevamente. Se tomaron los espectros de emisión a 295, 310, 350, 400, 450 y 500nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Shimadzu RF-5310PC.

## 5 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

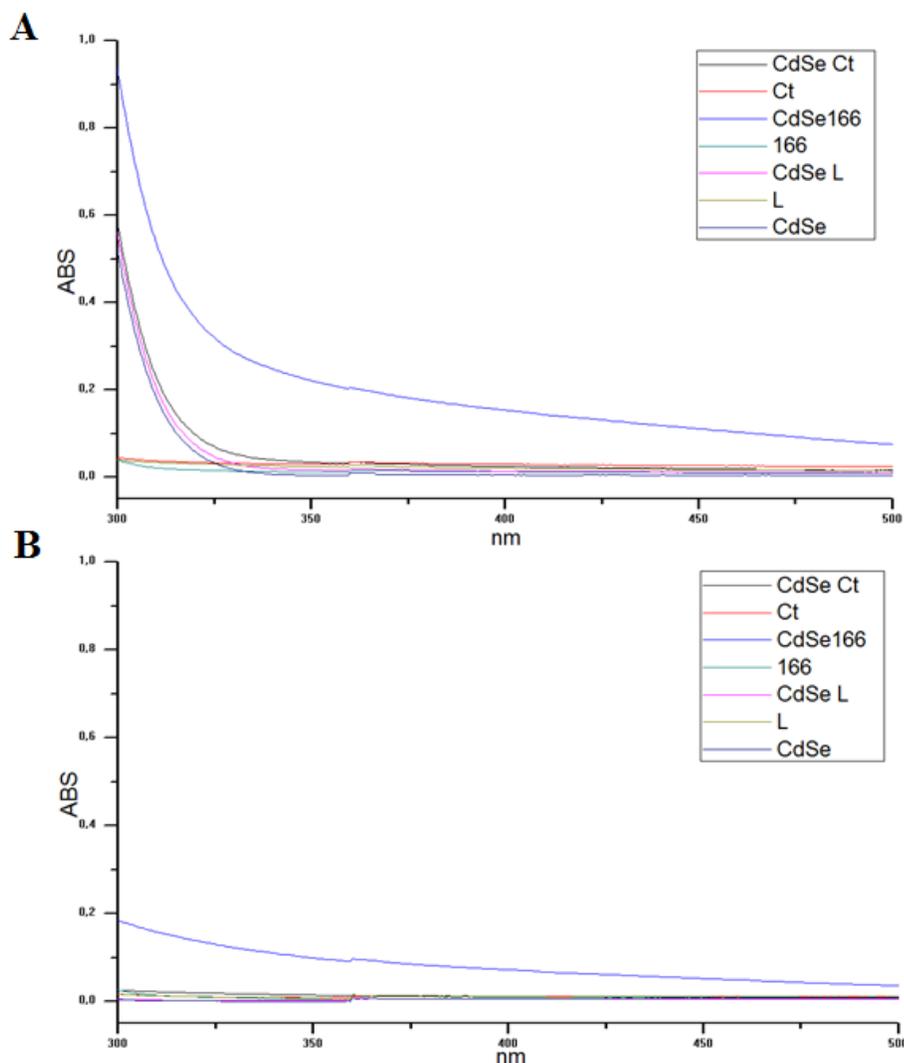
### 5.1 Síntesis de CdSe

Se realizó la síntesis de nanopartículas de CdSe en tres tipos de ferritina, en su forma Apo *C. tepidum* (Ct), mutante 166 de *C. tepidum* que carece de los últimos 38 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (166) y ferritina humana L (L), con el fin de comparar la síntesis en base a las diferencias estructurales de estas tres ferritinas. La relación molar utilizada fue de 3000:1 Cd/Ferritina y 8000:1 Se/Ferritina y se hizo en condiciones aeróbicas estabilizando los iones de  $\text{Cd}^{2+}$  en forma de cadmio acetato y formando en solución tetra iones con amonio adicionado en forma de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  40mM y  $\text{NH}_4\text{OH}$  5mM. Los iones de  $\text{Se}^{2-}$  fueron adicionados en forma de selenourea la cual se descompone lentamente en solución provisionando iones de forma progresiva. El orden de síntesis fue primero incorporar el cadmio en la cavidad y luego una vez cargada la proteína adicionar el selenio.

El primer experimento fue realizado en condiciones aeróbicas, la reacción produce un cambio de color a amarillo anaranjado a los pocos segundos de adicionada la selenourea. Luego de incubar toda la noche a temperatura ambiente el cambio se hace más evidente y ya una vez centrifugado es posible apreciar la presencia de diferentes precipitados y la pérdida parcial del color en las reacciones de CdSe en presencia de la proteína. En el caso del control sin proteína la pérdida del color es total y la tonalidad del precipitado es más oscuro y metálico que en las otras muestras. En la figura 9a es posible ver los espectros una vez llevada a cabo la reacción toda la noche a temperatura ambiente. Además de las reacciones en ferritina se realizaron controles con las proteínas solas y también sin la proteína participando de la reacción. Según los valores de absorbancia no hay síntesis de nanopartículas de CdSe en Ct ni en L ya que son idénticos a los controles con la proteína (Ct y L). El control sin proteína (CdSe), muestra valores elevados alrededor de los 300nm lo cual significa que se formaron partículas en solución. En el caso del mutante 166 de *C. tepidum* (CdSe166), es posible observar una elevación en los valores de absorbancia entre los 300 y 400nm que no se encuentra en los controles y que indica la aparición

de un nuevo compuesto en solución atribuible a la síntesis de nanopartículas de CdSe producto de la presencia de la proteína.

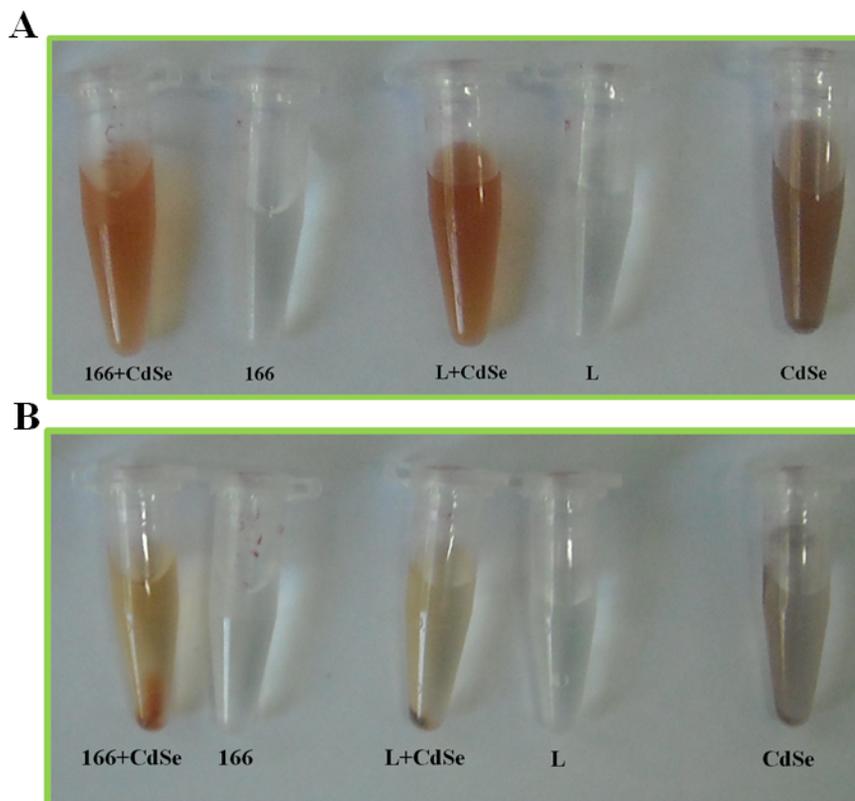
Luego de hecha la reacción las muestras fueron dializadas contra buffer MOPS 100mM pH 7 con el fin eliminar las nanopartículas formadas en el exterior de la cavidad de ferritina. Los resultados de los espectros de absorbancia obtenidos se muestran en la figura 9b. Al igual que en la figura 9a no se ven valores de absorbancia atribuibles a la formación de nanopartículas para Ct y para L. El control sin proteína (CdSe), ya no presenta los valores alrededor de los 300nm lo cual indica que el CdSe formado en la solución se perdió con la diálisis. En el caso del mutante 166 (CdSe166), los valores de absorbancia entre los 300 y 400nm siguen siendo superiores a los controles lo cual significa que las nanopartículas formadas por efecto de la proteína se encuentran en el interior de la cavidad de ferritina pero sufrieron una disminución lo cual significa que parte del CdSe formado no se encontraba dentro de la proteína y se perdió luego de la diálisis.



**Figura 9.** Síntesis de nanopartículas de CdSe en ferritina, espectros de absorbancia. **A**, síntesis de CdSe en Apoferritina de *C. tepidum* (Ct), mutante 166 de *C. tepidum* (166) y ferritina humana L (L) a una concentración de 0,5 $\mu$ M bajo condiciones aeróbicas. **B**, espectros tomados después de dializar contra buffer MOPS 100mM pH 7.

El segundo experimento fue realizado en condiciones anaeróbicas bajo atmósfera de  $N_2$ . Según los resultados del primer experimento se tomó la determinación de hacer la síntesis sólo en el mutante 166 de *C. tepidum* (166) y ferritina humana L (L). La concentración de proteína se elevó a 1 $\mu$ M manteniendo la relación molar con el cadmio y el selenio el resto de las condiciones se mantuvieron respecto al experimento anterior. Luego de realizada la síntesis se pudo observar el mismo comportamiento de cambio de color en las reacciones de CdSe más la proteína. Como

se puede observar en la figura 10a, el tono del color es amarillo anaranjado para 166+CdSe con pequeñas diferencias en la opacidad si lo comparamos con L+CdSe. En cambio el control sin proteína (CdSe), presenta un color oscuro diferente a las reacciones con proteína.

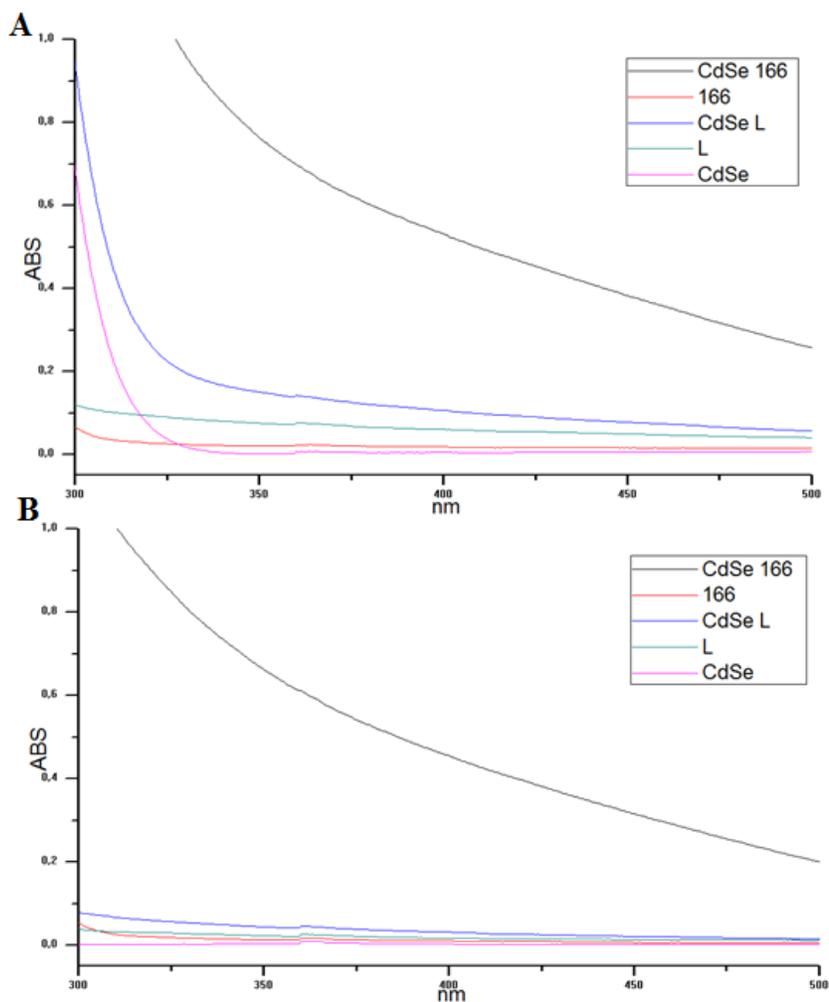


**Figura 10.** Síntesis de CdSe en Apoferritina bajo condiciones anaeróbicas. **A:** reacciones de síntesis y controles, de izquierda a derecha se encuentra la reacción hecha en la Ftn mutante 166 de *C. tepidum*, el control solo con la proteína, la reacción en ferritina humana L y el control de la reacción de CdSe sin ferritina. **B:** las mismas muestras luego de ser centrifugadas a 13.000 g por 10min.

Después de la centrifugación hay pérdida del color el cual resultó ser en gran medida precipitado ajeno a la síntesis en el interior de ferritina (Figura 10b). Aun así hubo retención del color en solución en la muestra de 166+CdSe y en mucho menor medida en L+CdSe, el color en el control sin proteína resultó ser solo precipitado adherido en las paredes del tubo.

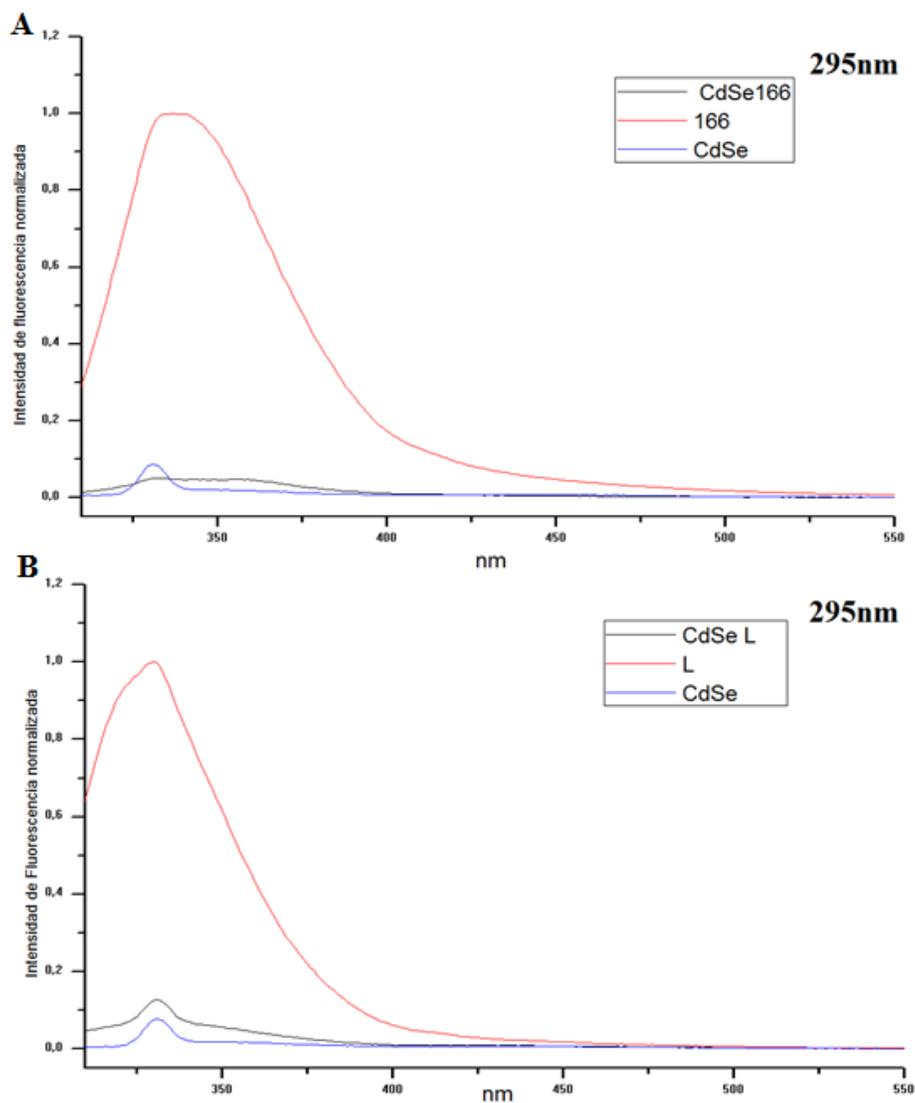
Después de la centrifugación se midieron los espectros de absorbancia a los sobrenadantes, en la figura 11a es posible observar que nuevamente la síntesis sólo se realizó en la mutante 166 de *C. tepidum*, esto según los valores de absorbancia elevados obtenidos entre los 300 y 400nm, que no están presente en el control solo con proteína de 166. En el caso de la reacción realizada en ferritina humana L los valores son similares al control solo con proteína salvo en el tramo entre los 300 y 350nm. Después de tomados los espectros las muestras fueron dializadas contra buffer MOPS 100mM pH7, para sacar toda partícula que se encuentre en el exterior de ferritina. En la figura 11b es posible observar que los valores entre 300 y 400 se mantuvieron casi iguales en la reacción realizada en la mutante 166 de *C. tepidum*, lo cual indica que todas las nanopartículas sintetizadas están en el interior de ferritina y no se perdieron con la diálisis. Todas las demás muestras presentan valores de absorbancia que indican la ausencia de cualquier tipo de compuesto absorbiendo entre los 300 y 500nm.

Por último, se tomaron los espectros de emisión a distintas longitudes de onda para ver la fluorescencia de las nanopartículas. Se decidió excitar a 310, 350 y 400nm que es donde se ve el aumento de absorbancia debido a la formación de nanopartículas en la cavidad del mutante 166 de *C. tepidum*. Además se excitó a 295nm que es el máximo de absorción de los triptófanos de las proteínas, con el fin de contrastar el efecto en la emisión de estos y la provocada por la presencia de las nanopartículas de CdSe en su interior. Se normalizaron los datos de los controles solo con proteína tomando el valor máximo como 1, los mismos valores máximos se utilizaron para normalizar las reacciones de CdSe + proteína y CdSe sólo.



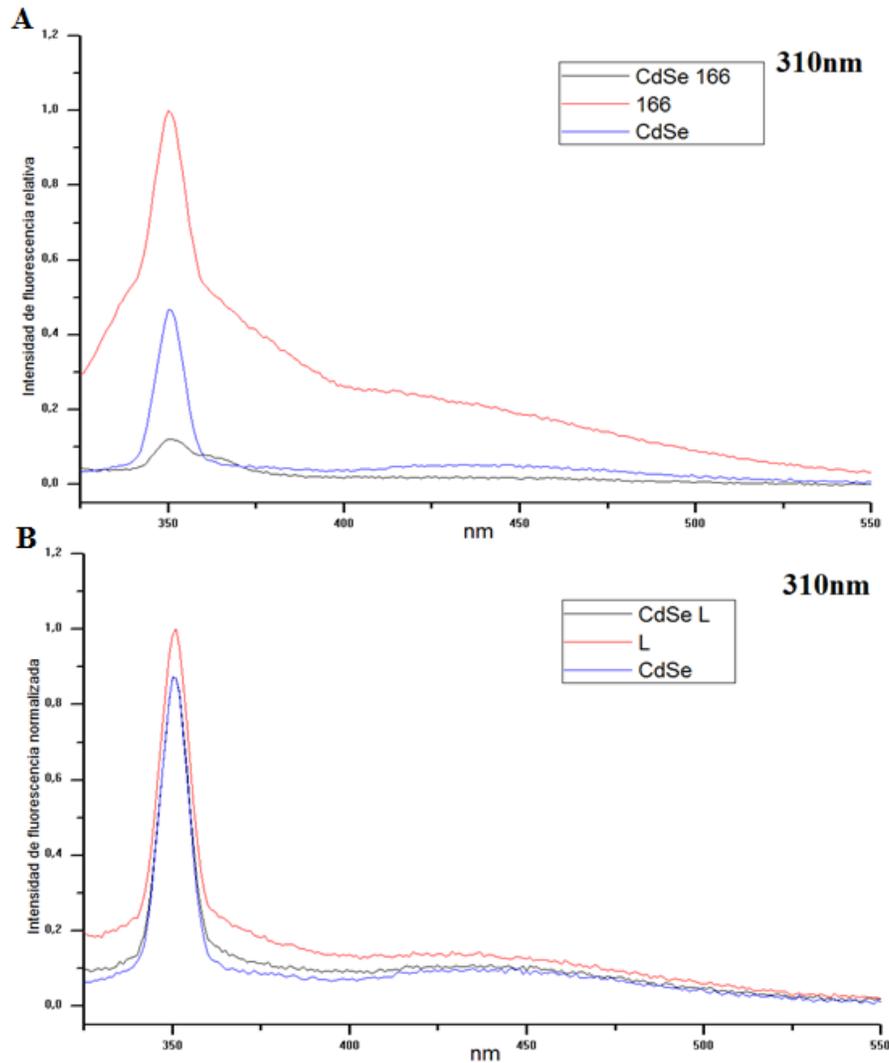
**Figura 11.** Síntesis de CdSe en ferritina, espectros de absorbancia. **A:** síntesis de CdSe en forma Apo de mutante 166 de *C. tepidum* y ferritina humana L a una concentración de 1 $\mu$ M bajo condiciones anaeróbicas en atmósfera de N<sub>2</sub>. **B:** espectros tomados después de dializar contra buffer MOPS 100mM pH 7.

La excitación a 295nm (Figura 12), produce una fuerte fluorescencia debido a los triptófanos de las proteínas cerca de los 350nm. En el caso del mutante 166 de *C. tepidum* es posible observar una curva pronunciada cercana a los 350nm que decae en la muestra de CdSe+166 lo cual podría indicar un apagamiento de la fluorescencia debido a la presencia de las nanopartículas. Este mismo fenómeno se puede observar en el caso de ferritina humana L, pero en este caso no podría ser debido a que L no tendría nanopartículas en su interior o si las tiene están en muy baja cantidad. Excitando a 350nm (figura 13), se repite la situación en la mutante 166 en cambio en ferritina humana L no se observan mayores diferencias entre las curvas de la



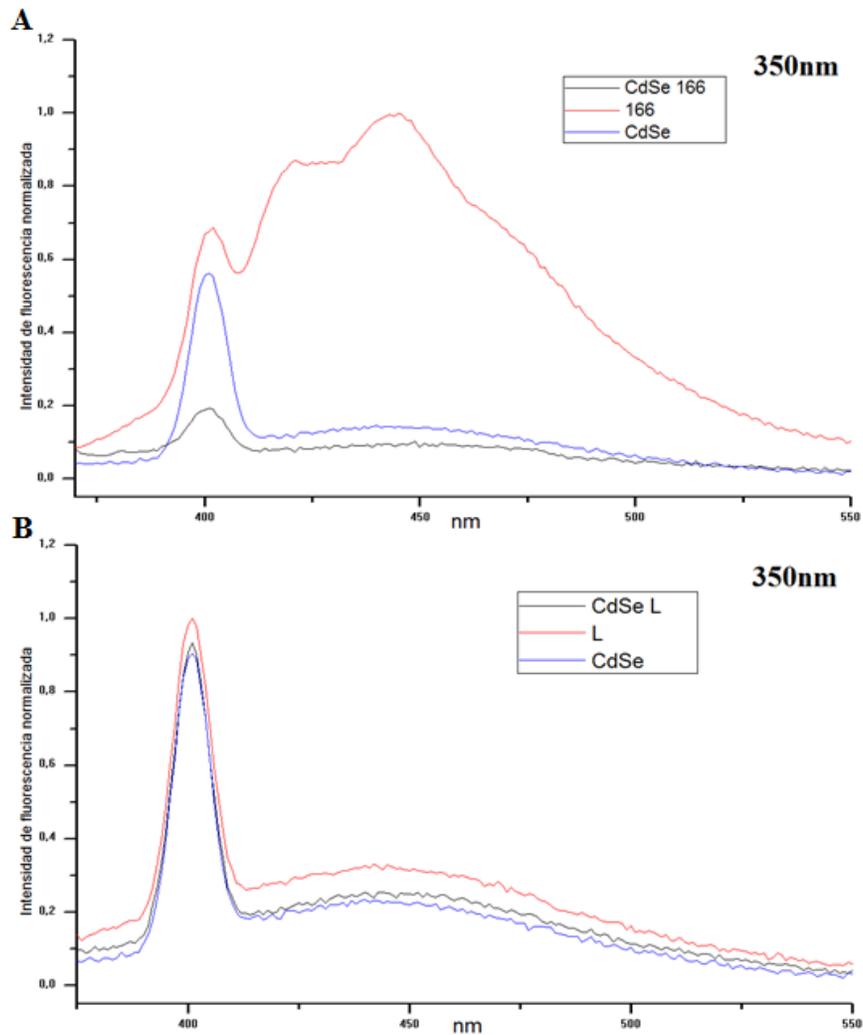
**Figura 12.** Síntesis de CdSe, espectros de emisión a 295nm. **A**, síntesis de CdSe en forma Apo de mutante 166 de *C. tepidum* a una concentración de 1uM bajo condiciones anaeróbicas en atmosfera de N<sub>2</sub>. **B**, síntesis de CdSe en forma Apo de ferritina humana L bajo las mismas condiciones.

reacción más proteína, la proteína sola y el control sin proteína. También es importante destacar que la forma de las curvas y sus peaks a 350 cambian su distribución haciéndose más estrecho lo cual puede indicar la excitación y apagamiento de otras moléculas en la muestra.



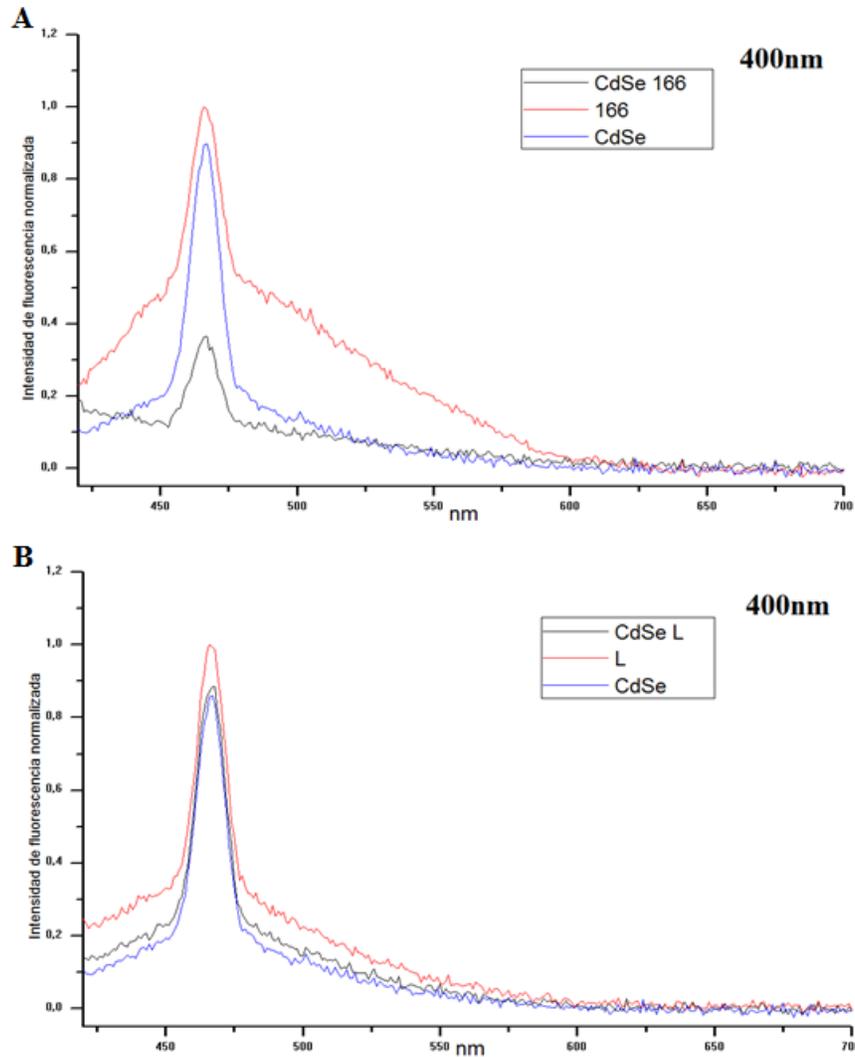
**Figura 13.** Síntesis de CdSe, espectros de emisión a 310nm. **A:** síntesis de CdSe en forma Apo de mutante 166 de *C. tepidum* a una concentración de 1uM bajo condiciones anaeróbicas en atmósfera de N<sub>2</sub>. **B:** síntesis de CdSe en forma Apo de ferritina humana L bajo las mismas condiciones.

Excitando a 350nm (figura14) que era el máximo de las nanopartículas en los espectros de absorbancia, se mantiene el mismo fenómeno de apagamiento de la fluorescencia de la proteína en la mutante 166 (figura14a). A esta longitud de onda no deberían estar siendo excitados los triptófanos de la proteína, sin embargo el decaimiento en la muestra CdSe+166 se ve igual salvo



**Figura 14.** Síntesis de CdSe, espectros de emisión a 350nm. **A:** síntesis de CdSe en forma Apo de mutante 166 de *C. tepidum* a una concentración de 1uM bajo condiciones anaeróbicas en atmosfera de  $N_2$ . **B:** síntesis de CdSe en forma Apo de ferritina humana L bajo las mismas condiciones.

por la distribución del peak que es mas amplia yendo desde los 400nm con un máximo a 450 y un decaimiento a los 550. Dentro de estos valores pueden encontrarse peaks de fluorescencia únicos que son ocultados en el conjunto total de los datos como un “hombro” de fluorescencia a los 400nm que también funciona bajo el mismo fenómeno de apagamiento que el resto del peak. Nuevamente no hay diferencias en CdSe+L, L y CdSe solo (Figura 14b).



**Figura 15.** Síntesis de CdSe, espectros de emisión a 400nm. **A:** síntesis de CdSe en forma Apo de mutante 166 de *C. tepidum* a una concentración de 1 $\mu$ M bajo condiciones anaeróbicas en atmosfera de N<sub>2</sub>. **B:** síntesis de CdSe en forma Apo de ferritina humana L bajo las mismas condiciones.

A 400nm (figura 15), podemos observar que nuevamente hay un fenómeno de apagamiento si comparamos CdSe+166 y 166 sólo (figura 15a), sin embargo el peak es mas estrecho que a 350nm. En el caso de ferritina humana L (figura15b), los valores son casi iguales para todas las muestras.

## 6. DISCUSIÓN

El ion de  $\text{Cd}^{2+}$  reacciona rápidamente con  $\text{Se}^{2-}$  provocando la formación de agregados de CdSe en la solución acuosa. Es por esto que se estabilizó la reacción, dando las condiciones para que los iones no agreguen entre sí hasta que se encuentren en el interior de ferritina. Esto se realizó estabilizando los iones de  $\text{Cd}^{2+}$  con iones amonio formando el tetra ion  $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  del cual se desprenden los iones de cadmio al interior de ferritina. El selenio por su parte se adicionó en la forma de selenourea la cual se degrada lentamente en solución acuosa liberando los iones de selenio de forma progresiva a la cavidad. Según experimentos de síntesis de PC de ZnSe en ferritina de caballo, realizados por Iwahori *et al.*, (2005), el zinc debe ser primero incubado con ferritina y luego adicionado el selenio para que reaccionen en el interior, ya que pruebas realizadas en el orden inverso arrojaron como resultado una pobre formación de ZnSe. Esto puede deberse a que, para que se incorpore el  $\text{Se}^{2-}$  debe existir un potencial electrostático en el interior de la cavidad que es otorgado por la saturación de esta con iones de  $\text{Zn}^{2+}$  de esta forma los iones positivos son concentrados producto del potencial electrostático producido por los residuos negativos en el interior de ferritina. Un caso similar podría estar ocurriendo con los iones de  $\text{Cd}^{2+}$  que poseen una carga similar a los iones de  $\text{Zn}^{2+}$ . Los iones en estudios de formación de PC en ferritina se proponen que entran por los canales de 3 pliegues o en su defecto por canales que debieran ser de carácter hidrofílico (Iwahori *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2009).

En el mismo estudio realizado por Iwahori *et al.*, (2005), se analizó de qué manera los componentes involucrados en la biomineralización afectan la síntesis de ZnSe en Apoferritina de caballo. Teóricamente los componentes que participarían de forma importante serían primero, la existencia de las subunidades H y L, esto vinculado a la presencia del centro ferroxidasa en la subunidad H, segundo la presencia de aminoácidos cargados negativamente que serían Asp-131 y Glu-134 en las inmediaciones del canal de 3 pliegues y los aminoácidos negativos Glu-58, Glu-61, y Glu-64 en la cara interna de la cavidad que funcionarían como sitios de nucleación y que se encuentran altamente conservados en mamíferos. Según experimentos con mutantes de ferritina humana L, la ausencia del centro ferroxidasa disminuyó en un 50% la síntesis de ZnSe (Iwahori *et al.*, 2005), en comparación a ferritina con la subunidad H y L lo cual indica aunque no se sabe

bien de qué manera la ausencia del centro ferroxidasa podría afectar la incorporación del  $Zn^{2+}$  al interior de ferritina esto podría también aplicarse al caso de la síntesis de CdSe realizada en este trabajo donde no hubo aparición de ABS atribuible a la formación de nanopartículas en la cavidad de ferritina humana L. Otro punto a considerar es la importancia del potencial electrostático el cual según el mismo estudio de Iwahori *et al*, (2005) afecta la incorporación de iones de  $Zn^{2+}$ . Ellos realizaron pruebas de síntesis de ZnSe en diferentes mutantes de ferritina L donde cambiaron los aminoácidos negativos que rodean el canal de 3 pliegues por aminoácidos neutros y además los aminoácidos glutámicos en el interior de la cavidad por aminoácidos positivos resultando en una baja absoluta de la formación de ZnSe en el interior de ferritina. El cambio de los aminoácidos negativos del canal de 3 pliegues provocaría que los iones positivos de  $Zn^{2+}$  no sean atraídos hacia el canal y por tanto no se lleve a cabo la síntesis de ZnSe de manera eficiente, del mismo modo la ausencia de los aminoácidos negativos en la superficie de la cavidad de ferritina y mas aun su remplazo por aminoácidos positivos generaría un potencial electrostático en contra de la acumulación de  $Zn^{2+}$ . Esto podría explicar la incapacidad de formar CdSe, la cual también depende de la entrada inicial de los iones positivos de  $Cd^{2+}$  a la cavidad, para el caso de la síntesis en ferritina de *C. tepidum* (figura 9). Esto se explicaría ya que en estudios recientes de Yévenes *et al*, (2011), se mostró por un modelo de homología que la estructura de ferritina de *C. tepidum* presenta a diferencia de otras ferritinas una cola con His en su extremo carboxilo terminal, las cuales apuntarían hacia el interior de la cavidad, esto produciría que la carga interna de la proteína baje el rendimiento en la incorporación de los  $Cd^{2+}$ , y explicaría el hecho de que no se pudiera sintetizar CdSe en su interior.

El caso contrario ocurrió en el mutante 166 de *C. tepidum*, donde la síntesis de CdSe se puede observar en los valores elevados de ABS entre los 300 y 400nm (figura 10), esto apoyaría la propuesta de que el interior negativo de la cavidad es fundamental para el ingreso de los iones de  $Cd^{2+}$  y por ende la posterior formación de CdSe. Las diferencias encontradas entre esta ferritina y la humana L podrían explicarse a su vez por la ausencia del centro ferroxidasa que podría estar jugando un papel importante en la etapa inicial de formación de CdSe, esto no ocurrirá en el mutante 166 ya que en si ferritina de *C. tepidum*, posee los aminoácidos esenciales que conforman el centro ferroxidasa (Yévenes *et al*, 2011).

En el caso de los resultados de fluorescencia existe la posibilidad que las nanopartículas formadas en el interior del mutante 166 de *C. tepidum*, estén apagando la emisión de los triptófanos de la proteína cuando se excita a 295nm (figura 12). Sin embargo, el fenómeno también se repite a 310nm (figura 13), 350 (figura 14), y 400nm (figura 15), donde ya la proteína no está emitiendo lo cual anula la posibilidad de sacar algún tipo de conclusión al respecto. Por lo tanto no se detectó fluorescencia a pesar de que en los gráficos de espectro de ABS (figura 10), el mutante 166 de *C. tepidum*, sí presentó valores atribuibles a la formación de nanopartículas de CdSe en el interior de ferritina. Esto puede deberse a la forma de la nanopartícula ya que para que los PC emitan fluorescencia deben tener una conformación determinada, dicho en otras palabras, se necesita que el nanocrystal en efecto sea un cristal. Se ha comprobado que en algunos casos la temperatura puede modular la cristalinidad de la nanopartícula formada en el interior de ferritina. En un estudio de Douglas *et al.*, (2000), realizando incorporación de cobalto en Apoferritina de caballo descubrió haciendo análisis de difracción de electrones que indican que a 65°C se sintetizaron  $\text{Co}_3\text{O}_4$  con forma cristalina mientras que a 23°C se encontró la formación de núcleos amorfos de  $\text{Co(O)OH}$ . Esto podría explicar la ausencia de fluorescencia de los nanocristales de CdSe en el interior del mutante 166 de *C. tepidum*, los cuales probablemente no tienen la forma adecuada para emitir. Sería interesante probar entonces, la síntesis bajo diferentes condiciones de temperatura y combinarlo con el análisis estructural de la forma que poseen los nanocristales de CdSe formados, lo cual permitiría ver si realmente el cambio de temperatura influye en la forma del nanocrystal y por ende en su capacidad de emisión.

## 7. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de CdSe en la cavidad de un mutante de ferritina de *C. tepidum*, sin los últimos 38 aminoácidos del extremo carboxilo terminal los cuales impedían la entrada del Cd<sup>2+</sup> en la proteína salvaje de *C. tepidum*. Estos aminoácidos poseen una carga positiva, alterando el potencial electrostático necesario para que los iones positivos de Cd<sup>2+</sup> se concentraran en el interior de ferritina. Paralelamente, no se logró la síntesis de CdSe en ferritina humana L lo cual podría significar que el centro ferroxidasa es de alguna forma importante para la formación de CdSe en su interior.

Finalmente, los nanocristales de CdSe formados en la cavidad del mutante 166 de *C. tepidum*, no presentaron fluorescencia, lo cual podría deberse a que estos no tienen la forma cristalina que les permite emitir fluorescencia. Se recomienda para futuras investigaciones probar la síntesis de nanopartículas bajo distintas condiciones de temperatura o pH, en conjunto con análisis estructurales de los nanocristales obtenidos.

## 8. RESUMEN

Ferritina es una proteína multimérica semiesférica conformada por 24 subunidades y que en su interior posee una cavidad la cual almacena hierro. El proceso de incorporación del hierro varía dependiendo del tipo de ferritina y puede utilizar canales en la superficie de la proteína, sitios ferroxidasa y sitios de nucleación. Estas propiedades han sido utilizadas para la síntesis *in vitro* de una gran variedad de nanopartículas entre ellas los puntos cuánticos. Estos son nanocristales semiconductores con alta eficiencia cuántica y de gran interés en aplicaciones electrónicas y de fluorescencia. Se realizó la síntesis de nanopartículas de CdSe en el interior de 3 diferentes ferritinas para evaluar el efecto de diferencias estructurales en la formación de CdSe. Se utilizó ferritina del procarionte *C. tepidum*, un mutante de este mismo sin los últimos 38aa del C terminal y además ferritina humana L. Las síntesis se realizó mediante un sistema de reacción lenta donde los iones de  $\text{Cd}^{2+}$  son estabilizados en solución con amonio en la forma del tetra ion  $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  el cual proporciona los iones de Cadmio a la cavidad. Luego de la carga con  $\text{Cd}^{2+}$  los iones de  $\text{Se}^{2-}$  son liberados lentamente por selenourea. Se logró la síntesis de nanocristales de CdSe en el mutante de *C. tepidum*, el cual no poseía los aminoácidos positivos en el extremo C terminal que recubren el interior de la cavidad en la forma salvaje de ferritina de *C. tepidum*. Corroborando que es necesario que la cavidad de ferritina tenga un carácter negativo para su carga con iones  $\text{Cd}^{2+}$ , que posteriormente generaran un potencial electrostático que permita la entrada de  $\text{Se}^{2-}$ . No se logró la síntesis en ferritina humana probablemente por la ausencia del centro ferroxidasa el cual podría estar participando en alguna etapa de la incorporación de iones. Los nanocristales obtenidos no fueron fluorescentes pero esto puede deberse a un problema de la cristalinidad de la forma de la nanopartícula que no es fluorescente, es por esto que se propone la futura síntesis de CdSe bajo distintas condiciones de temperatura la cual podría estar afectando la forma del cristal.

## 9. SUMMARY

Ferritin is a multimeric and hemispherical protein composed of 24 subunits and inside it has a cavity which stores iron. The process of incorporation of iron varies with the type of ferritin and can be used channels on the surface of the protein, ferroxidase sites and sites of nucleation. These properties have been used for in vitro synthesis of a variety of nanoparticles including quantum dots. These are semiconductor nanocrystals with high quantum efficiency and strong interest in electronic and fluorescence. Synthesis of CdSe nanoparticles was performed within 3 different ferritins, for evaluating the effect of structural differences on the formation of CdSe. Prokaryote ferritin from *C. tepidum*, a mutant of the same without the last 38aa of C-terminal, and human L chain was used. The synthesis was performed by a slow reaction system, where  $\text{Cd}^{2+}$  ions are stabilized in solution in the form of ammonium tetra ion  $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  which provides the cadmium into the cavity. After loading with  $\text{Cd}^{2+}$ , ions of  $\text{Se}^{2-}$  are slowly released by decomposition of selenourea. Synthesis CdSe nanocrystals was achieved in the mutant of *C. tepidum*, which had no positive amino acids at the C-terminal that line the inside of the cavity in the wild-type of *C. tepidum*. Thus, it is necessary that the cavity of ferritin have a negative character for loading of  $\text{Cd}^{2+}$  ions, which then generate an electrostatic potential that allows the entry of  $\text{Se}^{2-}$ . No achievement in human ferritin synthesis is likely due to the absence of the ferroxidase center, which could be involved at some stage in the incorporation of ions. The obtained nanocrystals were not fluorescent but this may be a problem of crystallinity, the shape of the nanoparticle is not fluorescent, which is why we propose the future synthesis of CdSe under different temperature conditions which may be affecting the crystal form.

## 10. LITERATURA CITADA

**Abdul-Tehrani H**, A.J.Hudson, Y.S. Chang, A.R. Timms, C.Hawkins, J.M.Williams, P.M. Harrison, J.R.Guest, S.C.Andrews, Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 1415–1428.

**Aisen P**, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 940–959.

**Akerman M**, Chan W, Laakkonen P, Bhatia S, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:12617–21.

**Aldana J**, Y. A.Wang and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 8844

**Andrews S.C**, Iron storage in bacteria, *Adv. Microbiol. Physiol.* 40 (1998) 281–351.

**Andrews S.C**, A.K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 215–237.

**Arosio P**, Ingrassia R, Cavadini P (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* 1790(7):589–599. doi:10.1016/j.bbagen.2008.09.004.

**Baaghil S**, A. Lewin, G.R. Moore, N.E. Le Brun, Core formation in *Escherichia coli* bacterioferritin requires a functional ferroxidase center, *Biochemistry* 42 (2003) 14047–14056.

**Bauminger E.R**, A. Treffry, M.A. Quail, Z.W. Zhao, I. Nowik, P.M. Harrison, Stages in iron storage in the ferritin of *Escherichia coli* (EcFtnA): analysis of Mössbauer spectra reveals a new intermediate, *Biochemistry* 38 (1999) 7791–7802.

**Bauminger E.R**, A. Treffry, M.A. Quail, Z.W. Zhao, I. Nowik, P.M. Harrison, Metal binding at the active centre of the ferritin of *Escherichia coli* (EcFtnA). A Mössbauer spectroscopic study, *Inorg. Chim. Acta* 297 (2000) 171–180.

**Bostick RM**, Kong KY, Ahearn TU, Chaudry Q, Cohen V, Wang MD. Detecting and quantifying biomarkers of risk for colorectal cancer using quantum dots and novel image analysis algorithms. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:3313–6.

**Bou-Abdallah F**, A.C. Lewin, N.E. Le Brun, G.R. Moore, N.D. Chasteen, Iron detoxification properties of *Escherichia coli* bacterioferritin—attenuation of oxyradical chemistry, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37064–37069.

**Bou-Abdallah F**, G.H. Zhao, H.R. Mayne, P. Arosio, N.D. Chasteen, Origin of the unusual kinetics of iron deposition in human H-chain ferritin, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 3885–3893.

**Bou-Abdallah, F.** (2010). The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(8), 719-31. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.021

**Bruchez Jr M,** Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998;281:2013–6.

**Byers RJ,** Di Vizio D, O'Connell F, Tholouli E, Levenson RM, Gossage K, Twomey D, Yang Y, Benedettini E, Rose J, Ligon KL, Finn SP, Golub TR, Loda M. Semiautomated multiplexed quantum dot-based in situ hybridization and spectral deconvolution. *J Mol Diagn* 2007;9:20–9.

**Carrondo M.A,** Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint, *EMBO J.* 22 (2003) 1959–1968.

**Chalmers NI,** Palmer Jr RJ, Du-Thumm L, Sullivan R, Shi W, Kolenbrander PE. Use of quantum dot luminescent probes to achieve single-cell resolution of human oral bacteria in biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:630–6.

**Chan WC,** Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998;281:2016–8.

**Chan WC,** D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han and S. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 40

**Chan P,** Yuen T, Ruf F, Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC. Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e161.

**Chasteen N.D,** Ferritin. Uptake, storage, and release of iron, *Met. Ions Biol. Syst.* Vol 35 (1998) 479–514.

**Chasteen N.D,** P.M. Harrison, Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage, *J. Struct. Biol.* 126 (1999) 182–194.

**Cheesman M.R,** N.E. Le Brun, F.H.A. Kadir, A.J. Thomson, G.R. Moore, S.C. Andrews, J.R. Guest, P.M. Harrison, J.M.A. Smith, S.J. Yewdall, Haem and non-haem iron sites in *Escherichia coli* bacterioferritin: spectroscopic and model building studies, *Biochem. J.* 292 (1993) 477-456.

**Cho K.J,** H.J. Shin, J.H. Lee, K.J. Kim, S.S. Park, Y. Lee, C. Lee, K.H. Kim, The crystal structure of ferritin from *Helicobacter pylori* reveals unusual conformational changes for iron uptake, *J. Mol. Biol.* 390 (2009) 83–98.

**Crichton R.R,** *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism from Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*, 3rd Ed., John Wiley and Sons, Chichester, 2009, pp. 183–222.

**Crichton R.R,** J.-P. Declercq. X-ray structures of Ferritins and related proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (2010) 706–718

**Crow A**, T.L. Lawson, A. Lewin, G.R. Moore, N.E. Le Brun, Structural basis for iron mineralisation by bacterioferritin, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 6808–6813.

**Dabbousi B**, Rodriguez-Viejo J, Mikulec F, Heine J, Mattoussi H, Ober R, et al. ((CdSe)/ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem* 1997;101:9463–75.

**Dahan M**, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003;302:442–5.

**Douglas T**, D.R. Ripoll, Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin, *Protein Sci.* 7 (1998) 1083–1091.

**Douglas T** and Stark V.T (2000). *Inorg. Chem* 39, 1828.

**Dubertret B**, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber, *Science*, 2002, 298, 1759.

**Fontaine TJ**, Wincovitch SM, Geho DH, Garfield SH, Pittaluga S. Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots. *ModPathol* 2006;19:1181–91.

**Frolow F**, A.J. Kalb, J. Yariv, Location of haem in bacterioferritin of *E. coli*, *Acta Crystallogr.* D49 (1993) 597–600.

**Frolow F**, A.J. Kalb, J. Yariv, Structure of a unique twofold symmetrical heme- binding site, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 453–460.

**Gao X**, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 969.

**Gómez D.E**, I. Pastoriza-Santos and P. Mulvaney, *Small*, 2005, 1, 238.

**Grossman M.J**, S.M. Hinton, V. Minak-Bernero, C. Slaughter, E.I. Stiefel, Unification of the ferritin family of proteins, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 2419–2423.

**Guo W**, J.J. Li, Y. A. Wang and X. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, 15, 3125.

**Gupta V**, R.K. Gupta, G. Khare, D.M. Salunke, A.K. Tyagi, Crystal structure of BfrA from *Mycobacterium tuberculosis*: incorporation of selenomethionine results in cleavage and demetallation of haem, *Plos One* 4 (2009)

**Harrison P.M**, P. Arosio, Ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1275 (1996) 161–203.

**Hudson A.J**, S.C. Andrews, C. Hawkins, J.M. Williams, M. Izuhara, F.C. Meldrum, S. Mann, P.M. Harrison, J.R. Guest, Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin, *Eur. J. Biochem.* 218 (1993) 985–995.

**Iwahori, K.**, Yoshizawa, K., Muraoka, M., & Yamashita, I. (2005). Fabrication of ZnSe nanoparticles in the apoferritin cavity by designing a slow chemical reaction system. *Inorganic chemistry*, 44(18), 6393-400. doi:10.1021/ic0502426

**Iwahori, K.**, Morioka, T., & Yamashita, I. (2006). The optimization of CdSe nanoparticles synthesis in the apoferritin cavity. *Physica Status Solidi (a)*, 203(11), 2658-2661. doi:10.1002/pssa.200669531

**Jameson G.N.L.**, W. Jin, C. Krebs, A.S. Perreira, P. Tavares, X.F. Liu, E.C. Theil, B.H. Huynh, Stoichiometric production of hydrogen peroxide and parallel formation of ferricmultimers through decay of the diferric-peroxo complex, the first detectable intermediate in ferritin mineralization, *Biochemistry* 41 (2002) 13435–13443.

**Johnson E.**, D. Cascio, M.R. Sawaya, M. Gingery, I. Schroder, Crystal structures of a tetrahedral open pore ferritin from the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Struct. Fold. Des.* 13 (2005) 637–648.

**Kim S. and Bawendi M.G.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14652.

**Kim S.**, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Laurence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* 2004;22:93–7.

**Kobayashi H.**, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Regino CA, Urano Y, Choyke PL. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett* 2007;7:1711–6.

**Lawson DM.**, Treffry A, Artymiuk PJ, Harrison PM, Yewdall SJ, Luzzago A, Cesareni G, Levi S, Arosio P (1989) Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett* 254(1–2):207–210

**Lawson DM.**, Artymiuk PJ, Yewdall SJ, Smith JM, Livingstone JC, Treffry A, Luzzago A, Levi S, Arosio P, Cesareni G et al (1991) Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* 349(6309):541–544. doi:10.1038/349541a0

**Leatherdale C.**, Woo W, Miculec F, MG B. On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots. *J Phys Chem* 2002;106:7619–22.

**Lidke DS.**, Nagy P, Heintzmann R, Arndt-Jovin DJ, Post JN, Grecco HE, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 2004;22:198–203.

**Le Brun N.E.**, M.T. Wilson, S.C. Andrews, J.R. Guest, P.M. Harrison, A.J. Thomson, G. R. Moore, Kinetic and structural characterization of an intermediate in the biomineralization of Bacterioferritin, *FEBS Lett.* 333 (1993) 197–202.

**Le Brun N.E.**, S.C. Andrews, J.R. Guest, P.M. Harrison, G.R. Moore, A.J. Thomson, Identification of the ferroxidase centre of *Escherichia coli* bacterioferritin, *Biochem. J.* 312 (1995) 385–392.

**Le Brun, N. E.**, Crow, A., Murphy, M. E. P., Mauk, a G., & Moore, G. R. (2010). Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(8), 732-44. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.002

**Lewinski N**, V. Colvin and R. Drezek, *Small*, 2008, 4, 26.

**Liu H.L.**, H.N. Zhou, W.M. Xing, H.F. Zhao, S.X. Li, J.F. Huang, R.C. Bi, 2.6 angstrom resolution crystal structure of the bacterioferritin from *Azotobacter vinelandii*, *FEBS Lett.* 573 (2004) 93–98.

**Macedo S**, C.V. Romao, E. Mitchell, P.M. Matias, M.Y. Liu, A.V. Xavier, J. LeGall, M. Teixeira, P. Lindley, M.A. Carrondo, The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*, *Nat. Struct. Biol.* 10(2003)285–290.

**Medintz I.L.**, H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi, *Nat. Mater.*, 2005, 4, 435.

**Murray CB**, Norris DJ, Bawendi MG. Synthesis and characterisation of nearly monodispersed CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* 1993;115:8706–15.

**Ornberg RL**, Liu H. Immunofluorescent labeling of proteins in cultured cells with quantum dot secondary antibody conjugates. *Methods Mol Biol* 2007;374:3–10.

**Pathak S**, Choi SK, Arnheim N, Thompson ME. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *J Am Chem Soc* 2001;123:4103–4.

**Peng XG**, Wickham J, Alivisatos AP. Kinetics of II-VI and II-V colloidal semiconductor nanocrystal growth – focusing of size distributions. *J Am Chem Soc* 1998;120:5343–4.

**Peng X**, Manna L, Yang W, Wickham J, Scher E, Kadavanich A, Alivisatos AP. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* 2000;404:59–61.

**Peng ZA**, Peng X. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *J Am Chem Soc* 2001;123:183–4.

**Santambrogio P**, Levi S, Cozzi A, Corsi B, Arosio P (1996) Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *Biochem J* 314(Pt 1):139–144

**Schmidt ME**, Blanton SA, Hines MA, Guyot-Sionnest P. Size-dependent two-photon excitation spectroscopy of CdSe nanocrystals. *Phys Rev B Condens Matter* 1996;53:12629–32.

**Shen J**, Xu F, Jiang H, Wang Z, Tong J, Guo P, Ding S. Characterization and application of quantum dot nanocrystal- monoclonal antibody conjugates for the determination of sulfamethazine in milk by fluoroimmunoassay. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:2243–50.

**Soltész EG**, Kim S, Laurence RG, DeGrand AM, Parungo CP, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV, Mihaljevic T. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann Thorac Surg* 2005;79:269–77, discussion 269-77.

**Stillman T.J**, P.D. Hempstead, P.J. Artymiuk, S.C. Andrews, A.J. Hudson, A. Treffry, J.R. Guest, P.M. Harrison, The high-resolution X-ray crystallographic structure of the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*; comparison with human H ferritin (HuHF) and the structures of the Fe<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup> derivatives, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 587–603.

**Swartz L**, M. Kuchinskas, H.Y. Li, T.L. Poulos, W.N. Lanzilotta, Redox-dependent structural changes in the *Azotobacter vinelandii* bacterioferritin: new insights into the ferroxidase and iron transport mechanism, *Biochemistry* 45(2006)4421–4428.

**Swift, J.**, Butts, C. a, Cheung-Lau, J., Yerubandi, V., & Dmochowski, I. J. (2009). Efficient self-assembly of *Archaeoglobus fulgidus* ferritin around metallic cores. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 25(9), 5219-25. doi:10.1021/la8040743

**Tatur J**, W.R. Hagen, P.M. Matias, Crystal structure of the ferritin from the hyperthermophilic archaeal anaerobe *Pyrococcus furiosus*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 615–630.

**Theil E.C**, The ferritin family of iron storage proteins, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63 (1990) 421–449.

**Theil E.C**, M. Matzapetakis, X.F. Liu, Ferritins: iron/oxygen biominerals in protein nanocages, *J. Biol. Inorg. Chem.* 11 (2006) 803–810.

**Theil E.C**, Liu XS, Tosha T (2008) Gated pores in the ferritin protein nanocage. *Inorganica Chim Acta* 361(4):868–874. doi:10.1016/j.ica.2007.08.025

**Tosha T**, Nh H-L, Bhatassali O, Alber T, Theil EC: Moving metal ions through ferritin protein nanocages from the three-fold pores to catalytic sites. *J Am Chem Soc* 2010, 132:14562-14569.

**Tholouli E**, Sweeney E, Barrow E, Clay V, Hoyland JA, Byers RJ. Quantum dots light up pathology. *J Pathol* 2008;216:275–85.

**Treffry A**, P.M. Harrison, Incorporation and release of inorganic-phosphate in horse spleen ferritin, *Biochem. J.* 171 (1978) 313e320.

**Treffry A**, Z.W. Zhao, M.A. Quail, J.R. Guest, P.M. Harrison, The use of zinc(II) to probe iron binding and oxidation by the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 3 (1998a) 682–688.

**Treffry A**, Z.W. Zhao, M.A. Quail, J.R. Guest, P.M. Harrison, How the presence of three iron binding sites affects the iron storage function of the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 432 (1998b) 213–218.

**Turyanska, L.**, Bradshaw, T. D., Sharpe, J., Li, M., Mann, S., Thomas, N. R., & Patanè, A. (2009). The biocompatibility of apoferritin-encapsulated PbS quantum dots. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 5(15), 1738-41. doi:10.1002/sml.200900017

**Uchida M**, M.T.Klem, M.Allen, P. Suci, M.Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young and T. Douglas, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 1025

**Ueno T**, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 2527.

**Velayudhan J**, M.Castor, A.Richardson, K.L.Main-Hester, F.C. Fang, The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin Bin iron-sulphur cluster repair and virulence, *Mol. Microbiol.* 63 (2007) 1495–1507.

**Waldo G.S**, E.C. Theil, Formation of iron(III)-tyrosinate is the fastest reaction observed in ferritin, *Biochemistry* 32 (1993) 13262–13269.

**Wardeska J.G**, B. Viglione, N.D. Chasteen, Metal ion complexes of apoferritin. Evidence for initial binding in the hydrophilic channels, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6677–6683.

**Watt G.D**, R.B. Frankel, D. Jacobs, H.Q. Huang, Fe<sup>2+</sup> and phosphate interactions in bacterial ferritin from *Azotobacter vinelandii*, *Biochemistry* 31 (1992) 5672–5679.

**Watt R. K**, Hilton RJ, Graff DM (2010) Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta* 1800(8):745–759

**Watt, R. K. (2011)**. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 24(3), 489-500. doi:10.1007/s10534-011-9415-8

**Wei Q**, Lee M, Yu X, Lee EK, Seong GH, Choo J, Cho YW. Development of an open sandwich fluoroimmunoassay based on fluorescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 2006;358:31–7.

**Wilson WL**, Szajowski PF, Brus LE. Quantum Confinement in Size-Selected, Surface-Oxidized Silicon Nanocrystals. *Science* 1993;262:1242–4.

**Weeratunga S.K**, C.E. Gee, S. Lovell, Y. Zeng, C.L. Woodin, M. Rivera, Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apobacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediation of electron delivery and mobilization of core mineral iron, *Biochemistry* 48 (2009) 7420–7431.

**Wu X**, Liu H, Liu J, HaleyKN, Treadway JA, Larson JP, GeN, PealeF, BruchezMP. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003;21:41–6.

**Wu Y**, Campos SK, Lopez GP, Ozbun MA, Sklar LA, Buranda T. The development of quantum dot calibration beads and quantitative multicolor bioassays in flow cytometry and microscopy. *Anal Biochem* 2007;364:180–92.

**Xing R**, Wang, X., Yan, L., Zhang, C., Yang, Z., Wang, X., & Guo, Z. (2009). Fabrication of water soluble and biocompatible CdSe nanoparticles in apoferritin with the aid of EDTA. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (10), 1710-3. doi:10.1039/b900256c

**Xing R**, Wang, X., Yan, L., Zhang, C., Yang, Z., Wang, X., & Guo, Z. (2009). Fabrication of water soluble and biocompatible CdSe nanoparticles in apoferritin with the aid of EDTA. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (10), 1710-3. doi:10.1039/b900256c

**Xing Y**, Chaudry Q, Shen C, Kong KY, Zhau HE, Chung LW, Petros JA, O'Regan RM, Yezhelyev MV, Simons JW, Wang MD, Nie S. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nat Protoc* 2007;2:1152–65.

**Xu B**, N.D. Chasteen, Iron oxidation chemistry in ferritin—increasing Fe/O<sub>2</sub> Stoichiometry during core formation, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19965–19970.

**Yamashita I**, J. Hayashi and M. Hara, *Chem. Lett.*, 2004, 33, 1158.

**Yang X.K**, Y. Chen-Barrett, P. Arosio, N.D. Chasteen, Reaction paths of iron oxidation and hydrolysis in horse spleen and recombinant human ferritins, *Biochemistry* 37 (1998) 9743–9750.

**Yang X**, N.E. Le Brun, A.J. Thomson, C.R. Moore, N.D. Chasteen, The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin, *Biochemistry* 39 (2000) 4915–4923.

**Yevenes, A. E.**, Marquez, V., & Watt, R. K. (2011). Cloning and characterization of *Chlorobium tepidum* ferritin. *Biochimie*, 93(2), 352-60. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.biochi.2010.10.008

**Yu W.W, E. Chang**, R. Drezek and V. L. Colvin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 348, 781.

**Zhao G.H**, F. Bou-Abdallah, P. Arosio, S. Levi, C. Janus-Chandler, N.D. Chasteen, Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide, *Biochemistry* 42 (2003) 3142–3150.

**Zhou M**, Nakatani E, Gronenberg LS, Tokimoto T, Wirth MJ, Hruby VJ, Roberts A, Lynch RM, Ghosh I. Peptide-labeled quantum dots for imaging GPCRs in whole cells and as single molecules. *Bioconjug Chem* 2007;18:323–32.